

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Andrea Grígelová**

**Raritní populace B lymfocytů na pozadí periferní B lymfopoézy u lidí**

Rare B lymphocyte populations in the context of peripheral B lymphopoiesis in humans

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: RNDr. Šárka Růžičková, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Šárky Růžičkové, Ph.D. na Katedře antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Současně prohlašuji, že jsem při sestavování práce dodržela zásady vědecké etiky a uvedla všechny použité literární a odborné zdroje. Zároveň prohlašuji, že tato diplomová práce je originální, a nikdy nebyla použita pro získání jiného, případně stejného akademického titulu.

V Praze dne 11. 4. 2017

Andrea Grígelová

## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Šárce Růžičkové, PhD. za odborné vedení, za laskavý, milý a vstřícný přístup, pomoc při vyhodnocování naměřených dat a za vytvoření přátelské atmosféry v naší pracovní skupině. Mé poděkování míří také k RNDr. Janu Svobodovi, PhD. z Centra pro Cytometrii a Mikroskopii MBÚ AVČR v. v. i., jehož fundované názory, rady a odborná pomoc byly v procesu vyhodnocení a zpracování dat klíčové. Děkuji i Mgr. Milanu Polákovi, kolegovi, který byl vždy ochoten pomoci s řešením více či méně problémů, ať už šlo o vlastní analýzy vzorků nebo o vyhodnocení dat. Děkuji i ostatním členům naší pracovní skupiny, Mgr. Renatě Suché, se kterou jsem strávila nejednu dlouhou noc v prostoru laboratoře a Martinu Kolářovi, který byl ochotným poradcem zejména v oblasti statistického vyhodnocení dat.

Velikou roli v práci naší skupiny sehrála i RNDr. Pavlína Daňková, PhD. a celý pracovní tým z Laboratoře molekulární antropologie při Katedře antropologie a genetiky člověka. Právě k nim směřuje moje poděkování za vstřícné přijetí a ochotu pomoci ve velmi nelehkých situacích.

Bez podpory své rodiny bych nikdy nemohla nastoupit na cestu „druhé studentské kariéry“, a proto mé díky směřují stejnou měrou také k nim – všudypřítomným, ale málo viditelným mecenášům vědy. K mému muži Michalovi, který s veškerým pochopením podporoval nejen psychicky, ale i finančně, mé rozhodnutí vrátit se do lavic. K mým rodičům, Jarmile a Mariánovi, k mé sestře Jarmile a švagrovi Michalovi, k mému tchánovi Josefovi a jeho partnerce Míle, kteří bez jakýchkoli okolků a váhání vždy s veškerým nasazením v jakékoli situaci pomohli s péčí o mé dva úžasné syny. Není to samozřejmost, a jsem opravdu vděčná, že mi všichni společně vytvořili senzační studijní zázemí. A samozřejmě i k mým dětem, Ondrovi a Kubovi. Dětem, které neočekávaným způsobem posunuly a změnily hranice mého vnímání světa.

## **Abstrakt**

B lymfocyty periferní krve u lidí představují heterogenní buněčné prostředí, které v imunitním systému vykazuje mnoho významných funkcí. V současné době narůstají důkazy o tom, že se B buněčné subpopulace podílejí na patogenezi mnoha různých chorob. Avšak existuje velmi málo nebo téměř žádné poznatky o tom, jak jsou jednotlivá diferenciací stádia B lymfocytů do patologických procesů zapojena, a jaká je jejich distribuce a zastoupení za fyziologického stavu a za patologických podmínek.

Existuje důvodný předpoklad, že podobně jako je tomu u dendritických buněk, NK/NKT buněk a T lymfocytů, také B lymfocytární populace budou obsahovat malé až raritní subpopulace, u nichž se předpokládají relativní frekvence četnosti v rozmezí 0,01% - 0,1 ‰.

Primárním cílem bylo na základě komparativní studie napříč různými druhy obratlovců postihnout rozsah fylogenetické a ontogenetické heterogenity populace periferních B lymfocytů a lymfopoetických orgánů.

Dalším cílem práce bylo na souboru 183 jedinců, z toho 50 kontrol a 133 pacientů s různými (imuno)patologiemi nebo nádorovými onemocněními použít polychromatickou průtokovou cytometrii se záměrem vytypovat vhodnou strategii vymezení a kombinaci povrchových znaků, jejichž prostřednictvím by bylo lze detekovat a prokázat konkrétní minoritní/raritní subpopulace.

Celkem bylo pozorováno více než 40 nových, dosud nikde nepublikovaných raritních subpopulací, z nichž některé zřejmě představují ontogeneticky ranější stadia odpovídající centrálnímu vývoji. Tyto populace připomínají spíše persistující B lymfocyty z období intrauterinního vývoje jedince. Nejzajímavějším nálezem je existence B buněčných subpopulací, které nenesou na svém povrchu žádný z imunoglobulinových izotypů nebo jsou CD20CD27-dvojitě negativní. Obě by mohly s největší pravděpodobností představovat progenitorová stádia, která pronikla do periferní krve.

Práce představuje pilotní studii s návazností na postgraduální studium, kdy je plánována detailnější analýza jednak vzhledem ke klinickému obrazu a jednak k morfológickým a molekulárně biologickým vlastnostem objevených raritních subpopulací

### **Klíčová slova:**

B lymfocyt, periferní lymfopoéza a ontogeneze, průtoková cytometrie, imunofenotyp, evoluce adaptivní imunitní odpovědi

## **Abstract**

B-cells of peripheral blood in humans represent a heterogeneous cellular environment displaying many important functions in the immune system. Recently, there is an increasing amount of evidence that B cell subpopulations are involved in the pathogenesis of many different diseases. However, there is little or no knowledge on how the individual differentiation stages of B lymphocytes are involved in pathological processes, and how they are distributed and represented under the physiological state and under pathological conditions.

There is a reasonable assumption that, as with dendritic cells, NK / NKT cells and T lymphocytes, also B cell populations will contain minor and/or rare subpopulations reaching relative frequencies in the range of 0.01% to 0, 1 ‰.

The primary aim of this thesis was to investigate the extent of phylogenetic and ontogenetic heterogeneity of the peripheral B cell population and lymphopoietic tissues on the basis of a comparative study across different vertebrate species.

Another goal of the work was to use polychromatic flow cytometry with 183 individuals, out of them 50 controls and 133 patients with different (immune) pathologies or tumors in order to identify an optimal combination of surface features, and to use it to detect and demonstrate the existence of minor/rare subpopulations.

In total, more than 40 new, yet unpublished, rare subpopulations have been observed, some of which are ontogenetically early and resemble B lymphocytes from the intrauterine developmental phase.

The most interesting finding is the existence of B cell subpopulations that do not carry any of the immunoglobulin isotypes on their surface or are CD20CD27-double negative. Both of them might, most likely, represent progenitor stages that penetrated into peripheral blood.

The current thesis presents a pilot study, which will be followed by a post-graduate thesis focused on more detailed analysis including the clinical picture, the morphological and molecular biological properties of observed rare subpopulations.

### **Keywords:**

B lymphocyte, peripheral lymphopoiesis and ontogenesis, flow cytometry, immunophenotype, evolution of adaptive immunity

# 1 Obsah

Prohlášení.....	i
Poděkování.....	ii
Abstrakt.....	iii
Abstract.....	iv
1 Obsah .....	v
2 Seznam zkratk .....	1
3 Cíle práce.....	5
4 Adaptivní imunitní systém .....	6
4.1 Evoluce adaptivní imunity.....	6
4.2 Vznik a vývoj B lymfocytů u recentních obratlovců .....	10
4.2.1 Lymfatické orgány.....	10
4.2.2 Klíčové znaky humorální adaptivní imunity .....	17
4.3 Ontogeneze B lymfocytů u člověka.....	25
4.3.1 Centrální vývoj.....	25
4.3.2 Periferní vývoj .....	32
5 Populace B lymfocytů v periferní krvi .....	44
5.1 Raritní populace B lymfocytů .....	46
5.1.1 Příklady raritních lymfocytárních populací identifikovaných v periferní krvi .....	46
5.1.2 Identifikace raritních populací B lymfocytů v periferní krvi .....	48
6 Průtoková cytometrie .....	51
7 Sledované povrchové znaky .....	53
7.1 CD19 (antigen pro B lymfocyty CD19).....	54
7.2 CD20 (antigen pro B lymfocyty CD20).....	54
7.3 CD21 (receptor komplementu typu 2).....	55
7.4 CD24 (transduktor signálu CD24).....	56
7.5 CD27 (antigen aktivace T lymfocytů) .....	57
7.6 CD38 (hydroláza cyklické ADP ribózy).....	58
7.7 IgM (imunoglobulin M) .....	59
7.8 IgD (imunoglobulin D) .....	60
7.9 IgA (imunoglobulin A).....	61
7.10 IgG (Imunoglobulin G) .....	62
8 Charakteristika vybraných patologických stavů studovaných v rámci souboru .....	63
8.1 Choroby pohybového aparátu .....	63
8.1.1 Revmatoidní artritida .....	63
8.1.2 Ankylozující spondylitida.....	65

8.2	Nespecifické záněty střeva.....	66
8.2.2	Crohnova nemoc .....	68
8.2.3	Ulcerózní kolitida.....	70
8.3	Nádorová onemocnění.....	71
8.3.1	Kolorektální karcinom .....	71
8.3.2	Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s kolorektálním karcinomem .....	73
8.3.3	Nádorová onemocnění slinivky břišní .....	73
8.3.4	Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s nádorovým onemocněním slinivky břišní.....	74
9	Materiál a metody.....	75
9.1	Chemikálie, roztoky a monoklonální protilátky .....	75
9.1.1	Chemikálie .....	75
9.1.2	Monoklonální protilátky.....	75
9.1.3	Roztoky.....	76
9.2	Vzorky periferní krve .....	78
9.2.1	Odběr periferní krve.....	78
9.2.2	Izolace periferních mononukleárních buněk (PBMC) .....	78
9.2.3	Zjištění množství PBMC a metoda stanovení životnosti buněk .....	80
9.2.4	Příprava protilátek .....	81
9.2.5	Značení buněk pro měření na průtokovém cytometru.....	82
9.2.6	Měření na průtokovém cytometru .....	84
9.3	Vyhodnocení dat .....	85
10	Výsledky .....	86
10.1	Databáze pacientů a kontrol .....	87
10.2	Distribuce CD19+ periferních lymfocytárních subpopulací ve vyšetřovaném souboru: CD19+, naivní, maturované, plazmatické a dvojitě negativní (CD20-CD27-).....	97
10.2.1	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru kontrol .....	97
10.2.2	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s revmatoidní artritidou.....	97
10.2.3	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s kolorektálním karcinomem .....	98
10.2.4	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s ulcerózní kolitidou .....	99
10.2.5	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s Crohnovou chorobou.....	100
10.2.6	Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s karcinomem pankreatu .....	100

10.3	Statistická analýza distribucí frekvencí hlavních CD19+ periferních lymfocytárních populací	102
10.4	Distribuce CD20-CD27-DN lymfocytárních subpopulací ve sledovaném souboru.....	105
10.4.1	CD20-CD27- DN populace CD19+ lymfocytů.....	105
10.5	Statistická analýza distribucí frekvencí CD19+CD20-CD27- periferních lymfocytárních subpopulací .....	111
10.6	Skladba CD19+ periferních populací lymfocytů v závislosti na pohlaví .....	117
10.7	Další raritní subpopulace zjištěné v periferní krvi.....	118
11	Diskuze .....	120
11.1	Limitace velikosti vzorku .....	121
11.1.1	Limitace použitou separační metodou.....	121
11.1.2	Modifikace rychlosti toku buněk.....	122
11.1.3	Nastavení fluorescenčního prahu .....	122
11.2	Poměr signál/šum .....	122
11.3	Volba softwarového řešení pro analýzu dat .....	124
11.4	Vyhodnocení naměřených dat – vstupní a výstupní kontrola .....	125
11.5	Použitý panel protilátek .....	126
11.6	Interpretace získaných výsledků .....	127
11.7	Zdroje heterogenity B lymfocytárních populací v periferní krvi .....	130
11.8	Alternativní pohled na B buněčnou adaptivní imunitu .....	131
12	Shrnutí.....	133
13	Seznam použité literatury .....	135

## 2 Seznam zkratek

zkratka	anglicky	česky
<b>AA</b>	<i>aplastic anemia</i>	aplastická anemie
<b>AA4</b>	<i>fetal stem cell antigen AA4</i>	antigen fetálních kmenových buněk AA4
<b>ADPR</b>	<i>adenosine diphosphate ribose</i>	adenosindifosfátribóza
<b>Ag</b>	<i>antigene</i>	antigen
<b>AHR</b>	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>	arylový hydrokarbonový receptor
<b>AID</b>	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>	aktivaci indukovaná cytidindeamináza
<b>AM</b>	<i>affinity maturation</i>	afinitní maturace
<b>AML</b>	<i>acute myeloid leukemia</i>	akutní myeloidní leukémie
<b>APC</b>	<i>antigen presenting cell</i>	antigen prezentující buňka
<b>AS</b>	<i>ankylosing spondylitis</i>	ankylozující spondylitida
<b>BAFF</b>	<i>B cell activating factor</i>	faktor aktivující B lymfocyt
<b>BASDAI</b>	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>	index testu aktivity ankylozující spondylitidy
<b>BCAP</b>	<i>B-cell adaptor for phosphatidylinositol-3-OH-kinase</i>	B lymfocytární adaptor pro fosfatidylinositol-3-OH-kinázu
<b>BCL11b</b>	<i>B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 11B protein</i>	protein B buněčné chronické lymfocytární leukemie/lymfomu 11B
<b>BCL-6</b>	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>	protein B lymfocytárního lymfomu 6
<b>BCR</b>	<i>B-cell receptor</i>	receptor B lymfocytů
<b>BM</b>	<i>bone marrow</i>	kostní dřeň
<b>Breg</b>	<i>regulatory B cells</i>	regulační B lymfocyty
<b>BTK</b>	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>	Brutonova tyrosinkináza
<b>C</b>	<i>constant segment</i>	konstantní oblast
<b>C3d</b>	<i>C3d fragment of complement</i>	fragment komplementu C3d
<b>C3dg</b>	<i>C3dg fragment of complement</i>	fragment komplementu C3dg
<b>CAM</b>	<i>cell adhesion molecule</i>	molekuly buněčné adheze
<b>CCR9</b>	<i>C-C chemokine receptor type 9</i>	C-C chemokinový receptor typu 9
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	povrchový znak, diferenciační antigen
<b>CDA</b>	<i>cytidine deaminase</i>	cytidindeamináza
<b>c-KIT</b>	<i>tyrosine kinase receptor; též proto-oncogene c-KIT, též CD117</i>	tyrosinkinázový receptor; též protoonkogen c-KIT, též, CD117
<b>CLP</b>	<i>common lymphoid progenitor</i>	společný lymfoidní předek
<b>CMP</b>	<i>common myeloid progenitor</i>	společný myeloidní progenitor
<b>CRC</b>	<i>colorectal carcinoma</i>	kolorektální karcinom
<b>CSR</b>	<i>class switch recombination</i>	izotypový přesmyk
<b>CVID</b>	<i>common variable immunodeficiency</i>	běžná variabilní imunodeficiencie
<b>CXCR3</b>	<i>chemokine receptor type 3; též CD182, CD183</i>	chemokinový receptor typu 3; též CD182, CD183
<b>CXCR4</b>	<i>chemokine receptor type 4; též CD184</i>	chemokinový receptor typu 4; též CD184
<b>CXCR5</b>	<i>chemokine receptor type 5; též CD185, též BLR1 (Burkitt lymphoma receptor)</i>	chemokinový receptor typu 5; též CD185, též BLR1 (receptor Burkittova lymfomu)
<b>D</b>	<i>diversity segment</i>	genový segment určující diversitu

zkratka	anglicky	česky
<b>DC</b>	<i>dendritic cell</i>	dendritická buňka
<b>DN</b>	<i>double negative</i>	dvojitě záporná
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleotic acid</i>	kyselina deoxyribonukleová
<b>E2A</b>	<i>transcription factor E2A</i>	transkripční faktor E2A
<b>EBF</b>	<i>early B cell factor 1</i>	faktor raného B lymfocytu 1
<b>EBV-R</b>	<i>Epstein-Barr virus receptor</i>	receptor viru Epstein-Barrové
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	fluorescenčně aktivované třídění buněk
<b>FDC</b>	<i>follicular dendritic cell</i>	folikulární dendritická buňka
<b>FMO</b>	<i>fluorescence minus one</i>	kontrola fluorescence bez jedné
<b>FO</b>	<i>follicular</i>	folikulární
<b>FSC</b>	<i>forward scatter channel</i>	kanál předního rozptylu
<b>FSC-A</b>	<i>forward scatter channel - area</i>	kanál předního rozptylu - plocha
<b>FSC-H</b>	<i>forward scatter channel - height</i>	kanál předního rozptylu - výška
<b>GALT</b>	<i>gut associated lymphoid tissue</i>	se střevní tkání asociovaná lymfatická tkáň
<b>GATA2/3</b>	<i>transcription factor GATA2/3</i>	transkripční faktor GATA2/3
<b>GC</b>	<i>germinal center</i>	zárodečné centrum
<b>Gfi1</b>	<i>growth factor independent 1 transcriptional repressor</i>	na růstovém faktoru nezávislý transkripční represor 1
<b>GMP</b>	<i>granulocyte-macrophage progenitor</i>	progenitorová buňka granulocytů a makrofágů
<b>GPI</b>	<i>glycophosphatidylinositol</i>	glykosilfosfatidylinositol
<b>GWAS</b>	<i>genome wide association study</i>	celogenomová asociační studie
<b>HSC</b>	<i>hematopoietic stem cell</i>	hematopoietická kmenová buňka
<b>HSC-LT</b>	<i>long term hematopoietic stem cell</i>	dlouhodobá hematopoietická kmenová buňka
<b>HSC-ST</b>	<i>short term hematopoietic stem cell</i>	krátkodobá hematopoietická kmenová buňka
<b>IBD</b>	<i>inflammatory bowel disease</i>	nespecifický zánět střev
<b>iC3b</b>	<i>inactive C3b fragment of complement</i>	neaktivní C3b fragment komplementu
<b>ICD10</b>	<i>International Classification of Diseases 10</i>	Mezinárodní klasifikace chorob 10
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>interferone <math>\gamma</math></i>	interferon $\gamma$
<b>Ig</b>	<i>immunoglobulin</i>	imunoglobulin
<b>IgH</b>	<i>heavy chain of immunoglobulin</i>	těžký řetězec imunoglobulinu
<b>IgL</b>	<i>light chain of immunoglobulin</i>	lehký řetězec imunoglobulinu
<b>IgT</b>	<i>trout immunoglobulin</i>	imunoglobulin typický pro pstruha
<b>IgZ</b>	<i>zebrafish immunoglobulin</i>	imunoglobulin typický pro danio
<b>Ikzf1</b>	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>	zinc finger rodiny IKAROS
<b>IL</b>	<i>interleukin</i>	interleukin
<b>IM-B</b>	<i>immature B lymphocyte</i>	nezralý (nematurovaný) B lymfocyt
<b>IMS</b>	<i>immunomagnetic separation</i>	imunomagnetická separace
<b>J</b>	<i>joining segment</i>	spojovací úsek
<b>JNK</b>	<i>Jun-amino-terminal kinase</i>	Jun-N-terminální kináza
<b>kDa</b>	<i>kilodalton</i>	kilodalton
<b>KRO</b>	<i>Crohn's disease</i>	Crohnova choroba
<b>LPL</b>	<i>lamina propria lymphocytes</i>	lymfocyty v lamina propria

zkratka	anglicky	česky
<b>LPS</b>	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolysacharid
<b>LRR</b>	<i>leucine rich repeats</i>	na leucin bohaté repetice
<b>Ly6d</b>	<i>Lymphocyte Antigen 6D</i>	antigen lymfocytů 6D
<b>mAb, mAbs</b>	<i>monoclonal antibody, antibodies</i>	monoklonální protilátka, protilátky
<b>MALT</b>	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>	se sliznicí asociovaná lymfatická tkáň
<b>MAP</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	mitogenem aktivované proteinkinázy
<b>MDS</b>	<i>myelodysplastic syndrome</i>	myelodysplastický syndrom
<b>MEP</b>	<i>megakaryocyte-erythroid progenitor cell</i>	progenitorová buňky megakaryocytů a erytrocytů
<b>MHC</b>	<i>main histocompatibility complex</i>	hlavní histokompatibilní komplex
<b>mIgM</b>	<i>monomeric IgM</i>	monomerní IgM
<b>MM</b>	<i>multiple myelome</i>	mnohočetný myelom
<b>MOMA 1</b>	<i>anti-metalophillic macrophages antibody</i>	antimetaloofilní protilátka makrofágů
<b>MPP</b>	<i>myeloid pluripotent progenitor</i>	pluripotentní progenitor myeloidní linie
<b>MS4A1</b>	<i>membrane-spanning 4a gene</i>	Membránu přemostující gen 4a
<b>MZ</b>	<i>marginal zone</i>	marginální zóna
<b>MZ B</b>	<i>marginal zone B lymphocyte</i>	B lymfocyt marginální zóny
<b>MZ P</b>	<i>marginal zone precursors</i>	prekurzor buněk marginální zóny
<b>NAD+</b>	<i>nicotine adenine dinucleotide</i>	nikotinadenindinukleotid
<b>NAR</b>	<i>new antigen receptor</i>	nový receptor antigenů
<b>NK</b>	<i>natural killer</i>	přirozený zabíječ
<b>NKC</b>	<i>natural killer cell</i>	přirozeně zabíjející buňka
<b>NOTCH-1</b>	<i>neurogenic locus notch homolog protein 1</i>	NOTCH homologní protein 1
<b>NOTCH2</b>	<i>neurogenic locus notch homolog protein 2</i>	NOTCH homologní protein 2
<b>NSM</b>	<i>non-switched memory</i>	bez izotypového přesmyku
<b>PALS</b>	<i>periarteriolar lymphatic sheath</i>	periarteriolární lymfatická pochva
<b>PBMC</b>	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	mononukleární buňky periferní krve
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	pufrovaný fyziologický roztok
<b>PELS</b>	<i>perielipsoid lymphatic sheath</i>	perielipsoidní lymfatická pochva
<b>PFAPA</b>	<i>Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Cervical Adenitis</i>	syndrom periodické horečky
<b>PI3K<math>\gamma</math></b>	<i>phosphatidylinositol-3-kinase <math>\gamma</math></i>	fosfatidylinositol-3-kináza $\gamma$
<b>pIgM</b>	<i>pentameric IgM</i>	pentamerní IgM
<b>Pre-B</b>	<i>precursor B lymphocyte</i>	prekurzorový B lymfocyt
<b>Pre-Pro-B</b>	<i>precursor of progenitor B lymphocyte</i>	prekurzor progenitorového B lymfocytu
<b>Pro-B</b>	<i>progenitor B lymphocyte</i>	progenitorový B lymfocyt
<b>PU.1</b>	<i>hematopoietic transcription factor PU.1</i>	hematopoietický transkripční faktor PU.1
<b>RA</b>	<i>rheumathoid arthritis</i>	revmatoidní artritida
<b>RAG</b>	<i>recombinase-activating gene</i>	rekombinázu aktivující gen
<b>RAG1</b>	<i>recombinase-activating gene 1</i>	rekombinázu aktivující gen 1
<b>RAG2</b>	<i>recombinase-activating gene 2</i>	rekombinázu aktivující gen 2
<b>RSS</b>	<i>recombination signaling sequence</i>	rekombinační signální sekvence

zkratka	anglicky	česky
<b>SHM</b>	<i>somatic hypermutation</i>	somatická hypermutace
<b>sIgA</b>	<i>secretory immunoglobulin A</i>	sekreční imunoglobulin A
<b>SIgAD</b>	<i>selective IgA deficiency</i>	selektivní IgA deficiencie
<b>SLE</b>	<i>systemic lupus erythematoides</i>	systémový lupus erythematoides
<b>SM</b>	<i>switched memory</i>	po izotypovém přesmyku
<b>SSC</b>	<i>side scatter channel</i>	kanál bočního rozptylu
<b>SSC-A</b>	<i>side scatter channel - area</i>	kanál bočního rozptylu - plocha
<b>STAT</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>	transduktor signálu a aktivátor transkripce
<b>Syk</b>	<i>spleen tyrosine kinase</i>	kináza rodiny Syk
<b>T1</b>	<i>transient B lymphocyte type 1</i>	tranzientní B lymfocyt typu 1
<b>T2</b>	<i>transient B lymphocyte type 2</i>	tranzientní B lymfocyt typu 2
<b>T3</b>	<i>transient B lymphocyte type 3</i>	tranzientní B lymfocyt typu 3
<b>TCR</b>	<i>T-cell receptor</i>	receptor T lymfocytů
<b>TdT</b>	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>	terminální deoxynukleotidyltransferáza
<b>Tfh</b>	<i>follicular B helper T cell</i>	pomocný folikulární T lymfocyt
<b>Th</b>	<i>helper T cell</i>	pomocný T lymfocyt
<b>TIL-B</b>	<i>CD20+ tumor infiltrating B cells</i>	CD20+ tumory infiltrující B lymfocyty
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>	receptor podobný genu Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
<b>UC</b>	<i>ulcerous colitis</i>	ulcerózní kolitida
<b>V</b>	<i>variable segment</i>	variabilní úsek
<b>V(D)J</b>	<i>Variable (Diversity) Joining</i>	segment kódující variabilní, diversitní a spojující část variabilní oblasti CDR3
<b>VLR</b>	<i>variable lymphocyte receptor</i>	variabilní receptor lymfocytů
<b>WSB</b>	<i>Wash/Staining Buffer</i>	promývací roztok

### 3 Cíle práce

Prací zaměřených na detekci raritních populací periferních B lymfocytů u člověka je doposud velmi málo. Avšak během přípravy rešeršní části této diplomové práce se ukázalo, že v lidském organismu je přítomna celá řada B buněčných subpopulací, které jsou z ontogenetického hlediska pravděpodobně v ranější vývojových stádiích, tj. na úrovni embryonálních nebo fetálních progenitorů.

Tím byl určen **první a základní cíl provést komparativní analýzu** literárních údajů o mechanismech adaptivní B lymfocytární odpovědi nejen pro člověka ale v rámci obratlovců také pro jiné druhy.

V rámci této diplomové práce jsem se dále zaměřila na následující dílčí cíle:

1. Vývoj strategie vymezení bran na datech získaných prostřednictvím polychromatické průtokové cytometrie za použití osmi a posléze jedenáctibarevného panelu s cílem zjistit, zda se takové populace vůbec v periferní krvi vyskytují a zda je lze detekovat.
2. Vytypovat sledování takové kombinace povrchových CD znaků, která by umožnila detekovat jednotlivá stadia kontinuálního vývoje subpopulací periferní B lymfopoézy od T1 B buněk po terminální stadia plazmatických buněk.
3. Vytvořit postup analýzy naměřených dat, který bude co nejvíce objektivní a nebude závislý na konkrétním hodnotiteli.
4. Sledovat distribuci minoritních populací na souboru zdravých kontrol a pacientů s vybranými imunopatologiemi, s podchyčením diagnosticky/klinicky zajímavých subsetů.
5. Vytvoření databáze zahrnující kompletní data pro každého probanda udržování.

## 4 Adaptivní imunitní systém

Adaptivní (specifická) imunita je evolučně mladší součástí imunitního systému. Adaptivní imunita se opírá o buněčné mechanismy zprostředkované zejména T lymfocyty a látkové (humorální) mechanismy indukované B lymfocyty. Jejimi typickými vlastnostmi jsou vazba na nespecifickou (vrozenou) imunitu, pomalý nástup odpovědi v porovnání s imunitou vrozenou, vysoká antigenní specifita, imunologická paměť a od ní odvozený odlišný průběh imunitní reakce organismu při opakovaném setkání se stejným antigenem. Adaptivní imunitu lze vnímat jako funkční, evoluční a ontogenetickou nástavbu přirozené (vrozené) imunity.

### 4.1 Evoluce adaptivní imunity

Vznik prvotních paměťových imunitních systémů můžeme na základě fylogenetického studia starobylých taxonů, jakými jsou houbovci (*Porifera*), kroužkovci (*Annelida*) a členovci (*Arthropoda*), datovat do období kambria (540 milionů let). Nejedná se ještě o komplexní imunitní systémy, ale zástupci těchto rodů si vyvinuli mechanismy, které jsou projevem omezené imunitní paměti, a zároveň je lze považovat za prekurzory adaptivního imunitního systému (Netea, Quintin et al. 2011, Boehm 2012).

Tento intermediární systém, ve kterém nelze imunitní odpověď definovat jako vrozenou, ale ani jako adaptivní, je též nazýván trénovaná imunita (Netea, Quintin et al. 2011). Trénovanou imunitu můžeme definovat jako typ imunity, který je charakterizovaný omezenou pamětí, rozmanitou expresí receptoru pro antigen a rozvojem lymfoidních orgánů s tvorbou specializovaných imunokompetentních buněk (Boehm 2011, Netea, Quintin et al. 2011, Boehm 2012, Boehm, Hess et al. 2012). Prototypické buňky vrozené imunity jako NK buňky či makrofágy vykazují znaky imunitní paměti (Netea, Quintin et al. 2011), a lze dovozovat, že jakožto nositelé evolučně pokročilých funkcí, budou důležitým vodítkem k nalezení společného předka specializovaných buněk adaptivní imunitní odpovědi.

Muller, Blumbach et al. (1999) se věnovali studiu houbovců, jmenovitě pak druhům *Geodia cydonium* a *Suberites domuncula*, u kterých popsali některé „savčí“ prvky vrozené i adaptivní imunity, a to na molekulární i buněčné úrovni. U houbovce *Geodia cydonium* popisují dva druhy polymorfních Ig-podobných (Ig-like) receptorů, které jsou sdruženy do variabilních sad imunoglobulinů, u druhu *Suberites domuncula* popisují imunitně podmíněnou reakci na alogenní štěp zprostředkovanou zvýšenou expresí od lymfocytů odvozeného cytokinu

typického pro savce (Muller, Blumbach et al. 1999). Dále popisují reakci *S. domuncula* na lipopolysacharid (LPS), který se váže na buněčnou povrchovou molekulu CD14. Po vystavení organismu působení LPS dochází k fosforylaci MAP kináz p38 a JNK, podobně jako je tomu u savců (Muller, Blumbach et al. 1999).

Pravá adaptivní imunita *stricto sensu* se objevuje u prvních obratlovců, jejichž první zástupci se na Zemi objevili v raných obdobích paleozoika (Boehm 2012, Boehm, McCurley et al. 2012). Adaptivní imunita představuje vysoce individualizovaný systém, pro který je typický rozvoj imunitní paměti zprostředkovaný mechanismy somatické rekombinace genových segmentů genu pro imunoglobulin, afinitní maturace a klonální expanze specializovaných imunitních buněk – B lymfocytů (Bonilla a Oettgen 2010, Boehm, McCurley et al. 2012, Parra, Takizawa et al. 2013). Zároveň si ale ponechává některé starobylé znaky, jako je schopnost fagocytózy a mikrobicidní aktivita. Obě tyto vlastnosti byly nedávno popsány u populace myších B-1 B lymfocytů (Parra, Rieger et al. 2012). Tyto poznatky svědčí o vzájemné evoluční, funkční a vývojové příbuznosti vrozené a získané imunity (Parra, Rieger et al. 2012)

V současnosti jsou charakterizovány a rozlišovány dva existující strategické systémy adaptivní imunity, *variable lymphocyte receptor system* (dále jen VLR systém) a *B-cell/T-cell receptor system* (dále jen BCR/TCR systém). Je velmi pravděpodobné, že za rozvojem těchto dvou odlišných systémů stojí přechod obratlovců z vodního prostředí na souš. Důkazy o tomto vývoji poskytuje studium obojživelníků, zejména žáby druhu *Xenopus tropicalis*. *Xenopus* je vynikající model pro studium vzniku adaptivní imunity v podobě v jaké ji známe u moderních čelistnatců. Klíčovým znakem je, že obojživelníci jsou nejstarší živočišnou třídou, u které na imunoglobulinech detekujeme izotypový přesmyk, avšak za současné absence zárodečných center nutných pro T dependentní imunitní odpověď (Robert a Ohta 2009). U obojživelníků zároveň dochází k „přeprogramování“ imunitního systému během morfogeneze, tedy při přechodu ze stadia na vodní prostředí vázané larvy a dospělé (Du Pasquier 1992, Du Pasquier, Robert et al. 2000).

Evolučně starší VLR systém, který byl popsán u žijících zástupců nadtřídy bezčelistnatců (*Agnatha*), je založený na expresi variabilního receptoru na povrchu T a B lymfocytům podobných buněk (Boehm, McCurley et al. 2012). Tento variabilní receptor je složen z jednotek LRR (z angl. *leucine rich repeats*) proteinů (Boehm, McCurley et al. 2012). Hlavním diversifikačním mechanismem je genová konverze zprostředkovaná cytidin deaminázou (CDA, v originálním textu uváděno jako cytosin deamináza) (Parra, Takizawa et

al. 2013). Na základě studií žijících druhů sliznatek (*Myxiniiformes*) a mihulí (*Cephalaspidomorphi*) byly popsány tři strukturní a funkční varianty VLR receptoru – VLRA, VLRB a VLRC receptor (Kasamatsu, Sutoh et al. 2010, Bajoghli, Guo et al. 2011, Boehm, McCurley et al. 2012, Parra, Takizawa et al. 2013). Předpokládá se, že populace VLRA+ a VLRC+ buněk jsou podobné klasickým T lymfocytům. Spolu s IL-17 a IL-8R exprimují i ortologní transkripty typické pro T lymfocyty jako jsou GATA2/3, c-rel, AHR, BCL11b, CCR9, NOTCH-1, CD45 (Kasamatsu, Sutoh et al. 2010, Bajoghli, Guo et al. 2011, Boehm, McCurley et al. 2012, Parra, Takizawa et al. 2013). Oproti tomu populace VLRB+ buněk vykazuje znaky svědčící o funkční podobnosti s B lymfocyty (spolu s IL-17R, IL-8 exprimují ortologní transkripty spojené s aktivací a diferenciací B lymfocytů jako jsou CXCR4, TLR2, TLR7, TLR10, Syk, BCAP) (Kasamatsu, Sutoh et al. 2010, Bajoghli, Guo et al. 2011, Boehm, McCurley et al. 2012, Parra, Takizawa et al. 2013).

Vlastnost	VLRA+ populace	VLRB+ populace	VLRC+ populace
<b>Vývoj</b>	podobné T lymfocytům	podobné B lymfocytům	pravděpodobně podobnější T-lymfocytům
	jsou funkčně podobné $\alpha\beta$ T-lymfocytům čelistnatců?	jsou součástí vrozené imunity?	jsou funkčně podobné $\gamma\delta$ T-lymfocytům čelistnatců?
	podílejí se na funkční interakci VLRA/VLRB?		podílejí se na funkční interakci VLRA/VLRB?
<b>proliferace</b>	po stimulaci fytohemaglutininem nebo antigenem	po imunizaci bakteriemi/lidskými erythrocyty	?
<b>diferenciace</b>	nediferencují do VLRA secernujících buněk	diferencují a transformují se do plasmocytům podobných buněk produujících VLRB protilátky	?
<b>sekrece</b>	nesecernují VLRA do plazmy	secernují VLRB do plazmy	?
<b>receptor</b>	VLRA	VLRB: analog receptoru BCR	VLRC: strukturně podobnější VLRA
	na povrchu lymfocytu jako transmembránový receptor	na povrchu lymfocytu jako transmembránový receptor	?
<b>exprese</b>	IL-17, IL-8R	IL-17R, IL-8	?
	exprese ortologních transkriptů typicky exprimovaných T-lymfocyty	exprimuje ortologní transkripty spojené s aktivací a diferenciací B-lymfocytů	?
	GATA2/3, c-rel, AHR, BCL11b, CCR9, Notch-1, CD45	CXCR4, TLR2, TLR7, TLR10, Syk, BCAP	?
<b>vývoj</b>	thymoidní tkáň na vrcholovém konci žaberních filament, zřejmě funkčně rozdělena do histologických mikroenvironmentů (CDA1 na vnější straně thymoidu; VLRA hojnější, vnitřní část thymoidu)	tyflosolis a/nebo ledvina (exprese CDA2)	transkripce genu v leukocytech periferní krve a hematopietické tkáni ledviny a střeva/povrchy kůže a střeva

Tabulka 1 Porovnání vlastností hlavních subpopulací VLR lymfocytů (podle Kasamatsu, Sutoh et al. 2010, Bajoghli, Guo et al. 2011, Boehm, McCurley et al. 2012, Parra, Takizawa et al. 2013)

Evolučně mladší BCR/TCR systém se objevuje u čelistnatců (*Gnathostomata*). Tento systém je založen na přítomnosti BCR nebo TCR na povrchu lymfocytů. Na základě přítomnosti tohoto receptoru lze rozlišit dvě hlavní populace lymfocytů adaptivní imunity – B lymfocyty, které exprimují BCR a T lymfocyty, které ve své membráně nesou TCR. Mezi

typické diversifikační mechanismy, kterými B lymfocyty procházejí, patří genová konverze – V(D)J rekombinace, somatická hypermutace a izotypový přesmyk (Parra, Takizawa et al. 2013). V(D)J rekombinace je jedinečný proces, kterým procházejí B a T lymfocyty během svého ontogenetického vývoje. Během V(D)J rekombinace dochází k přeskupení a selekci V (z angl. *variable*), D (z angl. *diversity*) a J (z angl. *joining*) genových segmentů, a zmnožení repertoáru produkovaných antigenních receptorů (Hořejší, Bartůňková et al. 2013).

Somatická hypermutace je pochod, během kterého jsou B lymfocyty schopny vnášením nukleotidových substitucí mutovat gen kódující tvorbu protilátek. Somatická hypermutace zvyšuje variabilitu produkovaných protilátek a umocňuje tak schopnost B lymfocytů lépe reagovat na antigenní stimuly, zvyšuje se jejich specifita a afinita (Hořejší, Bartůňková et al. 2013). Izotypový přesmyk je biologický proces, během kterého dochází ke změně typu protilátky produkované B lymfocytem. Jedná se o změnu v konstantní oblasti těžkého řetězce, variabilní oblast se nemění. Díky tomu je zachována specifita protilátky vůči danému antigenu, mění se ale její efektorové funkce (Honjo, Muramatsu et al. 2004).

Lze předpokládat, že společný předek čelistnatců a bezčelistnatců měl na povrchu svých imunokompetentních buněk primordiální verzi BCR/TCR/VLR receptoru. Poté, co se objevila cytidin deamináza (CDA), došlo k celogenomové duplikaci a následně oddělenému vývoji imunitních systémů obou skupin obratlovců (Boehm 2011, Boehm 2012, Boehm, Hess et al. 2012).

Klíčovým momentem pro rozvoj BCR/TCR adaptivní imunity byl vznik pro lymfocyty specifických rekombináz. Tyto enzymy, které jsou produktem genů z genové rodiny RAG1 a RAG2 (rekombinázu aktivující gen, z angl. *recombinase-activating gene*), jsou zodpovědné za průběh rekombinace a přestavbu imunoglobulinu B lymfocytů a receptoru T lymfocytů během V(D)J rekombinace (Cooper a Alder 2006, Boehm 2012). Původ genu pro RAG můžeme na základě sekvenční homologie hledat v superrodině „*cut and paste*“ DNA transpozonů *Transib* (Kapitonov a Jurka 2003). Předpokládá se, že v průběhu evoluce došlo k opakovaným invazím těchto transpozonů do genomu obratlovců (Litman, Cannon et al. 2005, Cooper a Alder 2006, Kapitonov a Koonin 2015). Přičemž platí, že RAG1 a RAG 2 byly v současnosti popsány pouze u čelistnatců, což zároveň svědčí o pravděpodobném maximálním evolučním stáří těchto rekombináz kolem 500 miliónů let (Kapitonov a Koonin 2015).

V pořadí druhá celogenomová duplikace, ke které došlo po oddělení čtyřnožců (*Tetrapoda*) od kostnatých ryb (*Osteichthyes*) před asi 400 miliony let, vedla k rozvoji adaptivního imunitního systému do podoby, v jaké ho známe dnes (Pancer a Cooper 2006, Robert a Ohta 2009). Hlavní mechanismy adaptivní imunity zůstaly nezměněny, významně se ale mění imunologický a imunofenotypový profil jednotlivých taxonů, a to v závislosti na jejich ekologii.

## **4.2 Vznik a vývoj B lymfocytů u recentních obratlovců**

Poznatky o podobě adaptivního imunitního systému jednotlivých skupin živočichů mohou přispět k pochopení jejich evoluce a vzájemné příbuznosti. Mezidruhové komparativní studie jsou nenahraditelným zdrojem informací o fyziologickém průběhu imunitních reakcí, mohou být ilustrativním/modelovým příkladem pro monitorování nástupu a vývoje vybraných imunitních onemocnění. Adaptivní imunitní systém všech obratlovců je založen na schopnosti lymfocytů zahájit po kontaktu s neznámým antigenem rychlou proliferaci (Page, Wittamer et al. 2013). Funkční repertoár dílčích subpopulací B lymfocytů je však bohatší a bude představovat otisk jejich fylogenetického vývoje. Vedle produkce přirozených, adaptivních i autoprotilátek, jsou B lymfocyty významnými antigen prezentujícími buňkami (LeBien a Tedder 2008). Pro interakci s T lymfocyty je nutné, aby byl antigen napřed internalizován pomocí BCR (LeBien a Tedder 2008). B lymfocyty jsou nezbytné pro správný vývoj tkáňových struktur jako jsou Peyerovy pláty nebo folikulární dendritické buňky sekundárních lymfatických orgánů, po objevení subpopulací regulačních B lymfocytů se potvrdila jejich úloha v imunitní regulaci (LeBien a Tedder 2008). Imunomodulační cytokiny se aktivně účastní reakcí v rejekci transplantátu a nádorové imunitě. Mezi specifické schopnosti patří jejich fagocytární a mikrobicidní aktivita, o které se předpokládalo, že je zachována pouze u B lymfocytů fylogeneticky starých skupin organismů, jako jsou ryby a plazi (Parra, Takizawa et al. 2013), v roce 2016 byla popsána fagocytární aktivita u buněčné linie Raji B lymfocytů člověka (Zhu, Zhang et al. 2016).

### **4.2.1 Lymfatické orgány**

Nezbytným předpokladem pro rozvoj humorální složky adaptivní imunity je přítomnost lymfatických tkání v těle organismu. Lymfatická tkáň, která v těle může vytvářet specializované orgány, je nezbytným místem pro vznik, ontogenezi a regulaci vývoje B a T lymfocytů (Boehm a Bleul 2007). Lymfopoéza je evolučně konzervovaný vývojový proces

(Butler 1998). V rámci hierarchie jednotlivých tkáňových struktur můžeme rozlišit místa a orgány tzv. primární (centrální) lymfopoézy jako je brzlík či kostní dřeň, místa a orgány tzv. sekundární (periferní) lymfopoézy, kam se řadí například slezina a lymfatické uzliny a místa lymfopoézy terciární. Porovnáním poznatků o lymfopoéze T a B lymfocytů dojdeme ke zjištění, že primární diferenciace T lymfocytů je mezidruhově konstantní a odehrává se výlučně v brzlíku. Oproti tomu lymfopoéza a diferenciace B lymfocytů včetně jejich lokalizace v lymfatických orgánech nejsou tak jednoznačné. Vývoj a zrání B lymfocytů může u jednotlivých druhů probíhat ve zcela odlišných tkáních a orgánech (Boehm a Bleul 2007), dokonce může v rámci ontogeneze dojít k významným změnám B lymfopoézy i v rámci jednoho druhu. Z výše uvedeného lze usuzovat, že T lymfocyty se v adaptivní imunitě objevily evolučně dříve, a že nejstarším místem lymfopoézy byl brzlík (Boehm a Bleul 2007).

#### **4.2.1.1 Primární lymfatické orgány**

Primární lymfatická tkáň organizovaná do specializovaných orgánů (brzlík, kostní dřeň, fetální játra) je místem, kde dochází ke vzniku a počátečnímu vývoji B a T lymfocytů z pluripotentního prekursoru, hematopoetické kmenové buňky (HSC, z angl. *hematopoietic stem cell*). Lymfocyty opouštějí oblasti primární lymfopoézy jako naivní buňky, které na svém povrchu exprimují různé sady adhezních molekul a chemokinových receptorů umožňujících migraci lymfocytů do sekundárních lymfatických orgánů (Boehm a Bleul 2007, Paul 2008)

##### **4.2.1.1.1 Brzlík**

V průběhu evoluce obratlovců se primární lymfatické orgány objevily dříve než orgány sekundární (Boehm a Bleul 2007). Tuto skutečnost podporuje i fakt, že brzlík je jako jediný primární lymfatický orgán přítomen u všech žijících druhů čelistnatých obratlovců, viz Obrázek 2 na straně 24.

Evolučně nejstaršími žijícími zástupci čelistnatců na Zemi jsou paryby. Z primárních lymfatických orgánů, které byly u recentních čelistnatců popsány, je u nich přítomen pouze brzlík s jasně rozlišitelnou korovou a dřeňovou oblastí, podobně jako je tomu savců. Kostnaté ryby vykazují druhově vyšší variabilitu co se týče morfologie a mikroanatomické struktury brzlíku, přesto je u všech studovaných druhů přítomen jako místo primární lymfopoézy T lymfocytů (Parra, Takizawa et al. 2013). B lymfopoéza primárně probíhá v předledvině (v lat. *pronephros*; u člověka zachována pouze rudimentárně, společný vývod jednotlivých segmentárních kanálků přetrvává v podobě Wolfova vývodu), která si udržuje spojení s pravou

tělní dutinou, coelomem (Jelínek, Dostál et al. 2002, Paul 2008). U všech vyšších taxonů je brzlík primárním lymfopoetickým orgánem, avšak k lymfopoéze B lymfocytů v něm dochází jen v omezené míře. Odhaduje se, že populace B lymfocytů tvoří méně než 1 % všech v brzlíku přítomných lymfocytů (Hashimoto, Montecino-Rodriguez et al. 2002).

Bez zajímavosti není ani skutečnost, že primárním místem lymfopoézy u kruhoustých jsou žábry. Pokud se zaměříme na embryonální původ brzlíku, bude nám možná evoluční souvislost mezi oběma skupinami zřetelnější.

Embryonální farynx je místem, ve kterém se u nižších obratlovců vyvíjejí žábry (Jelínek, Dostál et al. 2002). Během 4. – 5. týdne embryonálního vývoje člověka dochází k založení faryngeálních (žaberních) oblouků (Jelínek, Dostál et al. 2002). Tyto oblouky jsou tvořeny mezenchymovým stromatem a od sebe jsou vzájemně odděleny faryngeální štěrbinou (Jelínek, Dostál et al. 2002). Z vnější strany jsou oblouky a štěrbiny kryty ektodermem, z vnitřní strany se proti nim vyklenuje endodermem vystlaná stěna jícnu, a vzniká tak morfologická jednotka faryngeální (žaberní) výchlípy. Endoderm předních výběžků obou stran 3. faryngeální výchlípy tvoří základní tkáň pro diferenciaci stromatu brzlíku, do kterého postupně vcestovávají kmenové hematopoetické buňky, které jsou následovány buňkami z krevních ostrůvků ve stěně žloutkového váčku a následně i buňkami z jaterní hematogenní tkáně a kostní dřeni (Jelínek, Dostál et al. 2002, Vacek 2006). Lymfatické uzliny se zakládají difuzně až ve 2. měsíci embryonálního vývoje (Vacek 2006).

#### **4.2.1.2 Kostní dřeň**

Kostní dřeň je hlavním místem krvetvorby a B lymfopoézy u všech vyšších obratlovců, funkci kostní dřeni u nižších obratlovců plní stavebně podobné specializované orgány. První fosilní záznam o přítomnosti kostní dřeni v dutině dlouhých kostí pochází od vyhynulého druhu tetrapoda *Eusthenopteron*, který žil před asi 380 miliony let (Sanchez, Tafforeau et al. 2014). Podíváme-li se na evolučně starší taxony, zjistíme, že paryby, jejichž tělo postrádá kostní tkáň, jsou vybaveny specifickými orgány primární lymfopoézy – epigonálním a Leydigovým orgánem (Smith, Sim et al. 2014), které plní hematopoetickou a lymfopoetickou funkci. Epigonální orgán, který je asociován s gonádami, svou stavbou a funkcí připomíná kostní dřeň, je místem krvetvorby i lymfopoézy, současně slouží jako rezervoár sekrečních B lymfocytů, obsahuje relativně vysoké množství plazmatických B lymfocytů (Smith, Sim et al. 2014), avšak oproti klasické kostní dřeni neobsahuje adipocyty (Bircan-Yıldırım, Çek et al. 2011). U

některých druhů paryb se v blízkosti jícnu vyskytuje Leydigův orgán, retikulární pletivo bohatě prostoupené leukocyty do nějž řídce penetrují arterie a kapiláry, který je místem vzniku červených krvinek, erythropoézy (Bircan-Yıldırım, Çek et al. 2011). Leukocyty v Leydigově orgánu jsou v méně maturovaných stádiích než leukocyty v periferní krvi, proto lze předpokládat, že Leydigův orgán je nezbytným místem pro vývoj myeloidní linie buněk (Bircan-Yıldırım, Çek et al. 2011)..

Jak bylo uvedeno dříve, u kostnatých ryb plní B lymfopoetickou funkci kostní dřevě předledvina, jejíž histologická stavba se významně podobá strukturám ledviny u vyšších obratlovců (Du Pasquier 1992). Kromě předledviny jsou popsány druhově specifické tkáňové ekvivalenty kostní dřevě. Do této skupiny patří především meningeální tkáň bichirů, nebo srdeční a gonadální tkáň mnohokostnatých (*Holostei*) (Du Pasquier 1992). Poněkud složitější je situace u zástupců obojživelníků, u nichž se schopnost tvorby B lymfocytů liší nejen mezidruhově, ale i ontogeneticky – jednotlivé orgány plní odlišné funkce v larválním a dospělém stadiu. Přesto si u většiny druhů předledvina larev udržuje svou funkci hematopoetického orgánu (Du Pasquier 1992). Tuto hematopoetickou aktivitu od ní po metamorfóze larvy v dospělého přejímá kostní dřevě (Du Pasquier 1992). Hlavním primárním lymfopoetickým orgánem většiny obojživelníků jsou v larválním období játra (Du Pasquier 1992). Po metamorfóze v dospělého jejich funkci nahrazuje kostní dřevě a slezina. Nicméně existují významné druhové odlišnosti, například u zástupců druhů *Rana pipensis* jsou v larválním období hlavním lymfopoetickým orgánem předledvina a prvoledvina (v lat. *mesonefros*), u dospělého jedince tohoto druhu je to výhradně kostní dřevě (Du Pasquier 1992, Du Pasquier, Robert et al. 2000).

Přestože jsou plazi přímými předky jak ptáků, tak savců, a u jednotlivých zkoumaných druhů se kostní dřevě již stabilně a konstantně vyskytuje jako hematopoetický orgán, tak o mechanismech B lymfopoézy a původu imunoglobulinů u plazů nevíme téměř nic (Paul 2008). Vznik a vývoj T lymfocytů probíhá v brzlíku, který je dobře rozdělený na korovou a dřevěnou oblast, avšak specializovaný lymfopoetický orgán, který by byl primárním místem vzniku B lymfocytů, nebyl zatím popsán (Campbell 2015). Parra et al. (2012) jako místo primární B lymfopoézy uvádějí fetální játra.

Oproti tomu ptáci jsou vybaveni specializovaným orgánem, ve kterém probíhá vznik a vývoj B lymfocytů. Tímto orgánem je Fabriciova bursa, kterou jako samostatný orgán popsal již v roce 1621 Fabricius ab Aquapendente (Ribatti, Crivellato et al. 2006). Na rozluštění

podstaty své funkce tento orgán čekal přes 350 let. Fabriciova bursa se nachází v terminální části střeva ptáků a je hlavním místem B lymfopoézy (Ribatti, Crivellato et al. 2006). Objevuje se v blízkosti kloaky během 5. dne od oplodnění, postupně hypertrofuje a vytváří asi 8 000 – 12 000 folikulů tvořených septem oddělenou dřeninou a kůrou, aby během 4. týdne od oplodnění došlo k její involuci (Ribatti, Crivellato et al. 2006, Paul 2008). Za tuto krátkou dobu dojde k osídlení folikulů jen velmi malým množstvím B lymfocytů, které diferencují a po 3 týdnech od oplodnění začínají osidlovat sekundární lymfatické orgány (Paul 2008).

Z pohledu možných cest primárního vývoje B lymfocytů u savců můžeme rozlišit dvě hlavní skupiny. První skupinu představují živočichové, u nichž dochází k neustálému vývoji, diferenciaci a nahrazování B lymfocytů z tkáně kostní dřeni, tzv. BM savci (z angl. *bone marrow mammals*). Do této skupiny patří vedle člověka a ostatních primátů také klasický modelový organismus v imunologii – myš (Parra, Takizawa et al. 2013). Druhou skupinu tvoří tzv. GALT savci (z angl. *gut associated lymphoid tissue mammals*), pro něž je typické, že primární B lymfopoéza je koncentrována do specializovaných orgánů umístěných v okolí střeva. Mezi GALT savce se řadí kopytníci, zajícovití, šelmy nebo kytovci (Paul 2008, Parra, Takizawa et al. 2013). Fetální játra jako místo primární B lymfopoézy jsou typická pro BM savce, u GALT savců je přítomnost fetálních jater druhově specifická (ovce, králík) (Parra, Takizawa et al. 2013). Mezi specializované orgány primární B lymfopoézy u GALT savců patří ileální Peyerovy plaky (ovce, tur, kůň, králík, vlk), slepé střevo (králík) či *sacculus rotundus* (králík) (Paul 2008, Parra, Takizawa et al. 2013). Např. Peyerovy plaky nebo slepé střevo jsou přítomny také u BM savců, u nichž slouží jako místo maturace B lymfocytů, ale jejich možná funkce a role v primární B lymfopoéze není plně objasněna.

#### **4.2.1.3 Sekundární lymfatické orgány**

Mezi sekundární (periferní) lymfatické orgány řadíme slezinu, lymfatické uzliny a slizniční (mukózní) lymfatickou tkáň. Sekundární lymfatické orgány hrají klíčovou roli v rozvoji adaptivní imunity, neboť jsou místem kontaktu imunokompetentních buněk s antigeny. Ve tkáni sekundárních lymfatických orgánů dochází ke stimulaci, aktivaci a terminální diferenciaci B lymfocytů do konečných efektorových stadií a k tvorbě protilátkového repertoáru organismu.

Slezina se jako hlavní sekundární lymfatický orgán objevuje u chrupavčitých ryb a paryb. Podobně jako u všech ostatních obratlovců s výjimkou mihulí a sliznatek, které slezinu

nemají, je slezina chrupavčitých ryb bohatě prostoupena cévami a rozdělena na červenou a dobře definovanou bílou pulpu složenou z hutných shluků různých typů lymfocytů. Podobně jako u všech studenokrevných organismů nemá slezina chrupavčitých ryb vytvořenu ani marginální zónu, ani germinální centra (Rumfelt, McKinney et al. 2002, Paul 2008, Parra, Takizawa et al. 2013). Slezina je podobně jako u ostatních obratlovců hlavním místem antigenní stimulace. Peyerovy plaky a lymfatické uzliny nebyly u chrupavčitých ryb popsány, avšak druhově specifická lymfopoetická aktivita byla zaznamenána ve tkáních mozku, oka a ve slizniční tkáni střeva (GALT) některých žraloků (Rumfelt, McKinney et al. 2002).

Kostnaté ryby sledují tento model, avšak v hematopoetické tkáni dřeně sleziny a ledviny u nich byly popsány shluky především makrofágů, v jejichž okolí dochází v období aktivace imunitního systému ke kumulaci lymfocytů (Agius a Roberts 2003, Paul 2008). Tyto elipsovité shluky byly považovány za primitivní zárodečná centra, ale jejich funkce není s funkcí zárodečných center teplokrevných obratlovců homologní (Paul 2008). Kromě těchto elipsovitých shluků, tzv. elipsoidů, je červená pulpa sleziny kostnatých ryb bohatě prostoupena tzv. melanomakrofágovými centry (Agius a Roberts 2003). Jedná se o akumulace pigmentových buněk, makrofágů a lymfocytů, které lze nalézt také ve tkáni pronefrosu, u obojživelníků a plazů také v játrech (Parra, Takizawa et al. 2013). Mezi imunitně významné funkce melanomakrofágových center patří schopnost prezentovat zachycené antigeny lymfocytům, tvorba depositů resistantních intracelulárních bakterií a indukce imunitní odpovědi (Agius a Roberts 2003).

U obojživelníků dochází k rozšíření repertoáru sekundárních lymfatických orgánů. Kromě sleziny s rozlišitelnou červenou a bílou pulpou jsou obojživelníci vybaveni difúzní slizniční imunitou, bez zjevných známek organizace do vyšších celků, a soustavou drobných lymfomyeloidních uzlíků. Lymfopoetická aktivita je u obojživelníků soustředěna také do oblasti ledvin, jater, žaber a mesenteria (Du Pasquier, Robert et al. 2000, Paul 2008, Parra, Takizawa et al. 2013, Colombo, Scalvenzi et al. 2015). Stavba a struktura sekundárních lymfatických orgánů obojživelníků je druhově velmi variabilní, dynamicky se proměňuje během ontogeneze, nepochybný je také vliv sezonality a geografické distribuce druhu (Du Pasquier, Robert et al. 2000, Paul 2008, Parra, Takizawa et al. 2013, Colombo, Scalvenzi et al. 2015).

Plazi mají dobře vyvinutou slezinu s jasně definovanou červenou a bílou pulpou, přesto marginální zóna, periarteriolární (PALS, z angl. *periarteriolar lymphatic sheath*) a

perielipsoidální (PELS, z angl. *perielipsoid lymphatic sheath*) pochva stále nejsou u všech druhů zřetelně vytvořeny (Campbell 2015, Neely a Flajnik 2016). Pokud se u některého z druhů PELS vyskytuje, je ve svém centru tvořen Ig+ B lymfocyty, přičemž na periferii PELS je vysoké zastoupení Ig- lymfocytů, zřejmě T lymfocytů (Neely a Flajnik 2016). Slizniční imunitní systém je difuzní, lokalizovaný ve tkáni trávicí trubice, dýchacích a vylučovacích cest, nevytváří se specializované útvary typu Peyerových plaků, není přítomný ani orgán analogický Fabriciově burse ptáků (Du Pasquier 1992).

Ptáci jsou první taxonomickou skupinou, u které jsou zastoupeny všechny typy sekundárních lymfatických orgánů – slezina, lymfatické uzliny (nejsou přítomny u kura domácího) a slizniční imunitní systém, jež ve tkáni střeva vytváří Peyerovy plaky (Parra, Takizawa et al. 2013). Slezina nemá tak pokročilou vnitřní histologickou stavbu jako mají savci, svou mikroarchitekturou se podobá slezině plazí – je v ní jasně rozlišitelná oblast červené a bílé pulpy, vytvořena marginální zóna, T-dependentní periarteriolární pochva a na B lymfocyty bohatá perielipsoidální pochva, poprvé lze v histologických preparátech detekovat zárodečná centra (Paul 2008, Neely a Flajnik 2016).

U savců rozlišujeme tři funkční typy sleziny podle typu krevní cirkulace (otevřená, uzavřená, smíšená) (Udroiu 2007). U zástupců druhů z řádu ptakořitných či hmyzožravých je zastoupen primitivní typ sleziny s uzavřeným krevním oběhem (Udroiu 2007). U fylogeneticky mladších taxonů došlo k vytvoření sleziny s otevřeným krevním oběhem (tak je tomu například u vačnatců), a vrcholnou fází vývoje sleziny představují dva specializované typy sleziny: slezina sloužící jako zásobník krve, bez přítomnosti krevních splavů, s výrazně vyvinutým trabekulárním systémem a poměrně vyšším zastoupením červené dřene vůči dřeni bílé (šelmy, sudokopytníci, lichokopytníci), a slezina, která plní obrannou funkci, s velmi špatně vyvinutým trabekulárním systémem, s potlačenou schopností uchovávání většího objemu krve, bohatě větveným systémem cévních splavů a významně převyšujícím podílem bílé pulpy vůči červené (opice Starého světa, člověk) (Udroiu 2007).

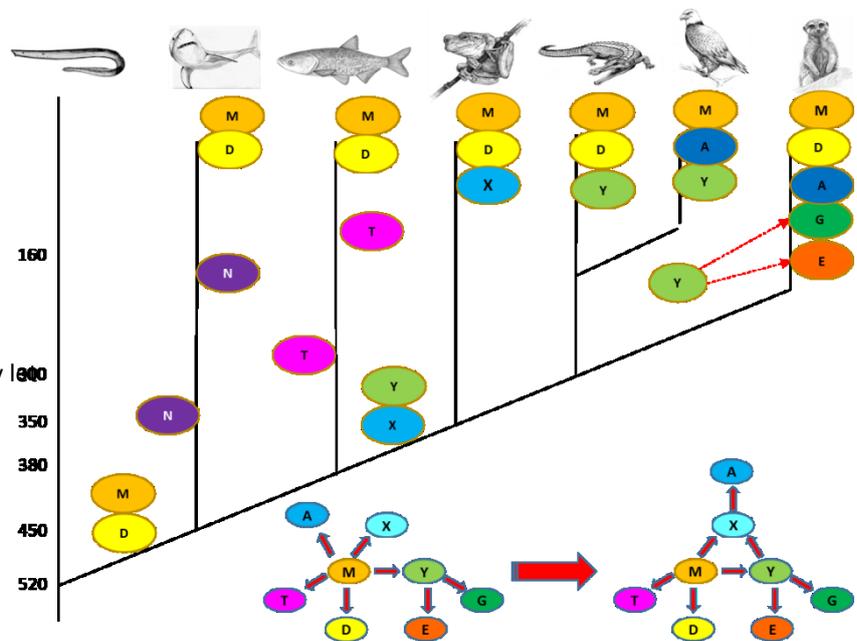
Kromě variability v morfologii a histologické mikroarchitektuře sleziny je vysoká variabilita i u dalších orgánů sekundární lymfopoézy. Ileální Peyerovy plaky jsou považovány za primární lymfatický orgán u tzv. GALT savců, zatím jejich funkce u tzv. BM savců je nejasná, předpokládá se, že by mohly být místem, ve kterém dochází k sekundární maturaci B lymfocytů ve spolupráci s M buňkami (specializované epitelové antigen prezentující buňky ve sliznici tenkého střeva). U zajícovitých je popsána významná participace buněk slepého střeva,

omenta a specializované části střeva v oblasti ileocekální chlopně, *sacculus rotundus*, na diferenciaci B lymfocytárních populací (Udroiu 2007, Parra, Takizawa et al. 2013).

#### 4.2.2 Klíčové znaky humorální adaptivní imunity

Jedním z definičních znaků adaptivní imunity je schopnost specializovaných imunokompetentních buněk – B lymfocytů, produkovat široké spektrum protilátek, imunoglobulinů. Dalším klíčovým znakem je schopnost B lymfocytů projít izotypovým přesmykem (CSR, z angl. *class switch recombination*). Fylogeneticky nejstarší skupinou, u které byl CSR popsán, jsou obojživelníci. Třetí klíčovou roli hraje schopnost organismu vytvářet v lymfatických tkáních zárodečná centra, ve kterých B lymfocyty procházejí sérií zracích procesů – klonální expanzí, somatickou hypermutací, afinitní maturací. Zárodečná centra jsou fylogeneticky relativně mladou strukturou, poprvé jsou detekována u zástupců ze třídy ptáků.

První imunoglobuliny se evolučně objevují u nejstarších zástupců čelistnanců. Stavební prvky a struktura genů se u jednotlivých taxonů příliš neliší, u všech jsou přítomny V, D, J a C segmenty, přesto můžeme na základě stavby imunoglobulin-



Obrázek 1 Fylogeneze těžkých řetězců imunoglobulinů u čelistnanců, převzato z Mashoof, Criscitiello et al. 2016

ových řetězců rozlišit dvě hlavní rodiny: klastrovou (V, D, J segmenty jsou uspořádány do klastrů), a translokonovou. Klastrově organizované geny pro imunoglobuliny mají paryby (jak pro těžký, tak pro lehký řetězec) a kostnatí (lehký řetězec). U všech ostatních taxonů jsou imunoglobuliny kódovány výlučně translokonově organizovanými geny (Pettinello a Dooley 2014).

Z recentně žijících druhů nám pohled do nejstaršího období vzniku a vývoje protilátek poskytují paryby, jejichž první zástupci se na Zemi objevili před asi 500 miliony let. Paryby jsou vybaveny třemi základními typy těžkých řetězců pro imunoglobuliny IgM, IgW a IgNAR, a 4 typy lehkých řetězců –  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\sigma$ ,  $\sigma$ -cart (cart z angl. *cartilaginous*, chrupavčité ryby, též označován jako  $\sigma$ -2) (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014). V literatuře jsou dokumentovány i další typy imunoglobulinů jako IgNARC, IgX, IgR, IgD, jedná se ale vždy o druhové varianty IgW, což je ortolog savčího IgD (Li, Dooley et al. 2012, Smith, Crouch et al. 2012, Pettinello a Dooley 2014).

IgM je nejhojnějším imunoglobulinem u paryb, tvoří asi polovinu všech protilátek v séru. Vyskytuje se ve dvou stechiometrických formách, pentamerní (pIgM) a monomerní (mIgM), které od sebe nejsou vzájemně odvozeny (Pettinello a Dooley 2014). Předpokládá se, že nejsou důsledkem přesmyku, ale produktem odlišné populace B lymfocytů (Hofmann, Greter et al. 2010); mIgM je výhradním membránovým IgM exprimovaným na povrchu B lymfocytů (Parra, Takizawa et al. 2013). IgW, který je ortologem savčího IgD, může vytvářet dvě membránové a až sedm sekrečních forem (Pettinello a Dooley 2014). Přestože o jeho roli v imunitním systému paryb nemáme mnoho poznatků (Parra, Takizawa et al. 2013), na základě jeho vysoké transkripce ve tkáni orgánů primární a sekundární lymfopoézy (Leydigův orgán, epigonální orgán, žábry, brzlík) lze usuzovat, že se může jednat o protein podílející se na rozvoji slizniční imunity (Pettinello a Dooley 2014). Koexprese IgM a IgW na povrchu jednoho B lymfocytu nebyla dokumentována (Parra, Takizawa et al. 2013). U paryb se vyvinul i zcela unikátní imunoglobulin IgNAR (NAR – z angl. *New Antigen Receptor*) (Pettinello a Dooley 2014). Homodimerní IgNAR neobsahuje lehký řetězec IgL, ale je tvořen dvěma těžkými řetězci IgH, které jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky (Hofmann, Greter et al. 2010, Parra, Takizawa et al. 2013). Je možné, že se jedná o funkční analog savčího IgG (Pettinello a Dooley 2014). U klastrově kódovaných imunoglobulinů nemůže docházet k izotypovému přesmyku, přesto byl podobný mechanismus u paryb popsán (Rumfelt, McKinney et al. 2002, Smith, Crouch et al. 2012, Pettinello a Dooley 2014). I přes vysokou rozmanitost imunoglobulinových tříd je látková odpověď paryb ve srovnání s ostatními obratlovci pomalejší (Parra, Takizawa et al. 2013).

U kostnatých ryb byly popsány tři typy translokonově kódovaných těžkých řetězců pro imunoglobuliny IgM, IgD a IgT/Z (T – z angl. *trout*, pstruh; Z - z angl. *zebra fish*, danio), a, podobně jako u paryb, 4 typy klastrově kódovaných lehkých řetězců  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\sigma$ ,  $\sigma$ -cart (Du Pasquier

1992, Anderson, Pant et al. 2004, Litman, Cannon et al. 2005, Rombout, Huttenhuis et al. 2005, Hofmann, Greter et al. 2010, Chen a Cerutti 2011, Uribe, Folch et al. 2011, Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014). IgM, který je nejhojnějším imunoglobulinem v séru, je hlavním hráčem v rozvoji systémové, ale i slizniční imunity v oblasti střeva a kůže (Parra, Rieger et al. 2012); sIgD je secernován jako monomer, a podobně jako je tomu u savců, může být na povrchu B lymfocytu koexprimován společně s IgM (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014). V periferní krvi ryb, jmenovitě u sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*), byly identifikovány populace malých agranulárních IgM+IgD+ B lymfocytů, větších IgM-IgD+ B lymfocytů s plasmablastovou morfologií (Edholm, Bengten et al. 2010) a u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) IgM+IgD- B lymfocyty které regulují povrchovou expresi IgD po antigenní selekci (Pettinello a Dooley 2014). Druhově specifické IgT /IgZ jsou protilátky, jejich funkce není plně pochopena, ale bylo prokázáno, že se v organismu chovají jako protilátky slizniční imunity – ve sliznici střeva se přichytávají na povrch bakterií (Zhang, Salinas et al. 2010). Současně byl popsán i výskyt IgT/Z+ B lymfocytů v kůži některých druhů ryb, což potvrzuje jejich možnou roli v rozvoji slizniční imunity (Zhang, Salinas et al. 2010, Salinas, Zhang et al. 2011). Funkčně se IgT/Z podobá savčímu IgA, avšak k jejich vývoji došlo zřejmě nezávisle konvergentní evolucí (Zhang, Salinas et al. 2010).

Obojživelníci, u nichž jsou imunoglobuliny kódovány pouze translokonově uspořádanými segmenty, jsou první taxonomickou skupinou, u které standardně dochází k izotypovému přesmyku (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014, Colombo, Scalvenzi et al. 2015). K významné proměně humorální imunity dochází během metamorfózy, kdy larvální stadium obojživelníků má látkovou imunitu potlačenou a hlavní imunitní odpověď je zajištěna mechanismy vrozené imunity, po přechodu do dospělého stadia vývoje se význam látkové imunitní odpovědi posiluje.

Repertoár, který tvoří základ pro tvorbu protilátek u obojživelníků, sestává z pěti variant těžkého řetězce pro imunoglobuliny IgM, IgY, IgX, IgD a IgF a tří forem pro tvorbu řetězce lehkého –  $\kappa$ ,  $\lambda$  a  $\sigma$  (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014, Colombo, Scalvenzi et al. 2015). Podobně jako u všech ostatních obratlovců je nejčastější protilátkou IgM, u obojživelníků hexamerní (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014, Colombo, Scalvenzi et al. 2015). Před deseti lety byl u drápatky (*Xenopus tropicalis*) objeven IgD, jehož funkce je zatím nejasná, ale tento imunoglobulin se velmi často vyskytuje na maturovaných IgM+ B lymfocytech, a s ohledem na strukturu genu pro IgD a jeho pozici v genomu, kdy gen

pro IgD naléhá na 3' konci přímo na gen kódující IgM, se zřejmě jedná o homolog savčího IgD (Pettinello a Dooley 2014). U zástupců ocasatých obojživelníků byla popsána dlouhá forma IgD, který se velmi podobá IgD u ptáků a plazů, tento dlouhý IgD by mohl být dokladem společného původu IgD u savců a plazů (Estevez, Garet et al. 2016)

Spolu s IgD byl u drápatek popsán druhově specifický IgF, který není analogem žádného savčího imunoglobulinu, ale během experimentů se prokázalo, že nejvyšší koncentrace IgF i IgD je dokumentována ve slezině těchto žab (Colombo, Scalvenzi et al. 2015). Další druhově specifické analogy IgD produkované zejména během larválního stadia jsou s postupem poznání popisovány i u dalších druhů – IgP u *Pleurodeles Waltl*. V roce 1985 byl v séru u drápatky popsán nový polymer, který byl složen z několika podjednotek vzájemně propojených disulfidickými můstky. Tento multimerní polymer byl označen jako IgX, a bude zřejmě ortologem savčího slizničního IgA (Hsu, Flajnik et al. 1985). Tento předpoklad vychází z pozorování buněčných kultur odvozených z buněk sleziny a střevní mukózy, ve kterých dochází vždy k sekreci IgX (Hsu, Flajnik et al. 1985).

Přestože B lymfocyty obojživelníků neprodukují IgG, podobně jako B lymfocyty ptáků a plazů secernují analogní formu této protilátky – monomerní, pravděpodobně T-dependentní IgY (Du Pasquier, Robert et al. 2000, Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014, Colombo, Scalvenzi et al. 2015). IgY se ve vysokých koncentracích nachází ve tkáni střeva, což by mohlo svědčit o jeho významu ve slizniční imunitě (Colombo, Scalvenzi et al. 2015). Estevez, Garet et al. (2016) popsali u *Nanorana parkeri* dva typy IgY, o němž se již dříve předpokládalo, že by mohl být společným fylogenetickým předkem IgG a IgE (Pettinello a Dooley 2014). Současně byla u obojživelníků popsána velice slabá afinitní maturace a AID mediovaná somatická hypermutace, avšak zatím pouze u žab druhu *Xenopus tropicalis* (Parra, Takizawa et al. 2013, Pettinello a Dooley 2014, Estevez, Garet et al. 2016).

U plazů byly popsány čtyři hlavní třídy těžkých řetězců IgM, IgD, IgY a IgA (IgA-like) spolu se dvěma typy lehkých řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$ . IgM je hlavním typem protilátky v séru a současně je dosud jediným povrchovým imunoglobulinem popsáným u plazů, s nejvyšší koncentrací naměřenou v periferní krvi a slezině (Pettinello a Dooley 2014). U recentních druhů plazů byly popsány dva typy IgD, IgD a IgD2, přičemž druhý jmenovaný zřejmě vznikl částečnou duplikací genu pro IgD (Pettinello a Dooley 2014). Přítomnost IgD2 byla prokázána zatím pouze u některých druhů gekonů, želv a krokodýlů (Parra, Rieger et al. 2012), u gekona byla jeho nejvyšší koncentrace zaznamenána v játrech, kloace a sliznici střeva, což by svědčilo

o možné funkci IgD2 jako slizničního imunoglobulinu. (Pettinello a Dooley 2014). Exprese IgD na povrchu B lymfocytů nebyla u plazů zatím popsána (Parra, Takizawa et al. 2013). Plazí B lymfocyty tvoří sekreční IgY, dosud byly popsány tři formy IgYA, IgYB a IgYC), o jehož funkci není známo téměř nic, zajímavé je, že jej matka předává embryu prostřednictvím žloutkového vajíčka (Parra, Takizawa et al. 2013), přičemž podobný mechanismus přechodu protilátek byl popsán u ryb pro IgM a u paryb pro IgNAR.

Při studiích protilátkové odpovědi ptáků byly popsány tři skupiny imunoglobulinů IgM, IgA a IgY (IgG) homologních k savčím typům. IgY je v literatuře zahrnován do skupiny IgG, které je i funkčně podobný, ale bližší sekvenční studie ukázaly, že strukturně se jedná o fylogeneticky samostatnou, savčímu IgG a IgE strukturně podobnou molekulu (Mashoof, Criscitiello et al. 2016, Parra, Rieger et al. 2012). Analogicky jako u ostatních skupin obratlovců je hlavním imunoglobulinem primární odpovědi v séru IgM, jehož hladiny se přechodně zvyšují v období bezprostředně následujícím vystavení organismu antigenu. Hlavním izotypem zachyceným v rámci sekundární odpovědi je IgY, který je tvořen doménami V1 a C1 – C4. Monomerní forma IgY byla popsána u kura domácího, u kachnovitých jsou známy dva typy IgY. IgY podobný kurovitým, a zkrácený IgY (též označovaný jako IgY( $\Delta$ Fc)), který je sestaven z domény V, C1 a C2. Tento zkrácený IgY byl popsán pouze u vodních ptáků řádu vrubozubých (*Anseriformes*), a podobná forma IgY byla zdokumentována u některých typů želv (Magor et al. In Davison, Kaspers et al. 2011). Nejhojnější protilátkou v ostatních tělních tekutinách, především ve žluči, je IgA. Ptačí IgA může mít podobu trimeru nebo tetrameru, a je tak větší než dimerní IgA savců (Magor et al. In Davison, Kaspers et al. 2011). Až do nedávné doby se předpokládalo, že ptáci nejsou vybaveni IgD. Han, Yuan et al. v roce 2016 publikovali práci věnovanou sekvenční analýze genomu pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*), u nějž byl popsán funkční gen  $\delta$ , který kóduje těžký řetězec membránového IgD složeného ze sedmi C<sub>H</sub> domén. Zároveň prokázali, že gen  $\delta$  chybí pouze u některých druhů ptáků, paradoxně u zástupců nejlépe probádaných skupin (*Galliformes*, *Anseriformes*).

Vzhledem k přítomnosti pouze jednoho lehkého řetězce Ig $\lambda$  je u ptáků významně omezená variabilita protilátek produkovaných v rámci VDJ rekombinace. Rozšíření protilátkového repertoáru probíhá pomocí mechanismu somatické genové konverze zprostředkované AID (Magor et al. In Davison, Kaspers et al. 2011).

U většiny savců se tvoří imunoglobuliny pěti tříd: IgM, IgD, IgA, IgG a IgE. Výjimku tvoří králík domácí, u nějž nebyl dosud objeven IgD, zato disponuje baterií 13 podtříd IgA

(Schneiderman, Hanly et al. 1989), a vačnatci. Odchytky v distribuci jednotlivých imunoglobulinových typů se liší mezi BM a GALT savci v závislosti na preferenčním využití lehkých řetězců  $\kappa$  a  $\lambda$ , přičemž platí, že GALT savci hojněji využívají řetězec  $\lambda$ , u myši, člověka a prasete převažuje využití řetězce  $\kappa$ . Hlavní imunoglobulinovou třídu představuje IgM, který je zastoupen u všech savců jako protilátka primární imunitní odpovědi. Může nabývat formu pentameru nebo hexameru. Mezdiruhové rozdíly nejsou markantní.

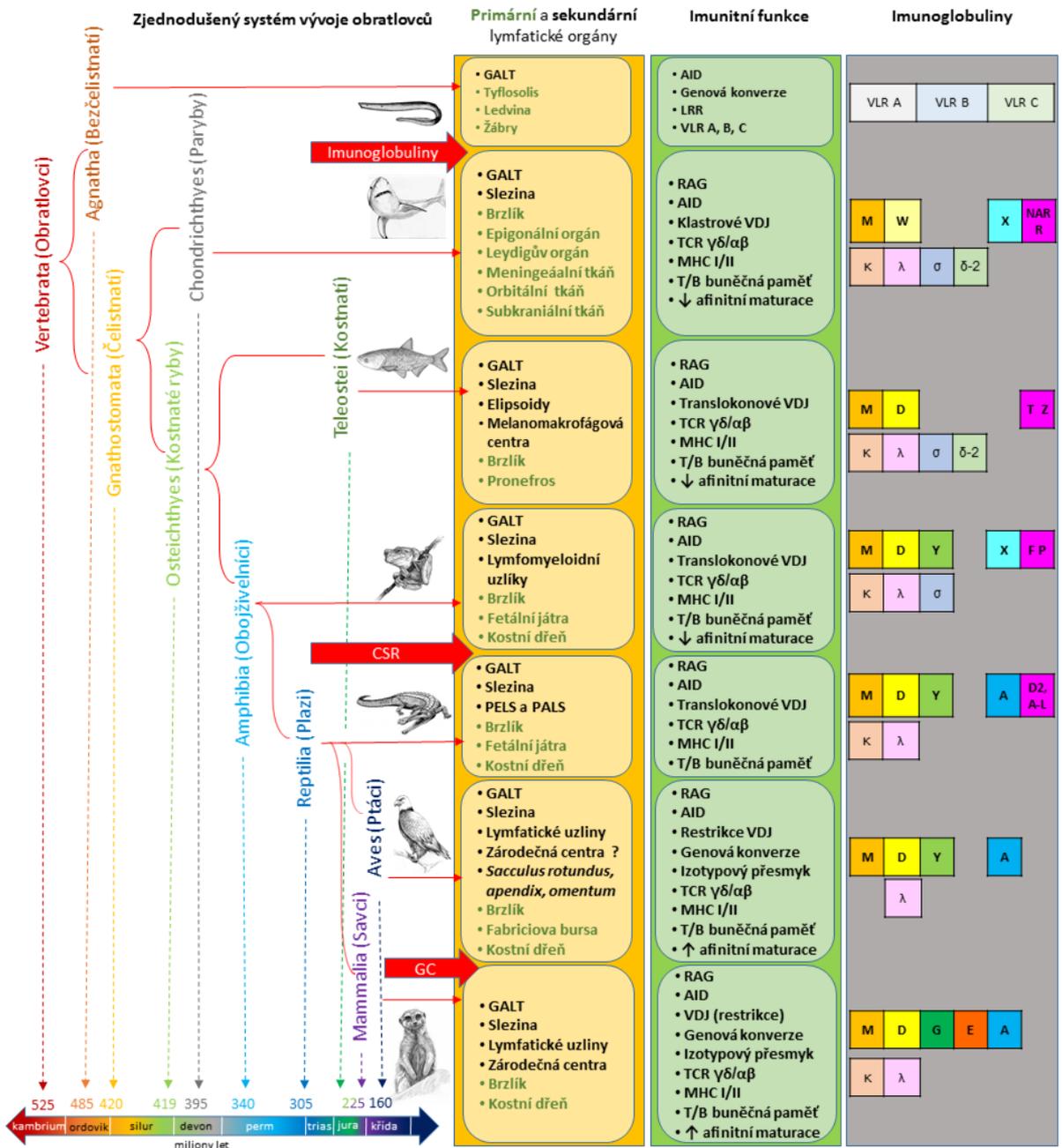
Imunoglobulin D byl objeven relativně pozdě – popsán byl v roce 1965 u myši a člověka, krátce na to i u dalších primátů (Rowe a Fahey 1965, Rowe a Fahey 1965), jeho mezdiruhová diverzita je vysoká (Rogers, Richardson et al. 2006). IgD na naivních B lymfocytech funguje jako antigenní receptor, na maturovaných B lymfocytech je koexprimován spolu s IgM, což je způsobeno alternativním sestřihem exonů řetězce  $\sigma$  a  $\mu$  (Parra, Takizawa et al. 2013). Kromě membránové formy je zastoupen i v séru, ovšem ve velmi nízkých koncentracích. Po kontaktu s antigenem se preferenčně exprimuje řetězec  $\mu$ , zatímco transkripce  $\sigma$  je potlačena (Parra, Takizawa et al. 2013). Evolučně se jedná zřejmě o velmi starou molekulu (byl popsán u zástupců ryb) (Rogers, Richardson et al. 2006). Jeho funkční vlastnosti nejsou plně pochopeny, zdá se však, že vstupuje do procesu afinitní maturace (u IgD deficientních myši probíhá AM pomaleji) (Rogers, Richardson et al. 2006), zároveň byla popsána jeho role ve slizniční imunitě, kdy byla zaznamenána schopnost IgD vázat se na bakterie a jejich produkty a vyvolání prozánětlivé odpovědi prostřednictvím komunikace s bazofily a žírnými buňkami (Parra, Takizawa et al. 2013).

V séru savců je nejhojněji zastoupen IgG, malá monomerní molekula, která velmi dobře prostupuje do extravaskulárního prostoru a z imunoglobulinů má nejdelsí poločas rozpadu. Z fylogenetických studií lze dovodit, že IgG je příbuzný IgY. Jeho variabilita u jednotlivých prozkoumaných druhů je rozsáhlá. Může nabývat mnoha aloforem, a tak u člověka či myši je zastoupen čtyřmi hlavními podtřídami G1 – G4, ale například u koní bylo popsáno sedm podtříd G1 – G7, přičemž jejich efektorové funkce nejsou shodné (Butler 1997, Parra, Takizawa et al. 2013). Mezi hlavní efektorové funkce patří schopnost aktivace klasické cesty komplementu, neutralizace toxinů, vstupuje do rozvoje hypersenzitivních reakcí. Jeho velikost mu umožňuje snadný pohyb mezi tkáněmi, proto je jediným imunoglobulinem, který může prostupovat placentou a přecházet z těla matky do těla plodu – popsáno kromě člověka u myši, kočky a psa (Butler 1997). Současně je IgG protilátkou, která je nejhojněji zastoupena v pasivním transferu protilátek z matky na potomka - v kolostru velkých savců jako jsou koně,

krávy či prasata je IgG dominantní protilátkou, na rozdíl od člověka či myši, u kterých v kolostru převládá IgA (Butler 1997, Parra, Takizawa et al. 2013).

Hlavní protilátkou savčí slizniční imunity je IgA (Woof a Kerr 2004). Zároveň se nachází v relativně vysokých koncentracích v séru různých druhů savců, přičemž jeho efektorové funkce jsou druhově odlišné (Woof a Kerr 2004). Jednotlivé druhy mají rozdílné zastoupení podtříd, zatímco u většiny savců je přítomna pouze jedna podtřída IgA, u člověka a jemu podobných velkých lidoopů s výjimkou orangutana jsou to dvě podtřídy IgA1 a IgA2, a u králíka bylo popsáno podtříd 13 (Schneiderman, Hanly et al. 1989). IgA se vyskytuje ve formě monomeru nebo dimeru, přičemž je zajímavě, že u většiny savců je sérová forma IgA dimerní, pouze u člověka je monomerní (Woof a Kerr 2004). Sočástí sekrečního IgA (sIgA) je u všech savčích druhů na dimerní IgA kovalentně napojená sekreční komponenta. Hlavní role sIgA je protizánětlivá, chrání slizniční povrchy před infekcí vnějšími i vnitřními patogeny (Parra, Takizawa et al. 2013). Významnou roli má pasivní transfer IgA z matky na potomka u primátů a hlodavců, u nichž je IgA hlavní protilátkou zastoupenou v kolostru. Přestože u velkých savců jako je prase a kůň je hlavní protilátkou v kolostru IgG, v mléce dominuje IgA (Butler 1997).

Posledním typem protilátky, který se nachází výlučně u savců, je IgE, který byl popsán na konci 60. let 20. stol (Johansson 2011, Johansson 2016). Strukturně se jedná o protilátku podobnou plazímu a ptačímu IgY (Mashoof, Criscitiello et al. 2016), jejíž hlavní funkce spočívá v aktivaci bazofilů a žírných buněk (váže se na FcεRI) (Parra, Takizawa et al. 2013). Podle některých teorií je primární protilátkou v odpovědi proti parazitárním infekcím organismu (Johansson 2011, Parra, Takizawa et al. 2013). Mezi IgY a IgE existuje i určitá funkční podobnost, neboť IgY může podobně jako IgE vyvolat anafylaktickou reakci organismu (Ballantyne 2008, Noli, Foster et al. 2013). Vzhledem k tomu, že IgE je schopný detekovat a reagovat na přítomnost minimálního množství antigenního proteinu, lze podtrhnout jeho roli jako sentinelu, který spustí prvotní imunitní alarm vedoucí k nástupu imunitní odpovědi zprostředkované dalšími protilátkami a specializovanými buňkami (Johansson 2011). I s ohledem na to, že masivní imunitní odpověď zprostředkovaná IgE může vést až k destrukci organismu (např. vyvoláním anafylaktického šoku), jeví se jako možná teorie, že k funkčnímu oddělení IgE od IgY a IgG došlo z protektivních důvodů (Mashoof, Criscitiello et al. 2016, Parra, Takizawa et al. 2013, Johansson 2016).



Obrázek 2 Přehled fylogeneze složek adaptivního imunitního systému u obratlovců. GALT – střešní slizniční imunitní systém; AID – aktivací indukovaná cytidin deamináza; RAG – rekombinaci aktivující gen; LRR – na leucin bohaté repetice; TCR – T buněčný receptor; MHC – hlavní histokompatibilní komplex; VLR – variabilní lymfocytový receptor; CSR – izotypový přesmyk; GC – zárodečné centrum; PALS – periarteriální pochva; PELS – perielipsoidální pochva; A-L – A-Like Ig. Pro vytvoření přehledu byly použity následující práce Agius a Roberts (2003), Boehm a Bleul (2007), Paul (2008), Hofman, Greter et al. (2010) Parra, Rieger et al. (2012), Parra, Takizawa et al. (2013), Pettinello a Dooley (2014). Obrázky v rámci licence Creative Commons získány pomocí služby Bing.

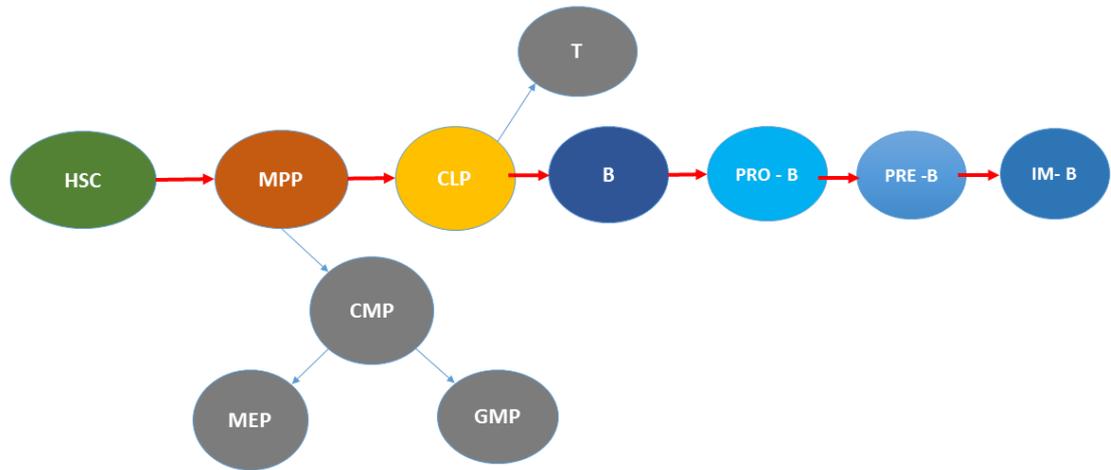
### 4.3 Ontogeneze B lymfocytů u člověka

B lymfocyty se objevují během raných fází embryonálního vývoje a jejich tvorba se udržuje v průběhu celého života jedince. Proces lymfopoézy lze rozdělit z ontogenetického hlediska na embryonální lymfopoézu, fetální lymfopoézu a postnatální lymfopoézu. Časná lymfopoéza je multifokální, primárním místem embryonálního vývoje B lymfocytů je žloutkový váček, odkud se lymfopoéza postupně přesouvá do jiných orgánů. Během fetálního vývoje se primárním lymfoidním orgánem stávají fetální játra, (pre-B lymfocyty jsou přítomny od 7. až 8. gestačního týdne), fetální omentum (pre-B lymfocyty pospány kolem 10. gestačního týdne), od 20. týdne se prekursori B lymfocytů a nezralé lymfocyty objevují ve slezině, paraaortálních uzlinách, ledvině, plicích a kostní dřeni (LeBien 2000, LeBien a Tedder 2008, Naradikian, Scholz et al. 2014). Ve druhé polovině gestace se lymfopoetická aktivita jater a sleziny utlumuje, a hlavním lymfoidním orgánem se stává kostní dřeň.

Vývoj vlastních B lymfocytů lze rozdělit do dvou vzájemně navazujících fází. Primární období vývoje, které je nezávislé na přítomnosti antigenu, během něhož dochází k tvorbě nezralého (naivního) B lymfocytu. Podle anatomické lokalizace v primárních lymfoidních orgánech – fetálních játrech či v kostní dřeni – se toto období též nazývá centrální. V momentě, kdy naivní B lymfocyt opouští kostní dřeň a dostává se do sekundárních lymfatických orgánů, zejména sleziny, ve kterých se po kontaktu s antigenem dokončuje proces maturace a diferenciací B lymfocytu, hovoříme o periferním vývoji B lymfocytů.

#### 4.3.1 Centrální vývoj

Podle klasického modelu lymfopoézy, v němž se pracuje s konceptem striktně odděleného vývoje myeloidní a lymfoidní line buněk, jsou populace B lymfocytů prostřednictvím společného lymfoidního předka (CLP, z angl. *common lymphoid progenitor*) odvozeny od hematopoetických kmenových buněk (HSC, z angl. *hematopoietic stem cell*), viz Obrázek 3 na straně 26. Podle tohoto modelu dává CLP kromě B lymfocytů vzniknout i ostatním elementům imunitního systému – T lymfocytům, NK buňkám a dendritickým buňkám (LeBien 2000, Adolfsson, Mansson et al. 2005).



Obrázek 3 Obecně přijímaný model centrální lymfopoézy (Adolfsson, Mansson et al. 2005), upraveno; vysvětlivky: HSC: hematopoietic stem cell, hematopoetická kmenová buňka; HSC-LT: long term hematopoietic stem cell, dlouhodobá hematopoietická kmenová buňka; HSC-ST short term hematopoietic stem cell - krátkodobá hematopoietická kmenová buňka; MPP: myeloid pluripotent progenitor - pluripotentní progenitor myeloidní linie; CMP: common myeloid progenitor – společný myeloidní progenitor; MEP: megakaryocyte–erythroid progenitor cell, progenitorová buňky megakaryocytů a erytrocytů; GMP: granulocyte-macrophage progenitor, progenitorová buňka granulocytů a makrofágů; CLP: common lymphoid progenitor, společný lymfoidní progenitor; T: T lymfocyt; B: B lymfocyt; Pro-B: Progenitorový B lymfocyt; Pre-B: prekurzorový B lymfocyt; IM-B: nematurovaný B lymfocyt

S postupujícím poznáním se podařilo prokázat, že B lymfocytární populace u člověka, podobně jako u myši, není homogenní. Funkčně i ontogeneticky lze odlišit dvě samostatné linie B lymfocytů, B1 (asi 5 % všech B lymfocytů) a B2 lymfocyty. Tyto populace lymfocytů zřejmě vznikají z odlišných progenitorů a jejich tvorba probíhá ve vlnách (Montecino-Rodriguez a Dorshkind 2012). Přestože první informace o tom, že vedle linie konvenčních lymfocytů (označovaných B2) existuje i CD5+ subpopulace B lymfocytů (označovaných jako B1), byly publikovány v roce 1980 (Wang, Good et al. 1980), na potvrzení jejich přítomnosti u člověka se čekalo více než 30 let.

První důkazy publikovali Griffin, Holodick et al. (2011), kteří ve vzorcích izolovaných z pupečnickové krve novorozenců a z periferní krve dospělých popsali zcela samostatnou populaci B1 lymfocytů s imunofenotypem CD20+CD27+CD43+CD70.

#### 4.3.1.1 B1 a B2 lymfocyty

Pokud bychom stručně charakterizovali B1 B lymfocyty, pak se jedná o minoritní populaci CD5+/- buněk, které vznikají v kostní dřeni a osidlují peritoneální a pleurální dutinu vyvíjejícího se plodu. V závislosti na míře exprese molekuly CD5 se rozlišují dvě subpopulace – B1a (CD5+) a B1b (CD5-) populace. Jejich tvorba z kostní dřene je zřejmě zachována i postnatálně (Hardy, Li et al. 2000, Carsetti, Rosado et al. 2004, Hardy 2006, Tung, Mrazek et

al. 2006, Baumgarth 2011, Yoshimoto, Montecino-Rodriguez et al. 2011, Montecino-Rodriguez a Dorshkind 2012, Parra, Rieger et al. 2012). Předpokládá se, že hlavním zdrojem postnatální tvorby B1 lymfocytů je jejich sebeobnova ve vhodném prostředí sleziny. B1 lymfocyty se zřejmě nepodílejí na vzniku imunitní paměti, nedávají vzniknout paměťovým buňkám (Kantor a Herzenberg 1993, Allman a Pillai 2008, Naradikian, Scholz et al. 2014).

Během somatické hypermutace se u nich objevuje minimální množství nukleotidových substitucí. Hlavním produkovaným izotypem s vysokou mírou spontánní produkce je přirozený (polyreaktivní) IgM. B1 lymfocyty jsou nezávislé na T-buněčné pomoci (Hardy 2006, Tung, Mrazek et al. 2006). Antigenní receptory B1 lymfocytů jsou schopny rozeznávat sacharidy, lipidy a lipoproteiny, předpokládá se jejich podíl na adaptivních reakcích. Mezi významné vlastnosti B1 lymfocytů patří schopnost fagocytózy a mikrobicidní aktivita (Parra, Rieger et al. 2012). Sledované subpopulace B1 lymfocytů byly schopné efektivně prezentovat antigeny pocházející z fagocytovaných bakteriálních částic CD4<sup>+</sup> T lymfocytům. Tyto vrozené schopnosti B1 lymfocytů svědčí o jejich funkční, vývojové a evoluční blízkosti s makrofágy (Parra, Rieger et al. 2012), a zároveň dokládají skutečnost, že hranice mezi vrozenou a adaptivní imunitou není ostrá, ale představuje plynulý přechod (Kvell, Cooper et al. 2007). B1 B lymfocyty jsou schopné spontánní sekrece IgM, procházejí minimálním množstvím somatických hypermutací a mají velice omezený repertoár protilátek, který směřuje proti velice úzkému spektru antigenů (Griffin, Holodick et al. 2011).

Oproti tomu konvenční B2 lymfocyty, které představují hlavní zdrojovou populaci B lymfocytů, jsou ve vyšší míře produkovány až postnatálně. Vznikají novotvorbou z prekurzorů odvozených od HSC v kostní dřeni, přičemž k jejich dozrávání dochází v periférii, v sekundárních lymfatických orgánech, jakými jsou např. slezina a lymfatické uzliny. Na rozdíl od B1 lymfocytů je spontánní tvorba protilátek velmi omezená, dominantním izotypem je IgG. Pro B2 lymfocyty je typická variabilita V regionu a rozsáhlé N-regiony ve VDJ spojích genu pro imunoglobulin.

#### **4.3.1.2 Vývojová stadia B lymfocytu v primárních lymfatických orgánech**

Nomenklatura jednotlivých vývojových stupňů během centrálního vývoje není jednotná, a u jednotlivých autorů prací se liší. V dalším textu jsou použity termíny základních vývojových období, tedy progenitorový B lymfocyt (Pro-B lymfocyt), prekurzorový B lymfocyt (Pre-B lymfocyt) a nezralý B lymfocyt. Klíčovými ději, které probíhají na centrální

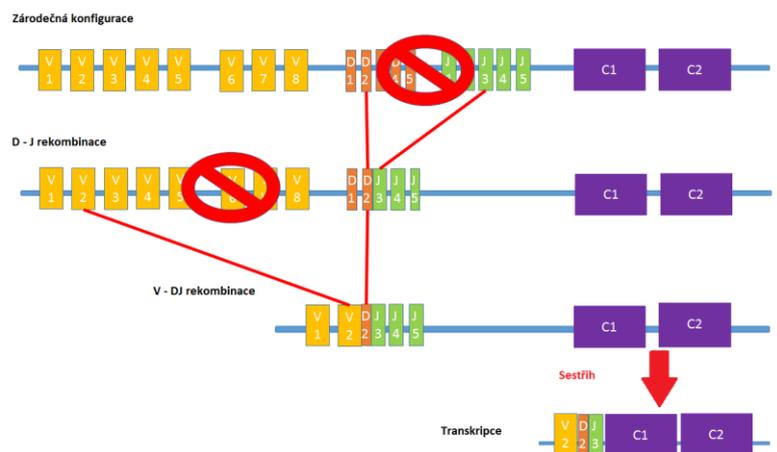
úrovni vývoje B lymfocytu, patří V(D)J rekombinace a tvorba funkčního B buněčného receptoru (BCR, *B-cell receptor*).

#### 4.3.1.2.1 V(D)J rekombinace

Imunoglobuliny všech tříd jsou složeny ze dvou typů řetězců. Lehkého řetězce IgL a těžkého řetězce IgH. Těžký řetězec imunoglobulinu je kódován komplexem genů, které se nacházejí v lokusu na dlouhém raménku chromozomu 14. V tomto lokusu můžeme rozlišit početné oblasti, které kódují V-úsek (variabilní úsek, z angl. *variable segment*), D-úsek (z angl. *diversity segment*) a J-úsek (spojovací, z angl. *joining segment*) a C-úsek (konstatní oblast, z angl. *constant region*) těžkého řetězce (stavba lehkého řetězce je podobná, chybí jim však D-úsek) (Janeway 2001, Hořejší, Bartůňková et al. 2013).

V(D)J rekombinace je mechanismus, při kterém dochází k náhodnému přeskupení genových segmentů a vytvoření funkčních genů kódujících proteiny nezbytných pro správné fungování imunitního systému. Na podkladě V(D)J rekombinace vzniká rozsáhlé množství jedinečných molekul, které realizují imunitní odpověď proti alogenním i autogenním antigenům (Janeway 2001, Hořejší, Bartůňková et al. 2013).

V průběhu V(D)J rekombinace dochází k vystřížení rozsáhlých, nadbytečných V, D a J úseků tak, aby ve finální fázi pro správnou funkci genu zůstal zachován vždy od každého právě jeden. Rekombinace subgenových úseků V, D a J je řízená mnoha enzymy, klíčovými hráči jsou enzymy RAG1 a RAG2 rozpoznávající tzv. RSS oblast (rekombinační signální sekvence, z angl. *recombination signaling sequence*) a terminální deoxynukleotidyltransferáza (TdT). RSS sekvence naléhají na genové úseky, které se mohou rekombinovat. Jsou tvořeny evolučně konzervativními, na AT bohatými heptamery a nonamery (Janeway 2001, Hořejší, Bartůňková et al. 2013).

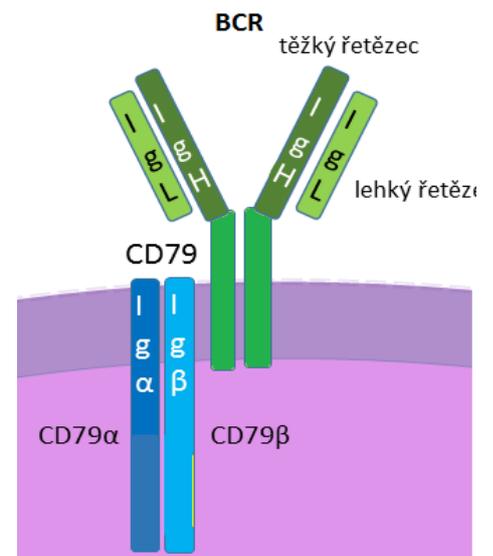


Obrázek 4 Schematické znázornění VDJ rekombinace podle Janeway (2001)

V průběhu rekombinace dojde na obou chromozomech za účasti enzymového komplexu RAG1 a RAG2 k rozštěpení vlákna DNA v místě tzv. spaceru oblasti RSS, k vytvoření signálu a vystřížení oblasti DNA ležící mezi spojovanými RSS oblastmi. Vytvoření funkčního VDJ produktu na jednom chromozomu vede k alelické exkluzi, tedy zastavení VDJ rekombinace, na druhém homologním chromozomu, viz Obrázek 4, na straně 28 (Janeway 2001, Hořejší, Bartůňková et al. 2013).

#### 4.3.1.2.2 B buněčný receptor (BCR)

B buněčný receptor (BCR, z angl. *B-cell receptor*), který najdeme na povrchu B lymfocytů, je tvořen komplexem transmembránových proteinů. Tento transmembránový komplex je složen ze dvou oddílů, vlastního membránového imunoglobulinu a asociovaných signalizačních molekul. První oddíl BCR tvoří v membráně vázaný imunoglobulin, jehož izotypová třída záleží na stupni maturace B lymfocytu. Funkčně se neliší od sekrečních protilátek, odlišná je jeho struktura – na rozdíl od sekrečních imunoglobulinů obsahuje kromě dvou H řetězců a dvou L řetězců také



integrální membránovou doménu. Druhý oddíl BCR tvoří molekula CD79, heterodimer dvou transmembránových proteinů CD79a a CD79b, viz Obrázek 5.

#### 4.3.1.3 Progenitorové B lymfocyty

V obecně přijímaném modelu lymfopoézy (viz Obrázek 3 na straně 26) jsou progenitory B lymfocytů odvozeny od CLP (z angl. *common lymphoid progenitor*). Na základě exprese povrchových molekul můžeme v tomto období rozlišit dvě populace B lymfocytů. Během období prekurzoru progenitoru B lymfocytu (dále jen Pre-Pro-B lymfocyt) ještě nedošlo k iniciaci somatické rekombinace těžkého řetězce imunoglobulinu. Pre-Pro-B lymfocyt na svém membráně nese skupinu typických selektivních povrchových znaků, exprimuje molekulu CD34, CD10 (membránovou metaloendopeptidázu), CD43 (sialoforin), CD90 (povrchový glykoprotein THY-1) a Ly6d (lokus D). Zatím u něj nelze detekovat typickou molekulu CD19, CD20 ani CD25. Jsou již přítomny hlavní transkripční faktory E2A (transkripční faktor 3) a EBF (*early B cell factor 1*), cytokiny c-KIT (*kit oncogene*), a IL-7R (*interleukin 7 receptor*)

(LifeMap 2016). Mezi další proteiny, které jsou přítomny, ale nejsou selektivním identifikačním znakem, patří CD135 (FMS-like tyrosin kináza3), Gfi1 (*growth factor independent 1*), Ikarf1 (*IKAROS family zinc finger 1*), PU.1 (*spleen focus forming virus proviral integration oncogene*) a mnohé další (LifeMap 2016).

Pre-Pro B lymfocyty dávají vzniknout časnému progenitoru B lymfocytu (časný Pro-B lymfocyt). V období časného Pro-B lymfocytu je zahájena somatická rekombinace IgH přeskupením  $D_H - J_H$  segmentů, na níž plynule navazuje období pozdního Pro-B lymfocytu charakterizované spojením  $V_H$  a přeskupeného  $D_H J_H$ . Na povrchu Pro-B lymfocytů se objevuje typická molekula CD19, která však ještě není selektivním znakem. Těmi naopak jsou molekuly CD34, CD43, CD93, CD10 (membránová metaloendopeptidáza), B220 (protein tyrosinofosfatáza) a intracelulární TdT (DNA nukleotidylexotransferáza) (LifeMap 2016). Exprimují se chemokiny a transkripční faktory jako u Pre-Pro-B lymfocytu, na scénu však vstupují geny pro enzymy RAG1 a RAG2, bez nichž by nebylo lze zahájit somatickou rekombinaci.

#### 4.3.1.4 Prekurzorové B lymfocyty

Pozdní Pro-B lymfocyt, který prošel úspěšnou přestavbou IgH, musí projít prvním kontrolním bodem. Během průchodu prvním kontrolním bodem jsou odfiltrovány pouze ty buňky, u kterých došlo k vytvoření funkčního VDJ produktu, ostatní jsou nasměrovány k apoptóze (Melchers 2015). Pro-B lymfocyt s funkčním těžkým řetězcem se stává prekurzorovým B lymfocyt (Pre-B lymfocyt). Ten na svém povrchu exprimuje tzv. Pre-BCR (z angl. *pre-B-cell receptor*), složený z těžkého řetězce, náhradního lehkého řetězce a molekul CD79a a CD79b. Náhradní lehký řetězec (z angl. *surrogate light chain*) je tvořen proteiny kódovanými geny  $V_{preB}$  a  $\lambda 5$  (Melchers, Karasuyama et al. 1993). Pre-B lymfocyty během svého vývoje procházejí dvěma vývojovými fázemi, obdobím velkého Pre-B lymfocytu a obdobím malého Pre-B lymfocytu. Velké Pre-B lymfocyty jsou ranějším stupněm a jsou charakterizovány přítomností povrchového pre-BCR a opakovanou proliferací. Selektivními molekulami jsou CD10 a CD43, vyhasíná exprese molekuly CD34 (LifeMap 2016).

Poté, co u velkého Pre-B lymfocytu dojde k reaktivaci genu pro RAG1 a RAG2, dojde k zahájení rekombinace lehkého řetězce imunoglobulinu (IgL) a buňka se stává malým Pre-B lymfocyt. Během tohoto přechodu projde buňka druhým kontrolním bodem, kdy je testována funkčnost Pre-BCR a z dalšího vývoje jsou odstraněny všechny velké Pre-B lymfocyty



Děje probíhající během centrální fáze vývoje B lymfocytu souhrnně znázorňuje Obrázek 6, na straně 31.

### 4.3.2 Periferní vývoj

Periferní lymfopoéza je obdobím, kdy nematurovaná stadia B lymfocytů opouštějí primární lymfatický orgán, kostní dřeň, a migrují směrem k sekundárním orgánům, kde se finalizuje jejich diferenciací. V rámci periferní lymfopoézy můžeme rozlišit tři hlavní vývojové fáze. První rané období, kdy se B lymfocyt nachází v naivním nematurovaném stadiu (stadium tranzientního B lymfocytu), intermediární, kdy hovoříme o naivních maturovaných lymfocytech (B lymfocyty marginální zóny, folikulární lymfocyty a B1 B lymfocyty), a terminální stadium, kdy B lymfocyt po aktivaci antigenem získává efektorové funkce a dokončuje proces své diferenciací (paměťové B lymfocyty, plazmatické buňky).

#### 4.3.2.1 Nematurované B lymfocyty

##### 4.3.2.1.1 Tranzientní B lymfocyty

Tranzientní lymfocyty představují spojovací článek mezi centrálním vývojem B lymfocytů v kostní dřeni a periferním vývojem v sekundárních lymfatických orgánech. Základní definiční vlastností tranzientních lymfocytů je migrace z primárního lymfatického orgánu do míst sekundární lymfopoézy. Ukazuje se, že se jedná o vysoce heterogenní skupinu migrujících buněk s významnými fenotypovými a funkčními odlišnostmi (Chung, Silverman et al. 2003). Z celkového objemu IgM<sup>+</sup> B lymfocytů, které se denně vytvoří v kostní dřeni, projde kontrolním bodem při výstupu z kostní dřene do periferie asi jen 10 %, a asi jen jedna třetina těchto buněk dozraje do maturovaných B lymfocytů (Chung, Silverman et al. 2003). Ostatní buňky jsou v důsledku např. poruchy signalizace BCR nebo vysoké míry autoreaktivity nasměrovány k apoptóze. Přejít do maturovaných vývojových stadií bývá označován jako kontrolní bod negativní selekce (Palanichamy, Barnard et al. 2009, Melchers 2015).

Tranzientní buňky se u člověka vyskytují v kostní dřeni, periferní krvi a ve slezině (Palanichamy, Barnard et al. 2009). Loder, Mutschler et al. (1999) rozlišili na myším modelu v závislosti na expresi povrchových znaků IgM, IgD, CD21 a CD23 dvě samostatné subpopulace tranzientních lymfocytů: tranzientní B lymfocyty typ 1 (dále jen T1) s imunofenotypem IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup>CD21<sup>low</sup>CD23<sup>low</sup> a tranzientní B lymfocyty typ 2 (dále jen T2) s imunofenotypem IgM<sup>high</sup>IgD<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup>CD23<sup>int</sup>, přičemž vyházeli z předpokladu, že T1 B lymfocyty jsou vývojově ranějším předchůdcem T2 B lymfocytů (doložitelné na míře exprese

molekul IgD). Studie na člověku přinesly poznatky o vysoké míře exprese povrchových molekul CD24, CD38 a CD10 u tranzientních B lymfocytů (Palanichamy, Barnard et al. 2009). Podobně jako u myšního modelu lze u člověka rozlišit populace T1 a T2 lymfocytů. Allman, Lindsley et al. (2001) se zaměřili na přítomnost vývojového identifikačního znaku AA4 a variabilní míru exprese molekuly IgM a CD23 a definovali tři populace tranzientních lymfocytů, T1 B lymfocyty AA4<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>IgM<sup>high</sup>, T2 lymfocyty AA4<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>IgM<sup>high</sup> a T3 lymfocyty AA4<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>IgM<sup>low</sup>. Populace T3 B lymfocytů však vykazovala vysokou míru anergie a jejich objev a vymezení jako samostatné populace tranzientních buněk se nasetkal s kladným přijetím.

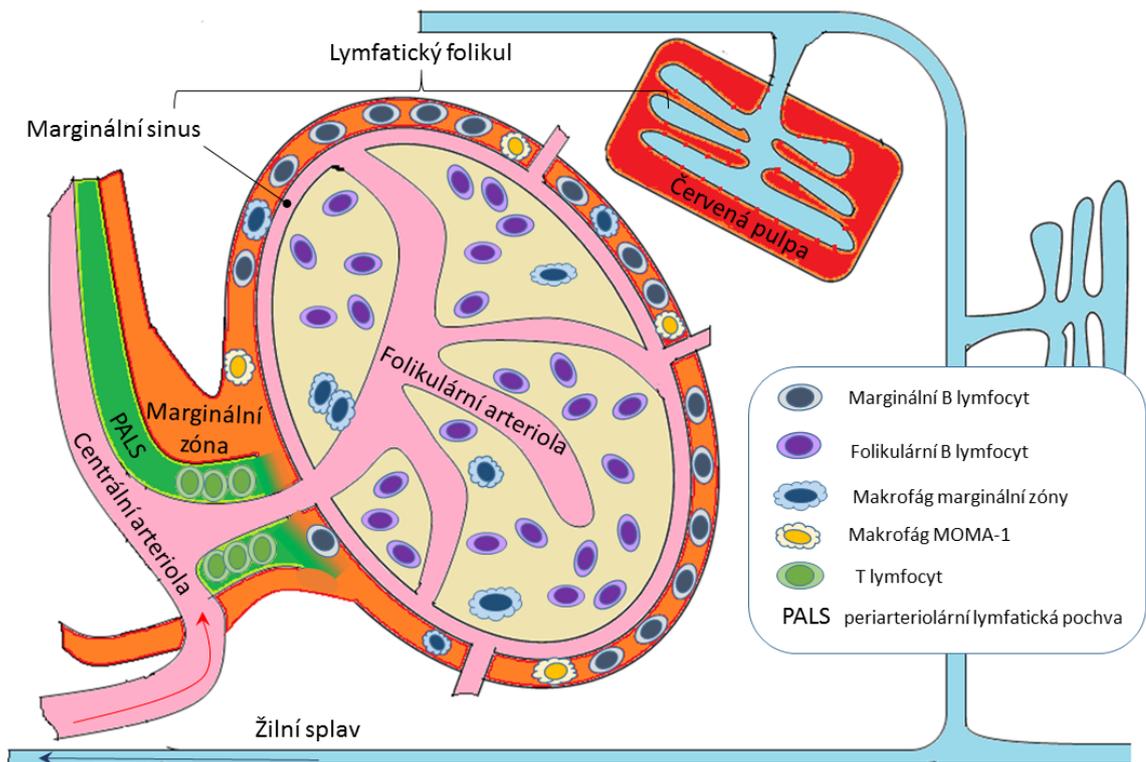
Palanichamy, Barnard et al. (2009) se zaměřili na populaci CD19<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> lymfocytů a míru exprese molekuly CD38 a CD24. Jejich studie byla opřena o data získaná z analýzy periferní krve pacientů po depleci CD20<sup>+</sup> populace monoklonální protilátkou rituximabem. Ve sledovaném vzorku rozlišili při postupné obnově B lymfocytárních populací tři populace tranzientních B lymfocytů, které jsou ve vzájemném vývojovém kontinuu s tím, že přechod mezi populacemi je v gradientu T1 – T2 – T3. Tyto populace lze od naivních maturovaných odlišit na základě vysoké exprese molekuly IgM a nízké exprese molekuly CD2, s tím, že dochází k upregulaci znaků typických pro maturovaná stadia a postupné ztrátě molekul typických pro nematurovaná stadia B buněčné lymfopoézy (Palanichamy, Barnard et al. 2009). Zároveň se lišila jejich anatomická lokalizace. T3 lymfocyty byly v rámci jejich studie rozpoznány mimo periferní krve také ve slezině a pupečníkové krvi.

#### 4.3.2.2 Maturované B lymfocyty

V periferní krvi lze rozlišit tři velké populace naivních zralých lymfocytů: B lymfocyty marginální zóny (MZ B lymfocyty, z angl. *marginal zone B cells*), folikulární lymfocyty (FM B lymfocyty, z angl. *follicular B cells*) a B1 B lymfocyty a dvě populace maturovaných lymfocytů, které prošly aktivací: paměťové B lymfocyty (z angl. *memory B cells*) a plazmatické buňky (z angl. *plasma cells*). Zcela novou populaci B lymfocytů představují regulační B lymfocyty (B-Reg, Breg, z angl. *regulatory B cells*).

### 4.3.2.3 Folikulární B lymfocyty

Folikulární B lymfocyty představují největší populaci cirkulujících maturovaných buněk (Allman a Pillai 2008, Pillai a Cariappa 2009). Rozlišují se dvě časoprostorově oddělené oblasti, ve kterých dochází k usazování folikulárních B lymfocytů. Primárním místem pro jejich usazení, tzv. *homing*, jsou folikuly (noduly, uzlíky) v sekundárních lymfatických orgánech (Pillai a Cariappa 2009). Druhou oblastí, ve které se usazují folikulární lymfocyty migrující z lymfatických orgánů, je kostní dřeň (Allman a Pillai 2008).



Obrázek 7 Schematický řez slezinou a osídlení jednotlivými typy lymfocytů podle Pillai a Cariappa (2009)

Stroma folikulu tvoří bílá dřeň sleziny, která je složená z trojrozměrné sítě vzájemně propletených retikulárních vláken, do jejichž ok se zachytávají nejen B lymfocyty, ale také T lymfocyty (oboje včetně aktivovaných stadií), efektorové buňky, dendritické buňky a makrofágy. Vlastní tělo folikulu je obklopeno marginální zónou, rozhraní bílé a červené dřeně lymfatického orgánu, která představuje kontaktní místo mezi antigeny a lymfocyty. Bohatě vaskularizovaná lymfatická tkáň marginální zóny představuje kontaktní místo mezi periferní krví a lymfatickým orgánem. Je místem, ve kterém dochází k penetraci lymfocytů z krevního řečiště do lymfatického uzlíku a zároveň je místem, ve kterém dochází ke kontaktu lymfocytů s antigeny. Z vnější strany na marginální zónu naléhá periarteriolární lymfatická pochva (PALS, z angl. *periarteriolar lymphoid sheath*), která obsahuje vysoké množství T lymfocytů.



této signalizace by nedošlo ke vzniku FO I lymfocytů. V závislosti na intenzitě signalizace se mění i imunofenotypový profil jednotlivých stadií (Pillai a Cariappa 2009).

FO B lymfocyty, k jejichž aktivaci odchází ve folikulu, jsou T dependentní. Bez kostimulačního signálu zprostředkovaného CD40L na T<sub>FH</sub> a za účasti IL-21 a BCL-6 nemohou vzniknout zárodečná centra, ve kterých dochází po proběhnutí afinitní maturace a izotypového přesmyku k diferenciaci FO buněk do paměťových B lymfocytů a dlouho žijících plazmatických buněk (Allman a Pillai 2008).

V případě časně T dependentní odpovědi mohou FO lymfocyty, které neprocházejí zárodečným centrem, dát vzniknou nemigrujícím, krátce žijícím plazmatickým buňkám (Minges Wols 2001, Allman a Pillai 2008, Oracki, Walker et al. 2010),

Asi jedna třetina IgM<sup>+</sup> nematurovaných B lymfocytů zůstává v kostní dřeni, kde jsou za pomoci dendritických buněk kostní dřene produkujících BAFF (faktor aktivující B lymfocyt, z angl. *B cell activating factor*) uhnížděné v nikách kolem krevních splavů (Pillai a Cariappa 2009, Pillai a Cariappa 2009). Odlišností paralelního vývoje B lymfocytů v kostní dřeni je, že na rozdíl od vývoje v lymfatických orgánech zde nedochází ke vzniku MZ P ani MZ (Cariappa, Boboila et al. 2007, Pillai a Cariappa 2009). Molekulární mechanismy indukující vznik MZ P a MZ buněk nejsou plně pochopeny, předpokládá se, že mikroprostředí sekundárních lymfatických orgánů poskytující bohatý repertoár ligandů je nutný pro diferenciaci buněk MZ (Allman a Pillai 2008, Pillai a Cariappa 2009). Podobně otevřená je i otázka, zda kostní dřeň může být současně místem primární i sekundární lymfopoézy (Cariappa, Boboila et al. 2007, Pillai a Cariappa 2009, Pillai a Cariappa 2009).

#### 4.3.2.3.1 B lymfocyty marginální zóny

B lymfocyty marginální zóny (dále jen MZ B) představují skupinu středně velkých necirkulujících naivních maturovaných B lymfocytů s kulatým jádrem, strategicky lokalizovaných na rozmezí bílé dřene a vaskulárního systému sleziny, který se označuje jako marginální zóna. Marginální zóna obsahuje kromě MZ B lymfocytů dendritické buňky a široké spektrum makrofágů (Martin a Kearney 2002). MZ B lymfocyty v sobě poji rasy buněk vrozené a adaptivní imunity. MZ B lymfocyty jsou nejen díky své anatomické lokalizaci schopné reagovat na antigenní stimulaci rychlým zapojením vrozených mechanismů, a překlenout tak období než organismus na kontakt s antigenem zareaguje produkcí vysoce afinitních protilátek.

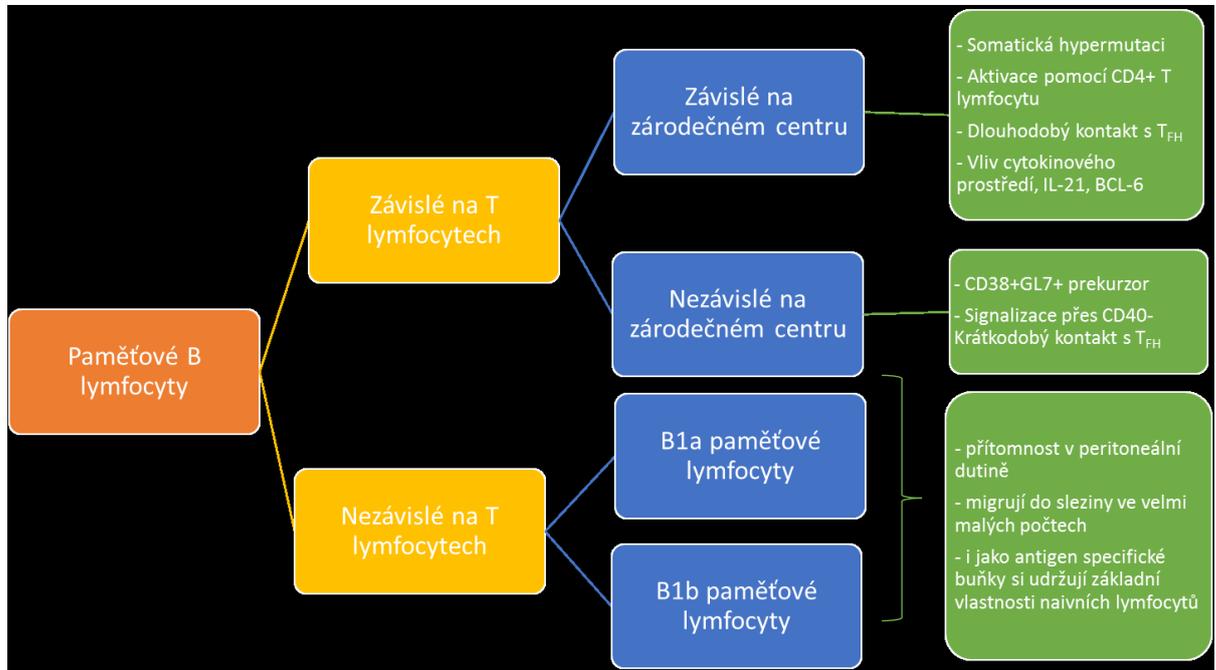
Mezi tyto mechanismy patří rychlá aktivace T independentní (ale i T dependentní) odpovědi na krví přenosné patogeny, a produkce IgM s nízkou afinitou, ale širokou specifitou (Cerutti, Cols et al. 2013). Jako jediná subpopulace B lymfocytů jsou při proliferaci závislé na vrozené signalizaci prostřednictvím NOTCH2 (z angl. *neurogenic locus notch homolog protein 2*) (Martin a Kearney 2002, Cerutti, Cols et al. 2013). Mezi další znaky odkazující na jejich intermediární povahu patří i skutečnost, že na svém povrchu nesou polyreaktivní BCR a podobně jako elementy vrozené imunity vykazují vysokou expresi TLR (Cerutti, Cols et al. 2013). Progresivním znakem je jejich schopnost přestavby BCR pomocí somatické hypermutace, a podobně jako folikulární buňky mohou být prekurzorem pro vznik paměťových B lymfocytů a plazmatických buněk, přičemž asi 85 % MZ B lymfocytů v lidské slezině prošlo somatickou mutací (Zouali a Richard 2011).

MZ B lymfocyty na svém povrchu nesou molekuly typické pro B lymfocyty, CD19 a CD20, dále ve vysoké míře exprimují molekuly CD21, CD35, CD1, CD9 a IgM (Martin a Kearney 2001, Martin a Kearney 2002, Zouali a Richard 2011), od ostatních naivních maturovaných lymfocytů je odlišuje absence nebo velice nízká exprese molekul IgD, CD23 a CD5 (Pillai a Cariappa 2009, Pillai a Cariappa 2009, Zouali a Richard 2011). Právě nízká míra exprese negativního regulátoru B lymfocytů, molekuly CD23 zřejmě stojí v pozadí velmi rychlého nástupu produkce protilátek B lymfocyty MZ v porovnání s FO B lymfocyty (Zouali a Richard 2011).

#### **4.3.2.4 Paměťové B lymfocyty**

Paměťové B lymfocyty představují asi 30 – 60 % všech B lymfocytů (Di Sabatino, Carsetti et al. 2004). Jsou nositeli imunologické paměti, v případě opakovaného kontaktu s antigenem zahájí obranu organismu tvorbou kvalitativně a kvantitativně účinnějších protilátek než v případě primoinfekce. Mezi jejich klíčové vlastnosti patří dlouhověkost a silná imunitní odpověď (využívané ve vakcinaci), ke kterým se připojuje zachování určité míry kmenovosti (zachování schopnosti progenitoru), závislost na jiných typech buněk (pomocné T lymfocyty, dendritické buňky) a schopnost rediversifikace opakovaným vstupem do cyklu diferenciaci v zárodečných centrech (Kurosaki, Kometani et al. 2015). Imunofenotypová variabilita paměťových lymfocytů je i s ohledem na možné cesty jejich diferenciaci vysoká (viz Obrázek 9 na straně 38), přesto na svém povrchu nesou typický znak – B2 lymfocyty ve vysoké míře exprimují molekulu CD27 (Klein, Rajewsky et al. 1998). Podle přítomnosti IgM na povrchu paměťového B lymfocytu se rozlišuje populace IgM+ paměťových B lymfocytů, které neprošly

izotypovým přesmykem a představují asi 20 až 50 % celkového počtu paměťových buněk a IgG+, IgA+ či IgE+ populace neexprimující IgM ani IgD, které prošly izotypovým přesmykem (Di Sabatino, Carsetti et al. 2004).



Obrázek 9 Heterogenita populací paměťových B lymfocytů v závislosti na způsobu diference

V periferní krvi lze rozlišit dvě základní populace paměťových lymfocytů. Na T lymfocytech závislé B lymfocyty odvozené od konvenčních B2 lymfocytů a na T lymfocytech nezávislé lymfocyty odvozené od nově popsaných B1 lymfocytů. Na T lymfocytech závislé B lymfocyty tvoří dvě velké subpopulace, které se odlišují podle toho, zda během vývoje prošly zárodečnými centry (germinální centra, GC, z angl. *germinal centers*) sekundárních lymfatických orgánů (Berkowska, Driessen et al. 2011, Kurosaki, Kometani et al. 2015). Zárodečná centra jsou mikroanatomické oblasti sekundárních lymfatických orgánů, ve kterých je významně zvýšen počet dělicích se buněk. V histologických řezech GC lze rozlišit tmavou zónu zárodečných center, ve které dochází k somatické hypermutaci a klonální expanzi B lymfocytů, a světlou zónu, v níž dochází k finalizaci afinitní maturace pomocí klonální selekce a následně k izotypovému přesmyku genů pro IgH (Klein a Dalla-Favera 2008, Berkowska, Driessen et al. 2011), podrobnější přehled dějů na úrovni zárodečného centra viz Obrázek 10, na straně 43.

V závislosti na intenzitě kontaktu s pomocnými T lymfocyty ve folikulech se cesty B lymfocytů rozdělují. B lymfocyty s nižší afinitou, které byly stimulovány CD4+ T lymfocyty po velmi krátkou dobu, a tedy obdržely signál s nízkým prahem, se nedostanou do zárodečných

center, a diferencují do paměťových lymfocytů mimo zárodečná centra (Sanz, Wei et al. 2008, Nescakova a Bystricky 2011, Kurosaki, Kometani et al. 2015). Pro indukcii diferenciace B lymfocytů do paměťových buněk bez nutnosti vstupu do zárodečného centra je dostačující signalizace prostřednictvím CD40 receptoru B lymfocytu a jeho ligandem CD40L (CD154) na T lymfocytu. Pokud se B lymfocyt vyvíjí touto cestou, nedojde u něj k somatické hypermutaci, ani k izotypovému přesmyku, a takový paměťový B lymfocyt si do vysokého diferenciačního stupně udržuje vlastnosti svého prekursoru (Sanz, Wei et al. 2008, Nescakova a Bystricky 2011, Kurosaki, Kometani et al. 2015).

Základní imunofenotypový profil paměťových B lymfocytů, které neprošly zárodečnými centry, je IgM+IgD+CD27+ (Klein, Rajewsky et al. 1998). Berkowska, Driessen et al. (2011) popisují populaci CD27-IgA+ paměťových buněk, které neprošly zárodečnými centry. Předpokládají, že se jedná paměťové B lymfocyty, které vznikly během T-independentních reakcí v gastrointestinálním traktu nebo o přirozené efektorové buňky, které vznikly v marginální zóně sleziny během systémové odpovědi (Berkowska, Driessen et al. 2011).

Oproti tomu u B lymfocytů, intenzivně stimulovaných pomocnými T lymfocyty po delší dobu, dochází kromě signalizace prostřednictvím molekuly CD 40, také k silnému vlivu IL-21. IL-21 upreguluje expresi BCL-6 (*B cell lymphoma 6*) (Kurosaki, Kometani et al. 2015). BCL-6 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který se fyziologicky uplatňuje při diferenciaci naivních pomocných T lymfocytů do folikulárních T lymfocytů (T<sub>FH</sub>). Ve vývoji B lymfocytů moduluje STAT-dependentní odpovědi pomocí IL-4, a je klíčovým faktorem pro vznik a vývoj zárodečných center (LeBien a Tedder 2008, Kuijpers, Bende et al. 2010, Perez-Andres, Paiva et al. 2010, Kurosaki, Kometani et al. 2015).

Základní imunofenotyp paměťových B lymfocytů, které prošly zárodečnými centry, je IgM-IgD-CD27+ (Klein, Rajewsky et al. 1998). Berkowska, Driessen et al. (2011) popisují CD27+IgG+, CD27+IgA+ a CD27+IgM+ populace paměťových B lymfocytů, které prošly zárodečnými centry. Dokládají, že CD27+IgM+ paměťové lymfocyty se funkčně podobají primárním B buňkám, které vstoupily do zárodečných center, zatímco populace CD27+IgA+ a CD27+IgD+ paměťových B lymfocytů vykazují vysokou míru proliferace a intenzivní somatickou hypermutaci. Toto by mohlo svědčit o tom, že CD27+IgA+ a CD27+IgD+ populace paměťových lymfocytů prošly složitějšími procesy diferenciace a maturace v zárodečných centrech (Berkowska, Driessen et al. 2011).

Ve vzorcích periferní krve lze vystopovat individuálně variabilní imunofenotypový profil paměťových B lymfocytů. V závislosti na imunologické zkušenosti organismu, způsobu vzniku a rozvoje různých onemocnění, lze identifikovat specifické odchylky od fyziologického stavu. Například u pacientů s nespecifickými záněty střev dochází ke snížení počtu cirkulujících IgM+ paměťových lymfocytů (Di Sabatino, Carsetti et al. 2004). Wang, Jiang et al. (2016) se zaměřili na pacienty s ulcerativní kolitidou, u nichž byly zaznamenány významně snížené počty CD19+CD27+IgD-IgG+ paměťových B lymfocytů a zvýšené počty CD19+CD20-plazmablastů, o nichž předpokládají, že by mohli hrát roli v patogenezi tohoto onemocnění. U pacientů s revmatoidní artritidou také dochází k narušení fyziologických hladin paměťových B lymfocytů. Většina studií popisuje snížení počtu CD27+IgD+/- B lymfocytů (Bugatti, Vitolo et al. 2014). Na druhou stranu u pacientů s aktivním onemocněním byly popsány vyšší frekvence CD27+IgD-CD95+CD21- a CD27-IgD-CD95+CD21 populací než u zdravých kontrol (Adlowitz, Barnard et al. 2015). Sledování různých imunofenotypově odlišných subpopulací paměťových B lymfocytů by mohlo sloužit jako velmi přesný identifikační a monitorovací nástroj při sledování vývoje onemocnění u pacientů s autoimunitními onemocněními.

#### 4.3.2.5 Plazmatické buňky

Plazmatické buňky představují konečnou fázi diferenciaci B lymfocytu. Jejich hlavní úlohou v adaptivní imunitní odpovědi po kontaktu s antigenem je tvorba vysoce specifických rozpustných protilátek. Jedná se o převážně sedentární buňky uhnížděné v bohatě vaskularizovaných tkáních (lymfatické uzliny, slezina, kostní dřeň), které nemigrují a za fyziologického stavu jejich frekvence dosahuje 1 % (Calame 2001, Oracki, Walker et al. 2010, Pieper, Grimbacher et al. 2013, Wang, Jiang et al. 2016). Dorner a Lipsky (2004) popisují zvýšenou frekvenci plazmatických buněk u dětí a dospělých s aktivní formou SLE. Plazmatické buňky vznikají z malé frakce buněk schopných tvorby rozpustných protilátek, tzv. plazmablastů (časných plazmatických buněk, *early plasma cell*), které si zachovaly schopnost proliferace a migrace oběhovým systémem až do místa konečného uhníždění (zapojení tzv. *homing* receptorů).

Plazmatické buňky, které dále nediferencují, exprimují jen malé množství povrchových molekul. Na svém povrchu nenesou pro B lymfocyty typické povrchové znaky CD19 a CD20, za to ve vysoké míře exprimují molekuly CD27, CD38 a CD138 (Rawstron 2001).

Konvenční plazmatické buňky vznikají v sekundárních lymfatických orgánech, ve kterých na základě signalizace prostřednictvím povrchových molekul nastoupí cestu intrafolikulárního vývoje, dávajícího vzniknout dlouho žijícím plazmatickým buňkám (z angl. *long-lived plasma cells*), nebo extrafolikulárního vývoje, během něhož vznikají krátce žijící plazmatické buňky (z angl. *short-lived plasma cells*) (Calame 2001, Minges Wols 2001). Rozdíl v jednotlivých cestách je nastolen odlišnou intenzitou signálu přicházejícího prostřednictvím CD40/CD40L, rychlostí nástupu imunitní odpovědi a reakcemi na úrovni zárodečného centra. Předpokládá se, že plazmatické buňky vznikají z B lymfocytů marginální zóny, z folikulárních maturovaných B lymfocytů i z paměťových B lymfocytů (Oracki, Walker et al. 2010).

Krátce žijící plazmatické buňky vznikají velmi časně během primární imunitní odpovědi. Jejich typickou vlastností je krátká životnost (v řádu dní, nejvyšší počty se objevují asi týden po imunizaci) a velmi nízká afinita k antigenu (Minges Wols 2001). Krátce žijící plazmatické buňky, které se nacházejí v červené dřeni sleziny, kostní dřeni a lymfatických uzlinách, tvoří rozpustné protilátky třídy IgM a IgG (Calame 2001, Minges Wols 2001). Tyto buňky velmi rychle reagují na prvotní kontakt organismu s antigenem a zajišťují rychlou odpověď. Předpokládá se, že během sekundární odpovědi na opakovaný kontakt s antigenem se krátce žijící buňky tvoří také z B lymfocytů marginální zóny, které během prvotního kontaktu s antigenem prošly reakcemi v germinálním centru, v důsledku čehož mají vyšší afinitu k antigenu (Minges Wols 2001, Oracki, Walker et al. 2010).

Dlouho žijící plazmatické buňky vznikají primárně z buněk germinálního centra, sekundárně pak z paměťových B lymfocytů. Jejich základní vlastností je sedentarizace, velké počty dlouho žijících plazmatických buněk se nacházejí v kostní dřeni, MALT či v mléčné žláze. Nesou vysoce afinitní protilátky, jedná se o buňky, jejichž IgH prošlo izotypovým přesmykem (Minges Wols 2001, Oracki, Walker et al. 2010). Dlouho žijící plazmatické buňky neexprimují MHC-II a nemohou tedy fungovat jako APC. Na vývoj plazmatických buněk významně působí cytokinové mikroprostředí.

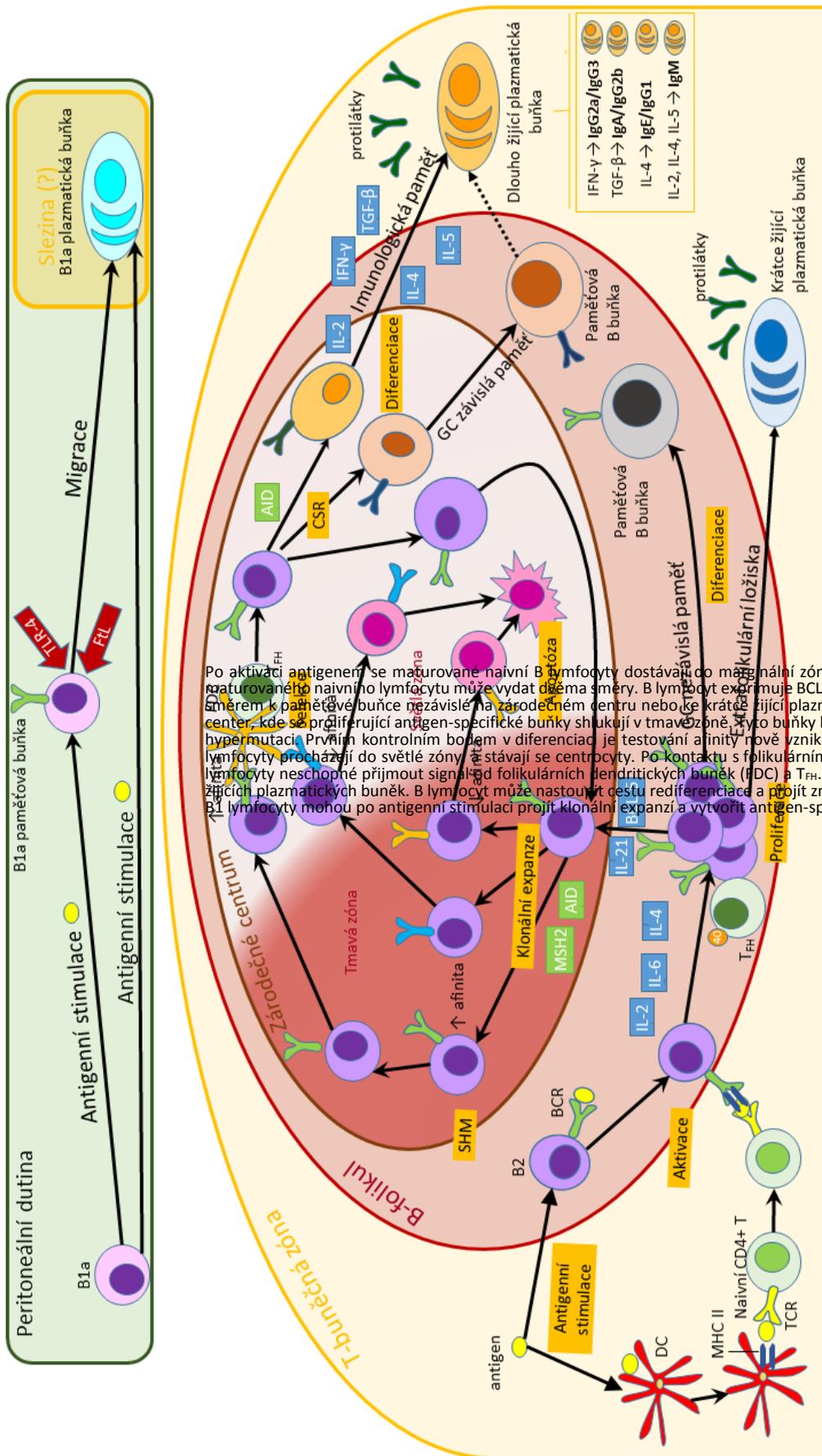
#### **4.3.2.6 Regulační B lymfocyty**

B lymfocyty mohou do imunitní odpovědi vstupovat i jinými mechanismy než produkcí protilátek. Již od 70. let 20. století byly u B lymfocytů pozorovány modulační a inhibiční schopnosti. Teprve v nedávné době se podařilo prokázat, že B lymfocyty jsou schopné produkovat IL-10. Tento cytokin se zapojuje do inhibice polarizace Th1 i Th2 lymfocytů,

prezentace antigenu a tvorby prozánětlivých cytokinů buňkami myeloidní linie (Gray a Gray 2010). Skupina B lymfocytů schopných negativní regulace imunitní odpovědi byla označena jako regulační B lymfocyty (Breg, z angl. *regulatory B cells*). Původ, vývoj a funkce těchto B lymfocytů nejsou zatím pochopeny, stejně jako nebyl vymezen konkrétní imunofenotyp, na jehož základě by je bylo možno definovat jako samostatnou populaci. Přestože se jedná o minoritní populaci buněk, v periferní krvi zdravého člověka koluje asi jen 0,5 % IL-10+ B lymfocytů., jejich biologická úloha v regulaci tolerance bude dramatická (McIntosh 2015) (ve slezině se jedná o 1 – 3 % B lymfocytů (Tedder 2015)).

Společnou vlastností Breg lymfocytů je přítomnost povrchové molekuly IL-10, která se podílí na inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (McIntosh 2015). Ukazuje se, že u člověka jsou produkce IL-10 schopné některé populace CD38+CD24+ B lymfocytů, ale také vybrané skupiny CD27+ paměťových B buněk (Gray a Gray 2010). Breg lymfocyty jsou někdy na základě své funkční vlastnosti označovány jako B10 lymfocyty (Tedder 2015). Otázka indukce sekrece IL-10 se tak dostává do popředí zájmu. Ukazuje se, že mezi ligandy se stimulačními účinky patří zejména molekuly z rodiny Toll-like receptorů (TLR), jmenovitě TLR2 a TLR4, případně kombinace BCR a TLR9 (Gray a Gray 2010).

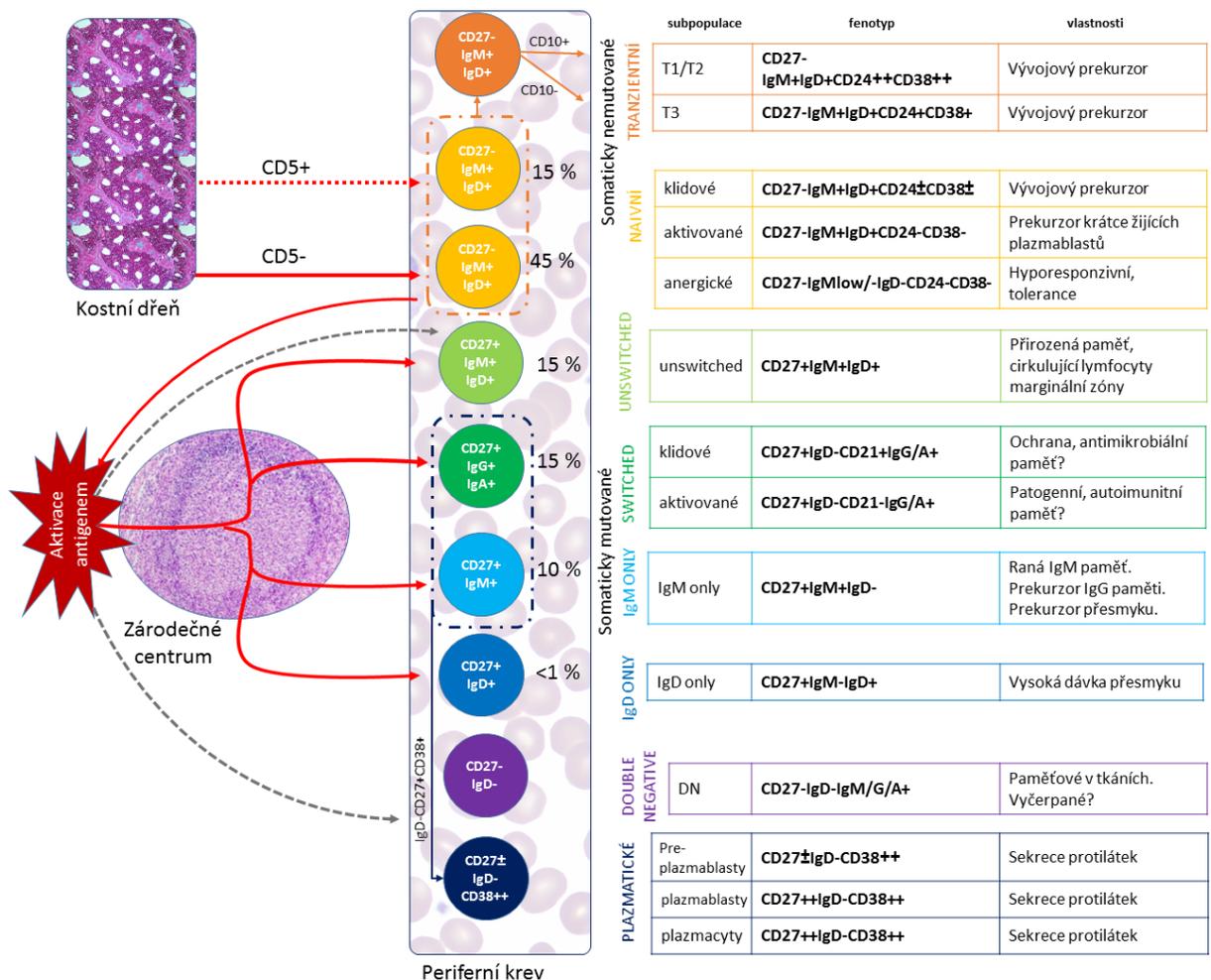
Při pokusech s deplecí B lymfocytů pomocí monoklonálních protilátek proti molekule CD20 se prokázalo, že u některých autoimunitních zánětlivých onemocnění (RA, SLE) došlo k výraznému zhoršení stavu pacienta, což může souviset s tím, že byly depletovány i B lymfocyty s regulačními funkcemi (McIntosh 2015, Lykken, DiLillo et al. 2014).



Obrázek 10 Mechanismy vzniku a vývoje paměťových B lymfocytů a plazmatických buněk, sestaveno podle Kurosaki, Kometani et al. (2015), Tarlinton (2006), doplněno podle Klein a Dalla-Favera (2008) a Berkowska, Driessen et al. (2011)

## 5 Populace B lymfocytů v periferní krvi

B lymfocyty periferní krve představují makropopulaci imunokompetentních buněk, jejichž hlavní efektorová funkce spočívá v produkci protilátek. Tento pohled však plně nepostihuje širší funkčního repertoáru B lymfocytů. Komparativní studie ukazují, že kromě schopnosti produkovat protilátky, mohou zastávat roli plnohodnotných APC, produkují mikrobicidní látky, secernují široké spektrum cytokinů a chemokinů, hrají významnou roli v regulaci imunitní odpovědi, dokonce mohou fagocytovat (popsáno u ryb, plazů a myši, nově i u člověka). Samotné spektrum regulačních a efektorových vlastností naznačuje, že prostý



Obrázek 11 Schematické znázornění a základní charakteristika hlavních B lymfocytárních populací identifikovaných v periferní krvi. Základní vývojové schéma včetně frekvenčního zastoupení jednotlivých subpopulací, které je v levé části znázorněno červenými šipkami, je převzato z publikace Kleina et al. (1998). Toto schéma bylo doplněno a rozšířeno o údaje podle Weie et al. (2015) a Kaminskeho et al. (2012). Červená tečkovaná čára u CD5+ B lymfocytů naznačuje jejich možný původ v kostní dřeni, ačkoli současné studie naznačují, že se jedná o populaci buněk odvozené z tzv. B1 lymfocytů, jejichž primární lymfopoéza zřejmě probíhá v tělní dutině, a je dokonce možné, že jsou odvozeny od jiného progenitoru než od hematopoetické kmenové buňky. Čerchované čáry naznačují možné vzájemné odvození jednotlivých populací. Současně je vidět, že například populace unswitched B lymfocytů nemusí projít zárodečným centrem (naznačeno šedou přerušovanou čarou), aby u ní došlo k somatické hypermutaci, podobně DN populace prochází během svého vývoje menším počtem somatických hypermutací, což též svědčí o možném odlišném vývojovém původu části těchto buněk, uvažuje se o tom, že jsou odvozeny od efektorových transienčních buněk. Ve schématu nejsou znázorněny Breg B lymfocyty, jejichž lymfopoetický původ a imunofenotyp nejsou zcela jasné.

pohled na B lymfocyty jako producenty protilátek je velmi limitující. Současně se ukazuje, že prosté dělení B lymfocytů na naivní a maturované, případně naivní a paměťové je zcela nedostačující.

Studie zaměřené na imunofenotypovou charakterizaci hlavních B lymfocytárních populací vycházejí ze sledování exprese znaků CD19, CD27, CD38 a IgD. Takto nastavený čtyřbarevný panel umožní rozlišit hlavní populace B lymfocytů. Prvotní rozdělení vychází z klasifikace CD19+ B lymfocytů podle Kleina et al. (1998) na základě exprese znaku CD27 a IgD. Z tohoto pohledu můžeme v periferní krvi rozlišit buňky naivní (CD19+CD27-IgD+), buňky paměťové (CD19+CD27+IgD+/-) a buňky plazmatické (CD19+CD27++IgD-). V rámci populace paměťových lymfocytů můžeme po přidání znaků IgM a IgD rozlišit populaci tzv. *non-switched memory B cells* (NSM, též uváděno jako „*unswitched*“), tedy populaci, která neprošla izotypovým přesmykem (CD27+IgM+IgD+), tzv. *IgM only B cells* (IgM only), buňky, které zřejmě představují vývojový mezistupeň B lymfocytů prodávajících izotypový přesmyk (IgM+IgD-CD27+), tzv. *switched memory B cells* (SM), lymfocyty, které prošly izotypovým přesmykem (CD27+IgD-IgA/G+), a tzv. *double negative B cells* (DN), které jsou zřejmě buňkami tkáňové imunity.

Vzájemné vztahy mezi jednotlivými subpopulacemi CD27+IgD+ B lymfocytů nejsou plně pochopeny. Za pomoci sekvenování a klonální analýzy se podařilo popsat rozdíly v intenzitě somatických hypermutací probíhajících ve skupině NSM a SM. U NSM lymfocytů je frekvence somatických hypermutací nižší než u SM, což by mohlo svědčit o tom, že tyto dvě populace nejsou klonálně příbuzné (Kaminski, Wei et al. 2012). Současně jsou NSM lymfocyty vybaveny funkcemi, které je významně od SM buněk odlišují: jsou schopny projít somatickou hypermutací bez nutnosti vstupu do zárodečných center, jsou podobné B1 a regulatorním lymfocytům, vykazují prvky antimikrobiální aktivity (Kaminski, Wei et al. 2012).

Heterogenita populace plazmatických buněk odráží způsob, jakým vznikly. V současné době se rozlišují tři základní cesty, kterými je naplněn osud B lymfocytu stát se plazmatickou buňkou. V prvé řadě se rozlišují z B1 populace vznikuvší plazmatické buňky a plazmatické buňky odvozené od konvenčních B2 lymfocytů. Podle míry exprese CD5+ molekuly u prekurzoru B1 plazmatické buňky se rozlišují B1a a B1b plazmatické buňky. Tyto populace buněk nebyly dosud podrobně popsány a otázky týkající se jejich vývoje a funkce zůstávají nezodpovězeny (Tarlinton 2006).

Pouze z tohoto letmého náhledu na heterogenitu populace CD27+IgD+ buněk lze dovozovat, že vnitřní funkční a biologická heterogenita makropopulace periferních B lymfocytů odrážející se v jejich imunofenotypovém profilu je mnohem vyšší než se dosud předpokládalo. S rozvojem polychromatické průtokové cytometrie za současného sledování více povrchových znaků, bude možné identifikovat dílčí mini až mikropopulace B lymfocytů. Tyto poznatky pomohou k objasnění a pochopení jejich protektivní nebo patogenní role v rozvoji autoimunitních onemocnění, získaných imunodeficiencí či v jejich maligním zvratu. Podrobnější shrnutí hlavních B lymfocytárních populací v periferní krvi viz. Obrázek 11 na straně 44.

## 5.1 Raritní populace B lymfocytů

Populace, které se ve vzorku vyskytují s frekvencí 1/1000, tzn. 1 ‰, a menší, se v průtokové cytometrii označují jako raritní (z latinského *rarus* – ojedinělý, zvláštní, řídký, vzácný) (Carey, McCoy et al. 2007, Donnenberg a Donnenberg 2007, Rawstron 2011, Lykken, Candando et al. 2015). Bylo prokázáno, že raritní populace buněk jsou důležitým diagnostickým ukazatelem v řadě patologických stavů, příkladem mohou být cirkulující nádorové buňky v periferní krvi, endoteliální buňky v krvi, antigen specifické T lymfocyty nebo fetální buňky v maternálním oběhu, slibně vypadají i pokusy s monitorováním osudu buněk v těle příjemce při použití buněčných terapií (Donnenberg a Donnenberg 2007). Některé populace B lymfocytů se ve vzorcích periferní krve sledovaných osob vyskytují za fyziologického stavu organismu v minimálním početním zastoupení, příkladem mohou být protilátky produkující B lymfocyty v periferní krvi zdravých jedinců (Kaminski, Wei et al. 2012). Na přechodnou dobu může dojít ke zmnožení těchto buněk v době, která bezprostředně navazuje na moment vystavení organismu infekčnímu antigenu (onemocnění, vakcinace) (Kaminski, Wei et al. 2012). Deplece některých populací (zejména CD20+ B lymfocytů) může u vybraných autoimunitních onemocnění vést k celkovému potlačení projevů onemocnění, ale důvody, proč se tak děje, nejsou známé. Výzkum těchto minoritně zastoupených až raritních B lymfocytárních populací přinese další cenné dílky informace do mozaiky poznání a pochopení funkčních vlastností a patogenese autoimunitních onemocnění.

### 5.1.1 Příklady raritních lymfocytárních populací identifikovaných v periferní krvi

Příkladem relativně málo probádaných a v periferní krvi vzácně zastoupených lymfocytárních subpopulací buněk, mohou být relativně nedávno popsane buňky, jako jsou NKB

lymfocyty, z angl. *natural-killer-like B cells*, (Wang, Xia et al. 2016), fagocytující B lymfocyty (Li, Barreda et al. 2006), ILC lymfocyty, z angl. *innate lymphoid cells* (Wang, Xia et al. 2016), thymické B lymfocyty (Fend, Nachbaur et al. 1991, Sanz, Wei et al. 2008, Perera a Huang 2015) či  $\gamma\delta$  T lymfocyty (Holtmeier a Kabelitz 2005, Kreslavsky, Gleimer et al. 2010). Ve všech případech se jedná o lymfocyty, které nelze vřadit pod klasická ontogenetická ani fylogenetická diferenciacní schémata, typické pro ně je, že vykazují směs znaků obou typů imunity, vrozené i adaptivní.

NKB jsou příkladem buněk, které nejsou ani B lymfocyty, ani NK buňkami. V jejich vlastnostech se kombinují znaky obou skupin. Wang, Xia et al. v roce 2016 publikovali práci, ve které blíže specifikují původ těchto buněk na myším modelu. Prokázali, že NKB lymfocyty diferencují z pro-B lymfocytů v kostní dřeni. V rámci studie se jim podařilo potvrdit existenci dvou subpopulací těchto lymfocytů – NKB lymfocyt s imunofenotypem Lin-CD19+NK1.1+ a NKBP lymfocyty (prekurzory NKB) s imunofenotypem Lin-CD122+CD19+NK1.1+. Současně popsali jejich výskyt v lymfatických orgánech, kdy hlavním místem výskytu NKB byla slezina a lymfatické uzliny v oblasti mesenteria. Místo nálezu je plně v souladu s hlavní efektorovou funkcí NKB. Ty jsou silnými producenty IL-18 a IL-12, jejichž sekrece vede k rychlému vymýcení mikrobiálních infekcí a aktivaci NK buněk a ILC lymfocytů, (Wang, Xia et al. 2016).

Přestože je brzlík považován za hlavní místo vývoje a selekce T lymfocytů, současné poznatky ukazují, že asi 1 % lymfocytů brzlíku představují B lymfocyty s vysoce aktivovaným fenotypem (Perera a Huang 2015). Thymické B lymfocyty se u člověka vyskytují v oblasti brzlíku, ve které dochází ke vzájemnému kontaktu mezi korovou a dřeňovou zónou (Fend, Nachbaur et al. 1991, Sanz, Wei et al. 2008, Perera a Huang 2015). Zdá se, že se jedná o zcela osobitou subpopulaci buněk, která necirkuluje v periferní krvi a embryologicky není odvozena od lymfoidních progenitorů sídlících v kostní dřeni. Tento poznatek je odvozen ze studií rané hematopoézy na myších, u kterých se thymické B lymfocyty objevují již 18. den od oplození, tedy ještě před tím, než se objeví embryonální kostní dřev (Sanz, Wei et al. 2008). Předpokládala se jejich role v negativní selekci, Yamano, Nedjic et al. (2015) publikovali studii, ve které postupují roli thymických B lymfocytů jako buněk schopných prezentovat autoantigeny potřebné pro indukci centrální T buněčné tolerance.

ILC jsou subpopulací buněk vrozené imunity odvozené ze společného lymfoidního progenitoru (CLP). Jako populace byly objeveny a popsány v roce 2012 (Spits a Cupedo 2012,

Walker, Barlow et al. 2013). Typické pro ně je, že nejsou vybaveny RAG, a proto nejsou vybaveny BCR/TCR. Současně jsou to buňky, které nenesou markery typické pro jiné myeloidní buňky (Walker, Barlow et al. 2013), a představují tak zcela unikátní populaci lymfoidních buněk odlišnou jak od B a T lymfocytů, tak od klasických buněk vrozené imunity.

Podobná situace platí pro případ fagocytujících B lymfocytů, které byly objeveny u kostnatých ryb a žab v roce 2006 (Li, Barreda et al. 2006); studovanými druhy byli pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) a drápatka (*Xenopus laevis*). Postupně se podařilo prokázat existenci fagocytujících B lymfocytů i u plazů a myší (Sunyer 2012, Parra, Takizawa et al. 2013), v roce 2016 byla publikována práce, které poprvé prokazuje fagocytární aktivitu B lymfocytů u člověka na lidské buněčné líně Raji (Zhu, Zhang et al. 2016). Buněčná linie Raji byla odvozena od B lymfocytů jedenáctiletého nigerijského pacienta trpícího Burkittovým lymphomem (Pulvertaft 1964) a využívá se mmj. ve výzkumu hematopoiezy. Zhue et al. (2016) prokázali schopnost B lymfocytů odvozených z linie Raji aktivně fagocytovat *Mycobacterium tuberculosis*, a současně, že fagocytované *Mycobacterium tuberculosis* ovlivňuje imunitní funkce B lymfocytů, především tím, že stimuluje sekreci IgM a upreguluje expresi molekul CD80 a CD86. Z evolučního hlediska tak lze usuzovat na společný původ B lymfocytů a makrofágů, současně jsou fagocytaující B lymfocyty dalším důkazem o vzájemné provázanosti vrozené a adaptivní imunity.

### 5.1.2 Identifikace raritních populací B lymfocytů v periferní krvi

Abychom mohli pomocí imunofenotypizace identifikovat raritní populace B lymfocytů, potřebujeme znát normální distribuci hlavních populací za fyziologického stavu (viz strana 44, Obrázek 11). B lymfocytární profil člověka není v průběhu života konstantní. Obecně můžeme říci, že B lymfopoéza je ovlivněna celou řadou faktorů, je závislá na věku (Ghia, Melchers et al. 2000, Palanichamy, Barnard et al. 2009, Morbach, Eichhorn et al. 2010, Adlowitz, Barnard et al. 2015), etnické příslušnosti, pohlaví a hormonálním profilu (Kincade, Medina et al. 1994, Medina a Kincade 1994, Smithson, Beamer et al. 1994, Barrat, Lesourd et al. 1999, Parrish, Baez et al. 2009, Wilhelmson, Stubelius et al. 2015), výživě a mikrobiomu (Round a Mazmanian 2009, Wesemann, Shrestha et al. 2014, Granato, Chen et al. 2015), míře aktivace imunitního systému a dokonce na sezonalitě (Demas a Nelson 2012).

Důležitým milníkem pro poznání raritních populací bylo rutinní rozšíření polychromatické průtokové cytometrie do analýzy PBMC ze vzorků periferní krve. Tento

posun byl umožněn díky vývoji jak přístrojového vybavení, tak rozšíření nabídky dostupných fluorochromů. V současné době se klinicky standardně používané osmibarevné panely jeví jako nedostatečné, a v biomedicinském výzkumu se již běžně využívají polychromatické panely kombinující sledování 17 i více povrchových znaků na jedné buňce (Kaminski, Wei et al. 2012, Rundberg Nilsson, Bryder et al. 2013, Suponitskaia, Aleksankin et al. 2015, Wei, Jenks et al. 2015).

Multiparametrické panely jsou náročné na přípravu, musí být přísně optimalizovány, aby nedocházelo k arteficiálnímu ovlivnění dat. Výzkum raritních populací je tak limitován několika významnými faktory.

V první řadě se jedná o vlastní odběr a přípravu vzorku, kdy klíčovým omezením je limitace velikosti/objemu zkoumaného vzorku - vlastní frekvenci zájmových populací ve vzorku (Carey, McCoy et al. 2007, Donnenberg a Donnenberg 2007). V rámci multiparametrických analýz musí být kladeny vysoké nároky na jednotlivé kroky, které jsou nutné v rámci manipulace se vzorkem: odběrem za striktně jednotných podmínek počínaje (zejména s ohledem na kvalitu použitého odběrového materiálu, teplotu skladování, přepravní podmínky) a očkovaním monoklonálními protilátkami konče, ve všech fázích se musí dbát především na srovnatelné teplotní a časové podmínky (Carey, McCoy et al. 2007, Donnenberg a Donnenberg 2007).

Druhou skupinu omezujících faktorů představuje poměr signál/šum použité metody (SNR, z angl. *signal/noise ratio*) (Carey, McCoy et al. 2007, Donnenberg a Donnenberg 2007).

Třetí skupinu představuje otázka reprodukovatelnosti experimentu, následovaná otázkou softwarového zpracování získaných dat (výběr vhodného softwarového řešení pro vyhodnocení naměřených dat) a statistického vyhodnocení (Donnenberg a Donnenberg 2007). Nepominutelnou součástí objektivního postupu je průběžná kontrola všech kroků od odběru přes zpracování až k vyhodnocení vzorku. Samostatnou kapitolou je pak interpretace získaných výsledků a jejich zařazení do kontextu současného poznání.

Základem úspěšné analýzy raritních populací je optimální návrh experimentu, který v případě této diplomové práce vychází ze značení PBMC jedenácti fluorochromy: šesti značenými v rámci klasifikace CD molekul jako CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38 a čtyřmi pro imunoglobuliny IgM, IgD, IgA a IgG. Poznatky o takto definovaných populacích B

lymfocytů jsou limitované, při rešerši publikovaných prací lze vytvořit tabulku s očekávaným fenotypovým profilem, kterou bychom měli při analýzách v rámci našeho panelu doplnit.

Populace B lymfocytů	Imunofenotyp									
	CD19+	CD20+	CD27-							
naivní	CD19+	CD20+	CD27-							
klidové	CD19+		CD27-	CD21+		CD24±	CD38±	IgM+	IgD+	
aktivované	CD19+		CD27-	CD21-		CD24-	CD38-	IgM+	IgD+	
anergické	CD19+		CD27-			CD24-	CD38-	IgM±	IgD+	
paměťové	CD19+	CD20+	CD27+				CD38-			
unswitched	CD19+		CD27+					IgM+	IgD+	
IgM only	CD19+		CD27+					IgM+	IgD-	
Switched - klidové	CD19+		CD27+	CD21+					IgD-	IgG+
Switched - aktivované	CD19+		CD27+	CD21-					IgD-	IgG+
Double Negative	CD19+		CD27-					IgM+	IgD-	IgG+
plazmatické	CD19+	CD20-	CD27+							
pre-plazmablasty	CD19+	CD20-	CD27±				CD38++		IgD-	
plazmablasty	CD19+	CD20-	CD27++				CD38++		IgD-	
plazmocyty	CD19+		CD27++				CD38++		IgD-	
T1 (tranzientní 1)	CD19+	CD20+	CD27-	CD21low	CD23low	CD24++	CD38++	IgM++	IgDlow	
T2 (tranzientní 2)	CD19+	CD20+	CD27-	CD21++	CD23++	CD24++	CD38++	IgM++	IgD++	
T3 (tranzientní 3)	CD19+	CD20+	CD27-			CD24+	CD38+	IgM+	IgD+	
FM (folikulární maturované)	CD19+	CD20+		CD21+	CD23+	CD24+	CD38+	IgM+	IgD+	
FO I (folikulární I)	CD19+	CD20+	CD27-	CD21+		CD24+	CD38low	IgM+		
FO II (folikulární II)	CD19+	CD20+	CD27-	CD21+		CD24++	CD38low	IgM++		
MZ (marginální zóny)	CD19+	CD20+		CD21++	CD23-			IgM++	IgD+	
Breg 1	CD19+			CD21+		CD24++	CD38++			
Breg 2	CD19+		CD27+	CD21+		CD24++				
Breg 3	CD19+		CD27+	CD21+					IgD+	

legenda negativní neg/poz nízká pozitivní vysoká variabilní

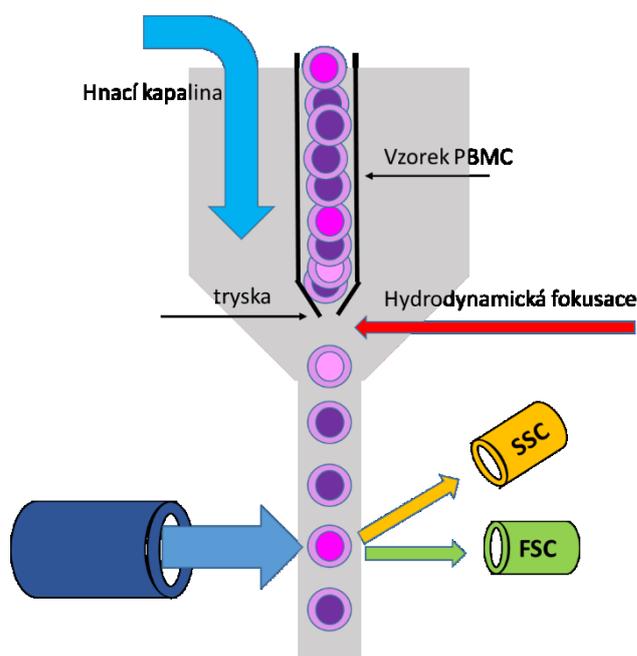
Tabulka 2 Přehled známých imunofenotypových profilů B lymfocytárních populací v periferní krvi se zohledněním všech sledovaných povrchových znaků, které jsou studovány v panelu použitém pro potřeby této diplomové práce; navíc znak CD23. Fialové pole, označené jako variabilní, označuje v rámci jedné populace vždy expresi buď IgM, nebo IgG nebo IgA (podle Klein, Rajewsky et al. 1998, Litzman, Vlková et al. 2007, Sanz, Wei et al. 2008, Palanichamy, Barnard et al. 2009, Vlkova, Fronkova et al. 2010, Kaminski, Wei et al. 2012, Yang, Rui et al. 2013, Benitez, Weldon et al. 2014, Wei, Jenks et al. 2015)

## 6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (angl. *flow cytometry*) je moderní, rychlá a přesná laboratorní metoda, která je založena na využití laseru či impedance pro měření a analýzu vlastností částic (především buněk) v suspenzi. Své místo má v základním i aplikovaném výzkumu, v klinické praxi, tkáňovém a proteinovém inženýrství. Průtoková cytometrie umožňuje multiparametrickou analýzu a simultánní měření více vybraných fyzikálních a chemických vlastností částic při jejich průchodu laserovým paprskem. Rychlost měření se pohybuje v řádu deseti tisíců částic za sekundu. V B-buněčné biologii se využívá pro identifikaci různých buněčných typů uvnitř smíšené populace, a následně pro detailní analýzu jednotlivých subpopulací.

Průtokový cytometr sestává ze tří základních okruhů: fluidního systému (fluidiky), optického systému (optiky) a elektronického systému (elektroniky) s výpočetní stanicí (*workstation*).

Fluidika zajišťuje transport buněk ze suspenze. Vzorek je nasát do průtokové komory (průtokové komůrky, tzv. *flow cell*), ve které dochází k hydrodynamické fokusaci částic nosnou kapalinou (hnačí kapalinou, tzv. *sheath fluid*) do proudnice. Takto „ustálené“ částice procházejí za konstantní rychlosti jednotlivými laserovými paprsky, které detekují fluorescenci a rozptyl záření. Částice, které prošly všemi paprsky, putují do odpadní nádoby, v případě specializovaného zařízení s třídícím (angl. *cell sorter*) do třídící jednotky.

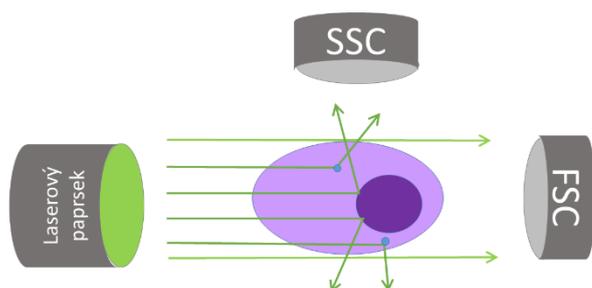


Obrázek 12 Zjednodušené schéma principu průtokové cytometrie

Optiku tvoří soustava zdrojů excitačního záření (lasery) a sběrné optické dráhy se systémem čoček, filtrů a zrcadel. Pomocí filtrů lze nastavit specifitu zachycovaných vlnových délek, pomocí zrcadel se reguluje úhel odrazu paprsku excitačního záření. Funkcí tohoto systému je zachycení částicemi emitovaných fluorescenčních signálů. Tyto fluorescenční

signály jsou přeneseny na optoelektronický detektor (fotosnímač), který se nachází na rozhraní optického a elektronického systému průtokového cytometru. Současně s fluorescenčními signály se zaznamenávají i dva základní parametry rozptylové – rozptyl v přímém směru a rozptyl v bočním směru.

Rozptyl v přímém směru má obvykle odchylku do 20° od směru laserového paprsku a je sbírán kanálem předního rozptylu (angl. *forward scatter channel*, FSC). Velikost rozptylu v FSC je přímo úměrná velikosti buněk a lze pomocí něj odlišit buňky živé a nečistoty.



Obrázek 13 Schematické znázornění zachycení rozptylových parametrů

Rozptyl v bočním směru je měřen v úhlu 90° od paprsku excitačního záření a je sbírán kanálem bočního rozptylu (angl. *side scatter channel*, SSC). Rozptyl v SSC odráží vnitřní komplexitu buněk, poskytuje informace o jejich granularitě či fragmentaci jádra. Kombinací parametrů FSC a SSC

získáme hodnoty typické pro jednotlivé typy buněk (př. vysoké hodnoty SSC u buněk v apoptóze).

Elektronika je komplexní systém, který umožňuje převod optických signálů v podobě fluorescence a rozptylu na signály elektronické. Při dopadu fotonů na fotosnímač dojde ke generování proudu v řádu mA a amplifikaci signálu pomocí fotonásobičů a fotodiod. Takto zesílený signál je digitalizován a v grafické a numerické podobě vizualizován pomocí výpočetní stanice. Výstupem měření jsou jednoparametrové a dvouparametrové grafy s přehledy počtů buněk nesoucích sledovaný znak v procentech.

V rámci analýzy dat můžeme na cílové populaci sledovat základní statistické ukazatele, jakými jsou modus, medián, četnost, intenzita fluorescence, standardní deviace apod., a získaná data následně podrobit multiparametrickému rozboru.

## 7 Sledované povrchové znaky

Analýza povrchových znaků (CD, z angl. *cluster of differentiation*) buněk patří mezi protokoly, které slouží k identifikaci a výzkumu membránově vázaných molekul. Analýza CD je základní technikou imunofenotypizace. Molekuly přítomné na povrchu buněk plní různé fyziologické funkce. Největší skupinu představují molekuly signální kaskády (receptory, ligandy apod.). Jejich role však může spočívat i v zajištění buněčné adheze (CAM, z angl. *cell adhesion molecules*), růstu, proliferace či diferenciaci (růstové faktory, z angl. *growth factors*).

Přítomnost povrchových znaků se u jednotlivých populací buněk liší. Sledování přítomnosti povrchových znaků za použití fluorescenčních monoklonálních protilátek je důležitým postupem při třídění a imunofenotypizaci studovaných populací. Kombinací vhodných povrchových znaků můžeme odlišit, popsat a definovat velmi specifické populace buněk ve sledované tkáni.

V námi použitým B buněčném panelu pro analýzu pomocí průtokové cytometrie sledujeme až deset povrchových znaků, jedná se o molekuly standardně klasifikované v systému CD nomenklatury CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38 a čtyři imunoglobuliny IgM, IgD, IgA a IgG. Jedná se nejdůležitější molekuly asociované s diferenciací B lymfocytů. Pomocí kombinované strategie vymezení jsme schopni identifikovat různá vývojová stadia B

		Sledované znaky												
		CD38	CD19	CD24	CD20	CD21	CD27	IgM	IgD	IgA	IgG			
centrální	nezralé	HSC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		časný pro-B lymfocyt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		pro-B lymfocyt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		velký pre-B lymfocyt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		malý pre-B lymfocyt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		nezralý lymfocyt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		tranzientní 1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	naivní	tranzientní 2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		tranzientní 3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		folikulární 1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		folikulární 2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		marginální zóny	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		GC	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
		GC paměťové	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
periferní	maturované	non-GC paměťové	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
		krátce žijící plazmatické	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
		dlouhožijící plazmatické	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
		dlouhožijící plazmatické	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	

Tabulka 3 Imunofenotypová charakteristika B lymfocytárních subpopulací s ohledem na stupeň diferenciaci a sledované povrchové znaky

lymfocytů v periferní krvi. Nástup a vyhasínání exprese sledovaných povrchových znaků během jejich vývoje ilustruje Tabulka 3, na straně 53.

## **7.1 CD19 (antigen pro B lymfocyty CD19)**

Molekula CD19 (též označována jako B4, CVID3) je povrchový antigen vyskytující se v membráně všech zdravých i maligních B lymfocytů, a na folikulárních dendritických buňkách (Zhou, Ord et al. 1991, Kozmik, Wang et al. 1992). Strukturně se jedná se o glykoprotein o hmotnosti 95kDa, se dvěma Ig-like doménami, který je složený z 240 aminokyselin (Lin, Gu et al. 2009).

Objevuje se v raných fázích centrálního vývoje B lymfocytů v kostní dřeni, přítomný je u Pro-B lymfocytu. Během diferenciaci se míra exprese CD19 postupně snižuje (Zhou, Ord et al. 1991). Primárně se jedná o koreceptor. Molekula CD19 vytváří komplex s BCR a podílí se na Ag-nezávislé nebo Ag-indukované aktivaci B lymfocytů (van Zelm, Reisli et al. 2006). Vytvoření tohoto komplexu vede ke snížení prahu nutného pro aktivaci B lymfocytu (van Zelm, Reisli et al. 2006). Zároveň umí vytvořit komplex i s jinými molekulami – CD21 (Fearon a Carroll 2000) nebo CD81 (Carroll 1998).

Evolučně se jedná o velmi konzervativní molekulu, CD19 je přítomna na lymfocytech u všech prostudovaných savců. U člověka je tento protein kódován genem CD19, mutace v něm vedou k rozvoji hypoagammaglobulinemie (defektní odpověď maturovaných B lymfocytů na antigenní stimulaci) (Zhou, Ord et al. 1991, van Zelm, Reisli et al. 2006).

## **7.2 CD20 (antigen pro B lymfocyty CD20)**

Molekula CD20 je povrchový antigen vyskytující se v membráně všech zdravých i maligních B lymfocytů. Strukturně se jedná aktivovaný glykosylovaný fosfoprotein o hmotnosti 33 – 37 kDa.

Objevuje se v raných fázích centrálního vývoje B lymfocytů v kostní dřeni, přítomný je u pozdního Pro-B lymfocytu, nenajdeme ho u plazmatických buněk. Během diferenciaci se míra exprese CD20 zvyšuje. Předpokládá se, že jeho funkce spočívá v optimalizaci B buněčné odpovědi na T-independentní antigenní stimulaci. Pro molekulu CD20 zatím nebyl popsán přirozený ligand, ale in vitro studie s CD20 monoklonálními protilátkami (mAbs, z angl. *monoclonal antibody*) prokázaly, že vstupuje do regulace B buněčné aktivace a proliferace

(Kuijpers, Bende et al. 2010). CD20 je součástí multimericky organizovaného povrchového buněčného komplexu, který reguluje transport  $\text{Ca}^{2+}$  přes cytoplazmatickou membránu, a mohl by tedy fungovat jako kanál pro přenos vápenatých iontů (Bubien, Zhou et al. 1993, Kuijpers, Bende et al. 2010, Kneissl, Zhou et al. 2013).

U člověka je tento protein kódován genem MS4A1 (rodina *membrane – spanning 4A* genů) (Kuijpers, Bende et al. 2010).

Proti molekule CD20 byla vyvinuta chimerní protilátka rituximab (anti-CD20, dostupná pod obchodními názvy Rituxan, MabThera, Zytux). Při nasazení rituximabu dojde k depleci CD20+ populace B lymfocytů, proto se využívá při léčbě onemocnění, pro které je typické patologické zmnožení počtu, zvýšená reaktivita nebo dysfunkce B lymfocytů. Mezi hlavní terapeutické cílové skupiny tak patří pacienti s různými typy rakoviny bílých krvinek (leukemie, lymfomy – především Non-Hodgkinův lymfom), autoimunitních onemocnění (systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida, autoimunitní pankreatitida) a při orgánových transplantacích (Kuijpers, Bende et al. 2010). Nasazení rituximabu selhává u pacientů s mnohočetným myelomem, u kterých byly popsány dvě odlišné subpopulace CD19+CD20+ B lymfocytů a subpopulace CD20+CD138+ plazmatických buněk (Pilarski, Baigorri et al. 2008).

### **7.3 CD21 (receptor komplementu typu 2)**

Molekula CD21 (též označována jako CR2, receptor komplementu C3d, receptor Epstein-Barrové EBV-R) je povrchový antigen vyskytující se na povrchu B lymfocytů, folikulárních dendritických buněk a T lymfocytů, které jsou součástí komplementového systému. Strukturně se jedná o glykosylovaný integrální membránový protein typu 1 o hmotnosti 145 kDa.

Ontogeneticky se objevuje u B lymfocytů, které prošly Pre-B fází vývoje, vysoká míra exprese se udržuje u B lymfocytů periferní krve a ztrácí se během terminální diferenciaci B lymfocytu do plazmatické buňky. CD21 je exprimován na maturovaných B lymfocytech, na B lymfocytech marginální zóny, na folikulárních dendritických buňkách, na některých buňkách epitelu a v malé míře na některých subpopulacích T lymfocytů.

Hlavní funkcí molekuly CD21, která je receptorem pro C3d, C3dg a iC3b fragment komplementu (Sarrias, Franchini et al. 2001), je vytvoření komplexu s CD19 a CD81. Komplex CD19/CD21/CD81 amplifikuje transdukci signálu prostřednictvím membránového imunoglobulinu (mIg), indukuje buněčnou agregaci a doplňuje fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3-kináza, (Matsumoto, Martin et al. 1993). Komplex CD19/CD21/CD81, je sestaven ze tří nezávislých, do různých proteinových rodin patřících podjednotek. Mezi jeho významné funkce patří zvýšení prahu citlivosti B lymfocytu na koncentraci Ag, tzn., že umožňuje rozeznání Ag, který je přítomen ve velmi nízkých koncentracích (Matsumoto, Martin et al. 1993), uvažuje se o jeho schopnosti rozeznávat cizí DNA během imunitní odpovědi (Asokan, Banda et al. 2013). CD21 je zároveň receptorem pro virus Epstein-Barrové (Weis, Fearon et al. 1986, Cooper, Moore et al. 1988, Prodinger 1999).

U člověka je protein CD21 kódován genem CR2. Polymorfismy v tomto genu jsou asociovány s náchylností k rozvoji některých autoimunitních onemocnění. U pacientů se sníženou hladinou nebo úplnou absencí CD21 se rozvíjí SLE (Asokan, Banda et al. 2013), popsána je asociace s rozvojem RA (Suponitskaia, Aleksanin et al. 2015).

#### **7.4 CD24 (transduktor signálu CD24)**

Molekula CD24 (též označována jako HSA, z angl. *heat stable antigen* nebo *nectadorin*) je membránově vázaný antigen, který je exprimován na povrchu zralých granulocytů a B lymfocytů (Hough, Rosten et al. 1994). Kromě hematopoetických buněk se exprimuje i na buňkách nervové tkáně, slezině, epitelech, keratinocytech a různých typech rakovinných buněk (Fang, Zheng et al. 2010). Strukturně se jedná o sialoglykoprotein, který je při izolaci z B lymfocytů složen pouze z 27 – 30 aminokyselin s hmotností 30 – 70 kDa. Míra glykosylace CD24 je závislá na buněčném typu a je vysoce variabilní (Fang, Zheng et al. 2010). K buněčnému povrchu je ukotven pomocí glykosilfosfatidylinositolu (GPI kotva).

Míra jeho exprese v průběhu ontogenetického vývoje B lymfocytu kolísá. Objevuje se v nejranějších fázích vývoje u pro-B lymfocytů a vysokou míru jeho exprese udržují i neaktivované maturované B lymfocyty v periferní krvi a plášťové zóně lymfatické uzliny. Po aktivaci B lymfocytu míra exprese CD24 prudce klesá, u B lymfocytů zárodečných center, v nichž dochází k terminální diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk, je exprese CD24 velmi nízká (Suzuki, Kiyokawa et al. 2001). Velmi vysokou míru exprese CD24 mají regulační B lymfocyty (Bregs) (Yang, Rui et al. 2013), které byly jako supresorová subpopulace

B lymfocytů poprvé popsány v roce 2006 (Mizoguchi a Bhan 2006). Fang, Zheng et al. (2010) obecně popisují ontogenetický profil CD24 ve všech buněčných typech: CD24 se ve vysoké míře exprimuje v raných fázích buněčného vývoje a u metabolicky aktivních buněk, k významnému snížení exprese dochází u terminálně diferencovaných buněk, z čehož vyplývá, že CD24 je funkčně zapojena do Ag-dependentní proliferace B lymfocytů a zároveň brání jejich vývoji do Ig-produkujících buněk.

Funkce molekuly CD24 nejsou plně pochopeny. CD24 je molekulou buněčné adheze, portfolio jejích funkcí je však daleko širší. Na aktivovaných B lymfocytech plní funkci T-buněčného kostimulátoru pro klonální expanzi T-lymfocytů (Fang, Zheng et al. 2010). Suzuki, Kiyokawa et al. (2001) popisují CD24 jako jednu z molekul, která se zapojuje do indukce apoptózy B lymfocytů.

U člověka je kódována genem CD24. Polymorfismy genu CD24 jsou asociovány s rizikem a progresí autoimunitních onemocnění jako jsou roztroušená skleróza, RA nebo SLE (Fang, Zheng et al. 2010).

## 7.5 CD27 (antigen aktivace T lymfocytů)

Molekula CD27 (označována též jako S152, TNFRSF7 nebo Tp55) je povrchový receptor, který patří do rodiny TNF-receptorů (TNFR, z angl. *tumor necrosis factor receptor*). CD27 se vyskytuje na povrchu asi 75 % T lymfocytů (Camerini, Walz et al. 1991), na většině B lymfocytů, na NK buňkách (Akiba, Nakano et al. 1998, Klein, Rajewsky et al. 1998) a také exprimuje na buňkách renálních tubulů (Nakatsuji 2003). Strukturně se jedná o dimerní membránový glykoprotein, který je složený ze dvou podjednotek – molekuly o hmotnosti 55 kDa a molekuly o hmotnosti 32 kDa (Borst, Sluysers et al. 1989, Camerini, Walz et al. 1991). Obě dvě podjednotky jsou strukturně homologní a exprimují epitopy rozpoznávané anti-CD27 protilátkami. Zřejmě nemají společný prekurzor vyššího stupně, ale 55 kDa molekula je pravděpodobně prekurzorem pro vznik 32 kDa molekuly (Borst, Sluysers et al. 1989).

V rámci ontogeneze lze pomocí CD27 molekuly odlišit subpopulace B lymfocytů, které prošly zárodečnými centry lymfatických tkání. Molekula CD27 neexprimuje na naivních B lymfocytech, je základním diskriminačním znakem paměťových B lymfocytů. Míra exprese CD27 s vývojem B lymfocytu stoupá, nejnižší hladiny vykazují B lymfocyty zárodečných center, nejvyšších hodnot exprese dosahují buňky plazmatické. Při imunofenotypizaci je

vzájemná přítomnost CD27 a CD38 molekuly na povrchu B lymfocytu používána jako identifikační znak plazmatických buněk (Klein, Rajewsky et al. 1998).

Mezi hlavní funkce molekuly CD27 patří zajištění interakce mezi T a B lymfocyty; CD27 reguluje aktivaci B lymfocytů a syntézu protilátek (Borst, Sluysers et al. 1989, Klein, Rajewsky et al. 1998). Signalizace prostřednictvím molekuly CD27 a jejího ligandu CD70 chrání B lymfocyty před indukcí apoptózy prostřednictvím IL-10. Přítomnost IL-10 vede k nasměrování vývoje CD27<sup>+</sup> B lymfocytů směrem k plazmatickým buňkám (Agematsu, Nagumo et al. 1998). Studuje se role CD27 jako kostimulační molekuly imunitního kontrolního bodu (*immune checkpoint*), čehož se využívá při vývoji anti-CD27 monoklonálních protilátek (Vitale, He et al. 2012).

Proti molekule CD27 byla vyvinuta monoklonální protilátka CDX-1127 (varlilumab). V preklinických studiích se prokázalo, že varlilumab indukuje silnou protinádorovou odpověď – byl popsán jeho pozitivní terapeutický účinek při léčbě CD27<sup>+</sup> tumorů (T a B buněčných lymfomů) (Vitale, He et al. 2012).

U člověka je kódován genem CD27. Polymorfismy tohoto genu v asociaci s polymorfismem v genu pro jeho ligandu CD70, zvyšují riziko některých maligních onemocnění, popsána je zvýšená incidence rakoviny prsu u čínské populace (Xu, Li et al. 2012), defekty v genu vedou k rozvoji lymfoproliferativního syndromu 2, autozomálně recesivního imunodeficitu, který se projevuje hypoagammaglobulinemií, nefunkční T-dependentní B lymfocytární odpovědí a perzistující symptomatickou EBV virémií (van Montfrans, Hoepelman et al. 2012).

## **7.6 CD38 (hydroláza cyklické ADP ribózy)**

Molekula CD38 (označována též jako ADPRC 1, T10) je povrchová molekula, která se nachází na membráně většiny imunitních buněk včetně B lymfocytů, T lymfocytů a NK buněk. Strukturně se jedná o glykoprotein o hmotnosti 45 kDa, jehož transmembránová doména plní funkci ektoenzymu (Hamblin 2003).

V průběhu ontogenetického vývoje B lymfocytu se exprimuje v časných vývojových stádiích. Objevuje se u Pre-B lymfocytů v kostní dřeni, během maturace se jeho exprese snižuje. Signalizace prostřednictvím CD38 chrání B lymfocyty GC před apoptózou. Paměťové B

lymfocyty tento epitop neexprimují, avšak u plazmatických buněk je jedním z mála přítomných antigenů (Hamblin 2003).

Molekula CD38 plní funkci ektoenzymu katalyzujícího konverzi NAD<sup>+</sup> (nikotinadenindinukleotidu) na nikotinamid, adenosindifosfát ribózu (ADPR) a cyklickou ADPR (Hamblin 2003), induktoru pro buněčnou aktivaci a indukuje mobilizaci zásob Ca<sup>2+</sup> z cytoplazmy (Funaro, Morra et al. 1997). Využívá se jako prognostický identifikační znak B-chronické lymfocytické leukémie (B-CLL), mnohočetného myelomu (negativní identifikační znak) a akutní myeloidní leukémie (AML, pozitivní identifikační znak) (Deaglio, Mehta et al. 2001). Deaglio, Capobianco et al. (2003) sledovali roli CD38 v signalizaci prostřednictvím BCR. Přestože naměřené hodnoty byly na hranici prahu detekce, up-regulací IL-2 se jim podařilo signál *in vitro* zesílit, což by mohlo znamenat, že populace sledovaných plazmatických buněk není homogenní, a v závislosti na míře exprese CD38 se dělí do specializovaných subpopulací. Navrhují možnou funkci CD38 v povrchovém receptoru CD19/CD81 (Deaglio, Mehta et al. 2001, Deaglio, Capobianco et al. 2003, Hamblin 2003).

Molekula CD38 je kódována CD38 genem. Defekty v tomto genu jsou asociovány s rozvojem B-prolymfocytické leukémie, vzácného hematologického onemocnění podobného B-CLL, či s plika syndromem, bolestivým zánětlivým onemocněním řasy synoviálního pouzdra kloubu (*plica synovialis*) (Deaglio, Mehta et al. 2001).

## 7.7 IgM (imunoglobulin M)

Imunoglobulin M je povrchová protilátka, která se nachází na povrchu B lymfocytů. Strukturně se jedná o glykoprotein složený z monomerů do pentameru (výjimečně hexameru) (Hořejší, Bartůňková et al. 2013). B lymfocyty tvoří dvě formy IgM: v membráně fixovaný IgM (mIgM) a sekretovaný IgM (sIgM). Obě dvě formy IgM se od sebe liší vnitřní strukturou těžkého řetězce ( $\mu$ ) a funkcí.

Membránově vázaný IgM o hmotnosti 900 kDa je ukotvený do buněčné membrány pomocí kotvy tvořené 20 hydrofobními aminokyselinami. mIgM plní funkci monomerního receptoru, který spouští diferenciaci B lymfocytů do pokročilých vývojových stupňů (Kehry, Ewald et al. 1980). Spolu s transmembránovými molekulami CD79 $\alpha$  (Ig $\alpha$ ) a CD79 $\beta$  (Ig $\beta$ ) asociovanými pomocí Src-PTK (proteintyrosinkináza z rodiny Src) za tvorby povrchového komplexu – BCR (Hořejší, Bartůňková et al. 2013). Aktivovaný BCR je součástí signalizačních

kaskád vedoucích ke změnám transkripce genů, buněčné proliferaci, diferenciaci a sekreci velkého množství rozpustných imunoglobulinů, je silným aktivátorem komplementu (Kehry, Ewald et al. 1980, Hořejší, Bartůňková et al. 2013). Sekreční IgM má strukturu pentameru a zapojuje se do humorální imunitní odpovědi jako efektor (Kehry, Ewald et al. 1980).

Ontogeneticky se IgM objevuje ve vývojovém stadiu Pre-B lymfocytu (Hořejší, Bartůňková et al. 2013). V této době je ukončena rekombinace lehkého i těžkého řetězce a formuje se BCR.

Poruchy tvorby IgM jsou spojeny s mutacemi různých genů. Poruchy vedoucí k nadprodukcí IgM a omezení syntézy protilátek ostatních typů jsou řazeny do skupiny hyper-IgM syndromů. V závislosti na příčinách se rozlišuje pět samostatných typů, přičemž X-vázaný typ 1 je projevem mutace na genu CD40LG, autosomálně recesivní typ 2 má mutovaný gen AICDA (aktivací indukovaná cytidin deamináza; B lymfocyty nemohou rekombinovat), stejně jako typ 4 (utlumení izotypového přesmyku), typ 3, který je projevem mutace na genu CD40 (blokuje izotypový přesmyk), a typ 5, který je mutací genu UNG (uracil-DNA-glykosyláza) (Lougaris, Badolato et al. 2005). Opačným případem je nedostatečná produkce IgM, která se může projevit jako dysagammaglobulinémie nebo hypoagammaglobulinémie s různou etiologií (Knight, Mayer et al. 2006).

## **7.8 IgD (imunoglobulin D)**

Imunoglobulin D je protilátka, která vyskytuje v membránách asi 1 % maturovaných B lymfocytů. Poprvé byl popsán u pacientů s mnohočetným myelomem v roce 1965 (Rowe a Fahey 1965, Rowe a Fahey 1965). Podobně jako IgM má dvě formy – membránovou mIgD a sekreční sIgD. Obě formy jsou antigenně podobné, liší se v citlivosti na proteolýzu plazminem (Vladutiu 2000). mIgD je obvykle exprimován na buněčné membráně spolu s IgM. Sekreční forma IgD je monomerní protilátka o hmotnosti 185 kDa, která se v malém množství vyskytuje v krevním séru (Chen a Cerutti 2011).

Ontogeneticky se IgD objevuje ve chvíli, kdy zrající B lymfocyt opouští kostní dřev a začíná cirkulovat v periferní krvi. Zralý B lymfocyt koexprimuje IgD a IgM (Chen a Cerutti 2010, Chen a Cerutti 2011). Omezené množství plazmatických buněk v lymfatické tkáni v malé míře exprimuje IgD (Vladutiu 2000).

Funkce IgD je zatím nejasná. Hlavní role IgD zřejmě spočívá ve spuštění aktivačního signálu k maturaci B lymfocytu (Chen a Cerutti 2011). Uvažuje se i o jeho možném zapojení do tolerogenních a apoptotických signálů (Chen a Cerutti 2011). Studuje se jeho role v autozánětlivých procesech, např. syndromu periodické horečky (PFAPA, z angl. *Periodic Fever, Aphthous Stomatitis, Pharyngitis, Cervical Adenitis*), pro kterou je charakteristické patologické zvýšení produkce IgD (Chen a Cerutti 2010).

## 7.9 IgA (imunoglobulin A)

Imunoglobulin A je nejhojněji se vyskytující protilátkou v lidském těle (Fagarasan a Honjo 2003). IgA je glykosylovaný protein o hmotnosti 160 kDa. U člověka se vyskytuje ve dvou formách, jako slizniční IgA (monomer) a jako sekreční IgA (dimer) (Singh, Chang et al. 2014). Monomerní IgA tvoří asi 5 – 15 % sérových imunoglobulinů, dimerní IgA se vyskytuje v sekretech vázaných na slizniční povrch (Fagarasan a Honjo 2003).

Ontogeneticky se IgA objevuje na paměťových B lymfocytech, které prošly izotypovým přesmykem (Shi, Agematsu et al. 2003). Nejvyšší koncentrace IgA+ lymfocytů se vyskytují v místech působnosti, nejčastěji pod *lamina propria mucosae*, kde následně maturují do plazmatických buněk secernujících dimerní IgA. V periferní krvi se IgA+ B lymfocyty vyskytují velmi málo, představují asi 1,2 % PBMC (Mayumi, Kuritani et al. 1983). Ke zvýšení počtu IgA spontánně secernujících B lymfocytů v periferní krvi dochází po té, co proběhne slizniční (nikoli systémová) imunizace (Yarchoan, Barrow et al. 1985).

Hlavní funkce IgA spočívá v neutralizaci infekčních agens na slizničních površích. IgA je velmi slabým opsoninem a aktivátorem komplementu. Vysoká koncentrace IgA ve sliznici je důsledkem interakce mezi plazmatickými buňkami a epitelovými buňkami, které exprimují pIgR (polymerní Ig receptor) (Snoeck, Peters et al. 2006). V krvi IgA interaguje s CD89 (Fc $\alpha$ RI), který je exprimován na efektorových buňkách imunitního systému (Snoeck, Peters et al. 2006). Prostřednictvím této interakce dochází ke spuštění zánětlivé reakce a odstranění antigenu (Snoeck, Peters et al. 2006).

Nejčastěji se vyskytujícím, geneticky podmíněným onemocněním, u kterého dochází k poruše syntézy IgA, je selektivní IgA deficiencie (SIgAD, z angl. *selective IgA deficiency*). U této nemoci dochází ke snížení produkce IgA pod detekovatelnou mez, ale produkce IgM a IgG zůstává v normě. Nemoc se může projevit častými infekcemi dýchacích cest a trávicího traktu

(Hammarström, Vorechovsky et al. 2000), ale nebyly zachyceny statisticky významné abnormality ve skladbě B lymfocytárních subpopulací (Litzman, Vlková et al. 2007). U pacientů byla prokázána vyšší náchylnost k rozvoji autoimunitních onemocnění (RA, SLE), alergií a astmatu (Hammarström, Vorechovsky et al. 2000).

## **7.10 IgG (Imunoglobulin G)**

Imunoglobulin G je nejčastější protilátkou v lidském séru (75 %). Strukturně se jedná o velkou molekulu, proteinový komplex složený ze čtyř peptidových řetězců o hmotnosti 150 kDa. Tento komplex ve tvaru písmene Y tvoří dva identické těžké (H) a dva identické lehké (L) řetězce, které jsou vzájemně propojeny pomocí disulfidických můstků. IgG má dvě totožná antigen vázající místa (Morbach, Eichhorn et al. 2010). U člověka se vyskytuje ve 4 podtřídách, IgG1 až IgG4. Tvořen je paměťovými a plazmatickými B lymfocyty. Prochází placentou a je hlavním imunoglobulinem v imunitní odpovědi novorozenců (Berkowska, Driessen et al. 2011).

Ontogeneticky se IgG objevuje na paměťových a plazmatických lymfocytech (Morbach, Eichhorn et al. 2010). Berkowska, Driessen et al. (2011) popisují dvě možnosti vzniku IgG<sup>+</sup> B lymfocytů v oblasti zárodečných center. Rozlišují primární populaci CD27<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup> B lymfocytů, která vzniká během primární odpovědi v zárodečných centrech, zatímco druhá, zralejší subpopulace CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> B buněk vzniká během následných odpovědí buněk zárodečných center. CD27<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> lymfocyty mohou vývojově směřovat k CD38<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> nebo CD38<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup> subpopulacím (Morbach, Eichhorn et al. 2010).

IgG je neutralizační protilátka, která opsonizuje a zapojuje se do protivirové imunity. Je to hlavní protilátka humorální odpovědi, která aktivuje komplement vazbou na Fcγ receptor na povrchu makrofágů, neutrofilů a NK buněk. Výsledkem je opsonizace s následnou fagocytózou mikroorganismů. IgG umí procházet mezi placentou a fetálním oběhem, současně je IgG klíčovou protilátkou v poporodní imunitě novorozence. IgG má dlouhý poločas rozpadu, proto se může v těle udržovat po velmi dlouhou dobu od kontaktu s antigenem, je tedy vhodným cílem pro pasivní imunizaci (Morbach, Eichhorn et al. 2010).

## **8 Charakteristika vybraných patologických stavů studovaných v rámci souboru**

Do námi sledovaného souboru byli zařazeni jedinci bez diagnostikovaného onemocnění (tzv. zdravé kontroly) a pacienti, u nichž byla diagnostikována choroba spadající do jedné ze čtyř sledovaných skupin patologických stavů. První skupinu představují choroby pohybového aparátu (revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida), druhou nespecifické střevní záněty (ulcerativní kolitida a Crohnova nemoc) a třetí onkologická onemocnění (kolorektální karcinom, karcinom pankreatu, rakovina žaludku). Čtvrtá skupina sledovaných chorob zahrnuje onemocnění krve a krvetvorby, kam spadají aplastická anemie a myelodysplastický syndrom.

Konkrétní demografický přehled a statistické ukazatele týkající se sledované populace pacientů jsou uvedeny ve výsledkové části práce.

### **8.1 Choroby pohybového aparátu**

#### **8.1.1 Revmatoidní artritida**

Revmatoidní artritida (*arthritis rheumatica*, dále jen RA) je chronické zánětlivé kloubní onemocnění s mimořádně variabilním klinickým obrazem. Predilekčně jsou postiženy drobné klouby ruky, zápěstí, nohy a hlezna, s postupem choroby se mohou rozvinout změny i na velkých kloubech (rameno, koleno, kyčle) nebo páteři. Klouby postižené RA nesou typické znaky zánětu, objevují se deformity a kontraktury flexorů (Pavelka a Rovenský 2003).

Odhaduje se, že onemocnění postihuje až 1 % dospělé populace v průmyslově rozvinutých zemích, přičemž ženy jsou postiženy až třikrát častěji než muži (Scott, Wolfe et al. 2010). Prevalence se s věkem zvyšuje, přičemž nejvyšší je u žen starších 65 let, což by mohlo svědčit o výrazném vlivu hormonů na rozvoj a průběh choroby (Alamanos a Drosos 2005, Scott, Wolfe et al. 2010).

RA je považována za multifaktoriální onemocnění, na jejímž rozvoji se podílí vzájemná interakce genetických predispozic a environmentálních faktorů, jako je kouření, stravovací a dietární návyky, socioekonomické postavení, prodělaná infekční onemocnění a užívání hormonálních preparátů (Alamanos a Drosos 2005).

Mezi diagnostická kritéria RA patří ranní ztuhlost, bolestivost, palpační citlivost a otok. Klouby bývají postiženy symetricky, onemocnění se projevuje polyartikulárně (Pavelka a Rovenský 2003). Kromě skeletu postihuje RA i jiné orgány, může zasáhnout kůži (revmatoidní uzly), ledviny (amyloidóza), srdce (perikarditida, endokarditida), cévy (ateroskleróza), plíce (fibróza), nervy (periferní neuropatie), nebo oko (episkleritida, keratokonjunktivitida) (Feldmann, Brennan et al. 1996, Silverman a Carson 2003, Berek 2005, Groot 2007, Manjarrez-Orduno, Quach et al. 2009, Scott, Wolfe et al. 2010, Wei, Jenks et al. 2015).

Patoanatomické změny se v první fázi projevují na synovii, chrupavce a v periartikulárním prostoru. Typickými znaky RA jsou hypertrofie a vaskularizace synoviální tkáně s infiltrací zánětlivých buněk, destrukce kloubní chrupavky (manifestací je tzv. pannus, zánětlivá granulomatózní tkáň z kloubní synovie, prorůstající do kloubní chrupavky) a osteoporóza (Feldmann, Brennan et al. 1996, Groot 2007, Scott, Wolfe et al. 2010).

V séru pacientů lze kromě proteinů akutní fáze identifikovat dvě hlavní skupiny autoprotilátek - revmatoidní faktor (RF) a autoprotilátky proti citrulinovaným proteinům (ACPA) (Feldmann, Brennan et al. 1996, Scott, Wolfe et al. 2010). RF je autoprotilátka cílená proti Fc-fragmentu pozměněného imunoglobulinu třídy IgG. Nalezen může být ve všech imunoglobulinových třídách (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) (Hrdá a Šterzl 2003). ACPA jsou autoprotilátky, které jsou namířeny proti citrulinovaným peptidům a bílkovinám. Slouží jako citlivý a specifický sérologický znak při diagnostice RA (Szekanecz, Soos et al. 2008). Do rodiny těchto protilátek patří antiperinukleární faktor (APF) a antikeratinové protilátky (AKA) (Szekanecz, Soos et al. 2008). Citrulinace je posttranslační modifikace argininu deaminací, která fyziologicky probíhá při apoptóze, zánětu a keratinizaci (Szekanecz, Soos et al. 2008), zvýšené míry citrulinovaných proteinů byly popsány a prokázány v synovii pacientů s RA (Szekanecz, Soos et al. 2008).

#### **8.1.1.1 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s revmatoidní artritidou**

Publikované informace o skladbě B lymfocytárních populací ve vzorcích pacientů s RA jsou velmi roztráštěné. Popsány jsou skupiny pacientů se zvýšeným počtem paměťových buněk s imunofenotypem IgD-CD27+, a to za současného poklesu naivních buněk (Fekete, Soos et al. 2007, Wei, Jenks et al. 2015), na druhou stranu existují studie, které sledovaly snížený počet IgD-CD27+ paměťových buněk u pacientů v době vysoce aktivní nemoci (Sellam, Rouanet et

al. 2011, Wei, Jenks et al. 2015). Zdá se, že k depleci B lymfocytární populace IgD+CD27+ dochází již před propuknutím nebo od časných stadií manifestace choroby, a tato deplece tedy není pouze důsledkem nasazené terapie nebo chronického autoimunitního onemocnění (Wei, Jenks et al. 2015). Změny v profilu B lymfocytárních populací u pacientů s RA vykazují nižší variabilitu než u jiných autoimunitních onemocnění, a zdá se, že k deregulaci B lymfocytárního vývoje dochází v místě zánětu, nikoli na periférii (Wei, Jenks et al. 2015). B lymfocyty u RA mají sníženou expresi CXCR5 (chemokinový receptor exprimovaný maturovanými B lymfocyty, který slouží k navedení B lymfocytů do sekundární lymfatické tkáně), a zvýšenou expresi CXCR3 (transmembránový prozánětlivý receptor aktivovaný chemokiny z rodiny CXC) (Lacotte, Brun et al. 2009, Wei, Jenks et al. 2015). Zánětlivá synovie pacientů s RA je infiltrována vysokým počtem CD38+ B lymfocytů, z nichž část je CD27+, což nasvědčuje tomu, že se jedná o buňky paměťové (Wei, Jenks et al. 2015).

Ve studii Milana Poláka (2014) byla u pacientů s RA podchycena statisticky nevýznamně zvýšená frekvence CD19+CD20+CD27+ paměťových B lymfocytů ( $17,53 \pm 1,78$  %). Zajímavé výsledky poskytl rozbor populace FO B lymfocytů, kdy u pacientů s RA došlo ke statisticky významnému snížení frekvence FO I a FO II v porovnání se zdravými kontrolami; zdravá kontrola: FOI: FOII –  $25,58 \pm 4,62$  % :  $32,66 \pm 3,52$  % a RA FOI : FOII –  $12,93 \pm 3,19$  % :  $42,47 \pm 3,29$  %;  $p < 0,0001$ .

### 8.1.2 Ankylozující spondylitida

Ankylozující spondylitida, též Bechtěrevova nemoc (*spondylitis ankylosans seu morbus Bechterevi*, dále jen AS) je chronické, progredující, zánětlivé onemocnění pohybového aparátu ze skupiny spondyloartropatií. Primárně postihuje kloubní spojení páteře (sakroiliakální, intervertebrální, kostovertebrální) včetně přiléhajících měkkých tkání (meziobratlové plotýnky a vazy), v těžších případech může postihnout i kořenové a periferní klouby. Zánětlivé procesy vedou k postupné osifikaci měkkých tkání až k ankylóze kloubních spojení.

Prevalence AS v celosvětové populaci je odhadována na 0,1 – 1,4 % v závislosti na etnicitě (nejvíce případů je v Turecku, Řecku, Itálii, nejméně pak v Japonsku a Číně (Dean, Jones et al. 2014), přičemž muži jsou postiženi až třikrát častěji než ženy (Dakwar, Reddy et al. 2008, Lin, Gu et al. 2009, Niu, Zhang et al. 2013, Dean, Jones et al. 2014).

Mezi klinicky významné diagnostické znaky patří v průběhu dne se stupňující bolestivost zad, s maximem v nočních a ranních hodinách, která je způsobená zánětlivými procesy v kloubních spojeních axiálního skeletu. Postupně se přidává snížení hybnosti páteře, bolest kyčlí, ramen a objevuje se asymetrická periferní artritida, daktylitida a entesitida (Dakwar, Reddy et al. 2008). Typická je pro AS predilekce zánětu v křížokyčelním kloubu s postupnou progresí do vyšších etáží páteře. Mezi časté extraartikulární komorbidity patří chronická únava, nespavost, postiženy mohou být oči (typická je fotofobie a iridocyklitida), plíce (fibróza, snížení vitální kapacity pod vlivem postupující osifikace měkkých tkání), gastrointestinální trakt (asymptomaticky probíhající zánět střev), objevit se mohou otoky velkých kloubů (van der Linden a van der Heijde 1998, Dakwar, Reddy et al. 2008, Dean, Jones et al. 2014).

#### **8.1.2.1 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s ankylozující spondylitidou**

Poznatky o fenotypu a funkci B lymfocytárních populací u AS jsou velmi limitované, většinou se odvozují od studií věnovaných RA, systémovému lupusu (SLE), případně roztroušené skleróze (RS). Lin Qu a kolektiv (2009) popsali signifikantně vyšší zastoupení CD27<sup>high</sup>CD19<sup>+</sup> B lymfocytů v periferní krvi pacientů s AS. Oproti tomu Niu a kolektiv (2013) zjistili, že frekvence CD27<sup>+</sup> B lymfocytů v porovnání se zdravými kontrolami byla nižší. Zároveň u pacientů s AS zaznamenali významně vyšší frekvence CD86<sup>+</sup> a CD27-CD95<sup>+</sup> B lymfocytů ( $p < 0,001$ ). Sledovali korelace vybraných B lymfocytárních populací s testem aktivity AS BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*), u kterého zaznamenali pozitivní korelaci s CD38<sup>+</sup> a CD95<sup>+</sup> B lymfocyty a negativní korelaci u populace CD38<sup>-</sup> a CD86<sup>+</sup> B lymfocytů (Niu, Zhang et al. 2013). Jako terapeuticky zajímavé identifikovali dvě klíčové populace CD27-CD95<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> a CD86<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B lymfocytů (Niu, Zhang et al. 2013).

## **8.2 Nespecifické záněty střeva**

Nespecifické záněty střeva (též idiopatické, IBD, z angl. *inflammatory bowel disease*) jsou heterogenní skupinou chronických zánětlivých onemocnění trávicího traktu s neznámou patogenezi a etiologií. Typicky se označením nespecifický zánět střev rozumí Crohnova nemoc (K50 podle ICD10) či ulcerózní kolitida (K51 podle ICD10), v 5 – 15 % případů se nepodaří

diferenciální diagnostikou blíže specifikovat typ postižení trávicího traktu a hovoří se o neurčitých kolitidách (K52 podle ICD10) (Lukáš 2011).

Přestože o jejich existenci věděli již lékaři doby římské, jako neinfekční průjmovité onemocnění je popisuje kolem roku 300 n. l. Aretaeus (De Dombal 1968), klíčové objevy vedoucí k jejich definici jako specifické diagnózy byly učiněny na přelomu 19. a 20. století. Ulcerativní kolitida byla jako samostatná nosologická jednotka definována v roce 1875 anglickými lékaři Wilksem a Moxonem (De Dombal 1968).

Popis klinických projevů Crohnovy choroby byl přednesen až o více než padesát let později, dne 13. května 1932 na setkání odborníků v oblasti gastroenterologie v New Orleans (Crohn, Ginzburg et al. 1932). Od druhé poloviny 20. století narůstá zájem o nalezení příčin vedoucích k rozvoji těchto onemocnění.

Přestože mechanismus rozvoje nespecifických zánětů střev není plně pochopen, lze říci, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, na jejichž rozvoji se podílí interakce mezi genetickou predispozicí (např. polymorfismus genu NOD2/CARD15), narušenou činností imunitního systému jedince (např. zvýšená aktivita CD4 T lymfocytů ve sliznici MALT) a spouštěči ze zevního a vnitřního prostředí (např. kouření, dieta, mikrobiom). V současnosti počty nemocných významně narůstají, i proto lze nespecifické záněty střeva označit za civilizační chorobu (Lukáš 2011).

### **8.2.1.1 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s nespecifickými záněty střev**

Většina prací zaměřených na studium B lymfocytů u pacientů s nespecifickými záněty střev se soustředí na identifikaci odlišností ve frekvenčním zastoupení jednotlivých lymfocytárních populací ve sliznici chorobou postiženého střeva. Takový postup vyžaduje invazivní zákrok v podobě biopsie postižené tkáně. Z pohledu klinické praxe se jedná o rutinní, byť relativně náročný a nákladný postup. Možnost využití relativně malého množství vzorku periferní krve pro diferenciální diagnostiku se tak jeví z hlediska možné aplikace jako velice perspektivní. Jedním z cílů možného využití námi navrženého 11-barevného panelu je právě i možnost jeho využití při diferenciální diagnostice nespecifických zánětů střev. Naše hypotéza vychází z předpokladu, že se dvě nejčastější choroby, které jsou pod tímto souhrnným termínem zahrnovány, tedy Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, liší svým mechanismem patogeneze, a to i na buněčné úrovni. A pokud je tato presumpce platná, musí být rozdíly postižitelné také

ve vzorcích periferní krve. Bude tedy nutné zodpovědět otázku, jestli se tyto choroby dají rozlišit podle obrazu, který poskytne zastoupení B lymfocytů v periferní krvi.

## 8.2.2 Crohnova nemoc

Crohnova nemoc (*colitis regionalis*, dále jen KRO) je autoimunitní onemocnění postihující gastrointestinální trakt. Jedná se o chronický zánět neinfekčního původu, který může postihnout kteroukoli část trávicího traktu od jícnu po konečník.

Prevalence Crohnovy choroby se v různých oblastech světa liší. Nejvyšší počty pacientů jsou zaznamenávány v Kanadě, severní Evropě a Austrálii (3,2 ‰/rok), nejnižší pak v Africe a Asii (Cosnes, Gower–Rousseau et al. 2011, Molodecky, Soon et al. 2012). Nemoc se objevuje u lidí mladého dospělého věku, typicky mezi 20. – 30. rokem života, asi třetina pacientů je diagnostikována před dosažením 20 let věku. Patogeneze je zatím neznámá, předpokládá se, že se jedná o autoimunitní onemocnění s podílem genetické, imunitní a environmentální složky. Mezi rizikové faktory vnějšího prostředí patří především na tuky a sacharidy bohatá strava, kouření, používání hormonálních preparátů či stres, jež lze obecně označit jako „západní styl života“.

znak	ulcerózní kolitida	Crohnova nemoc
<b>klinika</b>		
horečka	poměrně časté	časté
břišní bolest	variabilní	časté
průjem	velmi časté	poměrně časté
krvácení z konečníku	velmi časté	poměrně časté
ztráta váhy	poměrně časté	časté
známky malnutrice	poměrně časté	časté
perianální choroby	nejsou	poměrně časté
abdominální hmota	nejsou	časté
poruchy růstu	občas	časté
<b>místo postižení</b>		
colon	výhradně	2/3 pacientů
ileum	nikdy	2/3 pacientů
jejunum	nikdy	vzácně
žaludek	nikdy	vzácně
duodenum	nikdy	vzácně
hltan	nikdy	vzácně
<b>střevní komplikace</b>		
stenózy	neví se	časté
příštěle	nejsou	poměrně časté
megacolon toxicum	neví se	není
perforace	neví se	málo časté
rakovina	časté	poměrně časté
<b>endoskopické vyšetření</b>		
drobná tkáň	velmi časté	poměrně časté
aftózní a lineární vředy (fisury)	nejsou	časté
dlaždicovitý vzhled	nejsou	časté
pseudopolypy	časté	poměrně časté
poškození konečníku	velmi časté	poměrně časté

Tabulka 4 Porovnání základních rozdílů mezi Crohnovou nemocí a ulcerózní kolitidou (převzato z Podolsky 2002)

Poznatky o genetických příčinách lze čerpat ze studií, které potvrzují vyšší výskyt KRO mezi sourozenci. V roce 2001 byla identifikována první mutace v genu NOD2, která byla asociovaná s rozvojem Crohnovy nemoci (Hugot, Chamaillard et al. 2001, Philpott, Sorbara et

al. 2014). Postupně bylo popsáno několik desítek dalších genů (např. IL23R, IRGM, ATG16L1), které riziko rozvoje KRO zvyšují (Philpott, Sorbara et al. 2014).

KRO je kontinuální, progresivní zánětlivé onemocnění, které se projevuje dlouhotrvajícími průjmy, zvracením, bolestmi břicha, únavou a krví ve stolici. Zánět postihuje celou střevní stěnu ve všech vrstvách (je transmurální), přičemž postižení může být segmentární nebo plurisegmentární, tj. střídají se úseky nepostižené s postiženými. Zároveň se oblasti postižení mohou kombinovat a jejich lokalizace proměňovat v závislosti na vzplanutí nebo vyhasnutí zánětu. V postiženém místě střevní stěny se nad lymfatickými folikuly tvoří aftosní vředy či polypy. KRO je charakterizována tvorbou hnisavých ložisek (abscesů), nepřirozených propojení mezi orgány, cévami, kůží, u KRO typicky kanálkovitá propojení mezi kličkami střeva nebo propojení s močovým měchýřem (píštěle) a zúžením průsvitu dutého orgánu – např. střeva, jícnu, žaludku zjizvením vznikajícím při hojení zánětem postižené tkáně (stenózy). Tyto procesy mohou vést až k celkovému přerušení průchodnosti (obstrukci) střeva.

### **8.2.2.1 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s Crohnovou nemocí**

Role B lymfocytárních subpopulací v patogenezi Crohnovy nemoci není známá. Podařilo se prokázat, že počet CD19+ a CD5+ B lymfocytů je u pacientů s KRO významně nižší než u zdravých kontrol (Neil, Summers et al. 1992). Yacyshyn a Pilarski (1993) popsali CD19+CD45RO subpopulaci B lymfocytů, jako typickou pro pacienty s KRO. Snížený počet B lymfocytů cirkulujících v periferní krvi byl následně potvrzen i několika dalšími studiemi. Zajímavý výsledek přinesla práce Li a kolektivu (2015), kteří se zaměřili na CD19+ B lymfocyty. Potvrdili, že celkový počet CD19+ B lymfocytů v periferní krvi je u pacientů s KRO nižší než u zdravých kontrol. Zároveň popsali sníženou expresi CD40 (receptor pro CD40L T lymfocytů) u pacientů s KRO, snížený poměr CD5+ (subpopulace B lymfocytů, která moduluje vrozené a autoimunitní reakce, podílí se na prezentaci antigenu a indukci tolerance) a IgM+IgD+CD27+ (subpopulace paměťových buněk před izotypovým přesmykem, *pre-switched memory cells*) u pacientů s aktivním nespecifikovaným zánětem střev.

Zajímavá je z tohoto pohledu snížená exprese znaku CD40 v periferní krvi, protože u pacientů s KRO a UC je exprese CD40+ buněk ve střevní tkáni významně zvýšená, s tím, že jejich nejvyšší koncentrace jsou v germinálních centrech lymfoidních folikulů (Liu, Colpaert et al. 1999, Li, Vermeire et al. 2015). Provedeným dvojitým barvením bylo prokázáno, že většinou CD40+ buněk v tkáni střeva pacientů s KRO jsou B lymfocyty (CD20+CD40+) (Liu, Colpaert

et al. 1999). Tento stav by mohl být dokladem určité funkční alterace CD40+ B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s nespecifickým zánětem střev (Li, Vermeire et al. 2015).

### 8.2.3 Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida (*colitis ulcerosa*, dále jen UC) je intermitentně probíhající vředovité onemocnění trávicího traktu, které postihuje výlučně tlusté střevo a konečník.

Prevalence UC se v různých oblastech světa liší, udává se v rozsahu od 0,76 ‰ do 2,46 ‰ za rok s tím, že nejvyšší výskyt je dokumentován v severní Evropě a severní Americe, nejnižší riziko rozvoje UC mají Asiaté (Danese a Fiocchi 2011). Choroba se manifestuje mezi 20. až 40. rokem života a častěji postihuje ženy než muže. Výjimkou není ani rozvoj nemoci v dětském věku.

Mezi hlavní klinické příznaky UC patří průjem s příměsí krve a hlenu. Nástup choroby je postupný, se střídáními období remise onemocnění a následnými relapsy. Proto se u UC rozlišuje stadium aktivní nemoci, kdy je zánětem postižena sliznice (*pars mucosa*) konečníku odkud se choroba šíří do dalších oblastí tlustého střeva (Danese a Fiocchi 2011). Na rozdíl od KRO nedochází k transmurálnímu poškození střevní stěny, zánětlivou tkáň sliznice lze na histologickém preparátu odlišit podle ostré hranice, která ji dělí od tkáně zdravé. K hlavním příznakům se mohou přidružit i bolesti břicha, horečka, hubnutí nebo únava. Při těžkém průběhu UC může dojít ke zjizvení, krácení nebo úplné ztrátě funkce střeva.

Příčiny vzniku UC nejsou plně pochopeny a popsány. Předpokládá se, že se jedná o multifaktoriální autoimunitní onemocnění, na jehož rozvoji se podílí faktory genetické, imunologické i environmentální. Mezi rizikové činitele patří stres, kouření, dieta s vysokým obsahem sacharidů a tuků. S ohledem na rozšíření lze UC považovat za civilizační onemocnění spojené se západním životním stylem a vysokým socioekonomickým statusem pacientů (Podolsky 2002, Cosnes, Gower–Rousseau et al. 2011, Danese a Fiocchi 2011). Genetické pozadí UC je velmi podobné KRO. Přesto byly v jejich genetickém profilu nalezeny určité odlišnosti. Anderson et al. (2011) provedli metaanalýzu 6 GWAS studií zaměřených na nespecifické záněty střev a popsali 47 lokusů, které jsou asociovány s rozvojem nespecifikovaných zánětů střev, přičemž 19 z nich bylo prokázáno pouze u pacientů s UC, nikoli s KRO.

### **8.2.3.1 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s ulcerózní kolitidou**

Podobně jako u KRO je role B lymfocytárních subpopulací u pacientů s UC neznámá. V obecných rysech se imunofenotypový profil B subpopulací v periferní krvi podobá profilu pacientů s KRO. U obou nemocí byl v periferní krvi popsán zvýšený počet časných nematurovaných plazmatických buněk (CD19+CD20–CD138+CD49–) oproti jejich počtu u zdravých kontrol. Tento zvýšený počet koreluje s aktivací choroby, přesto mezi oběma nemocemi existuje významný rozdíl (Hosomi, Oshitani et al. 2011). U pacientů s UC je up-regulovaná exprese CXCR3 na nematurovaných plazmatických buňkách v periferní krvi. CXCR3 je chemokinový receptor, mezi jehož funkce patří aktivace integrinů a chemotaktická migrace. Tento jev nebyl pozorován u pacientů s KRO. Pro UC je typická infiltrace nematurovaných plazmatických buněk do místa probíhajícího zánětu, a právě CXCR3 se zřejmě podílí na odlišném mechanismu usazování B lymfocytů v zánětem poškozené tkáni (Hosomi, Oshitani et al. 2011). Tyto závěry lze podložit i pozorováními *in situ*. Jinno, Ohtani et al. (2006) u pacientů s UC popsali Ki67+CD19+CD20- subpopulaci malých B lymfocytů v LPL (z angl. *lamina propria lymphocytes*), nacházejících se v histologickém řezu ve vysoké koncentraci u báze vředu. Ki-67 je buněčným identifikačním znakem proliferace, a je v buňce přítomný během všech aktivních fází buněčného cyklu (G1, S, G2 a M). Z této subpopulace je významný počet CD138+. To svědčí o tom, že se jedná o linii nematurovaných plazmatických buněk, což je v kontrastu s nálezem a distribucí LPL u pacientů s KRO, u kterých jsou plazmatické buňky CD19- a Ki67low (Jinno, Ohtani et al. 2006).

Výsledky získané ze studia B lymfocytárních populací v rámci našeho B buněčného panelu ukazují, že při studiu CD19+CD27+ populace paměťových B lymfocytů postačuje přidání aktivačního markeru CD20 a IgM a najdeme signifikantní rozdíl ve frekvenčním zastoupení populace CD19+CD27+CD20+IgM- B lymfocytů u pacientů s nespecifickým zánětem střev. U pacientů s Crohnovou chorobou je frekvence jejich výskytu snížena, oproti tomu frekvence této populace u pacientů s ulcerózní kolitidou je zvýšena (Suchá 2016).

## **8.3 Nádorová onemocnění**

### **8.3.1 Kolorektální karcinom**

Kolorektální karcinom, někdy označovaný jako rakovina tlustého střeva a konečníku, (dále jen CRC), je zhoubným nádorovým onemocněním trávicího traktu, které postihuje

především sliznici tlustého střeva, tračníku a konečníku. Jedná se o velmi heterogenní onemocnění, na jehož rozvoji se podílí vzájemná interakce genetických, epigenetických a environmentálních faktorů (Binefa, Rodríguez-Moranta et al. 2014). CRC je civilizačním onemocněním, v celosvětovém měřítku je jeho incidence závislá na míře ekonomické vyspělosti země. Příznaky a symptomy zahrnují krev ve stolici, změny v motilitě střeva, úbytek váhy a významnou únavnost.

V České republice je CRC nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem trávicího ústrojí. Informace o údajích a postavení CRC v celosvětovém měřítku se v jednotlivých zdrojích nepatrně liší, přesto lze sumarizovat, že CRC je třetím nejčastějším typem rakoviny u mužů (přední příčky zaujímají rakovina plic a prostaty) a po rakovině prsu druhým nejčastějším typem rakoviny u žen (Binefa, Rodríguez-Moranta et al. 2014).

Ve více než 80 % je výskyt CRC sporadický (Kala 2008). Mezi hlavní exogenní rizikové činitele při vzniku a rozvoji CRC patří „západní“ životní styl, na tuky a cukry bohatá dieta, nedostatečná pohybová aktivita, kouření a konzumace alkoholu (Eaden, Abrams et al. 2001, Kala 2008, Chan a Giovannucci 2010, Watson a Collins 2011, Binefa, Rodríguez-Moranta et al. 2014). Zvýšené riziko rozvoje CRC mají pacienti s cukrovkou, obezitou. Významně zvýšené riziko rozvoje CRC hrozí pacientům, kteří jsou diagnostikováni s KRO nebo UC (Eaden, Abrams et al. 2001). Nejvýznamnějšími endogenními činiteli jsou pohlaví a věk. CRC je častěji diagnostikován u mužů a riziko rozvoje onemocnění významně stoupá u lidí nad 50 let. Asi jen u 20 % diagnostikovaných případů CRC lze prokázat dědičnou zátěž (Kala 2008).

Klinický obraz CRC je heterogenní, závisí na velikosti mechanické překážky ve střevě a její lokalizaci. Nejčastějšími příznaky je změna defekačního vzorce pacienta, plynatost, kolikovitá bolest, případně neprůchodnost střev (*ileus*), nechutenství, úbytek hmotnosti a celkový diskomfort. Připojit se může krvácení do trávicího traktu, které je průkazné makroskopicky nebo mikroskopicky, a může se též projevovat anémií pacienta. Komplikací se může stát v případě perforace nádoru akutní peritonitida. Přidruženým symptomem rakoviny konečníku jsou pocity neúplného či nedostatečného vyprázdnění při defekaci (*tenesmus*) (Klener a Karlova 2011).

### 8.3.2 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s kolorektálním karcinomem

U onkologických pacientů dochází velmi běžně k aktivaci B lymfocytů, což může značit, že B lymfocyty hrají důležitou roli v nádorové imunitě (Nelson 2010). U pacientů s CRC se objevují terciární lymfoidní struktury (angl. *tertiary lymphoid structures*, TLS), které kromě CD4+CD8+ T lymfocytů a DC obsahují subpopulace CD20+ B lymfocytů, které jsou označovány jako TIL-B (*CD20+ tumor infiltrating B cells*). Barbera-Guillem, Nelson et al. (2000) prokázali, že u pacientů s pokročilou formou CRC je v periferní krvi, v porovnání se zdravými kontrolami, menší množství cirkulujících CD19+ B lymfocytů. Zároveň pozorovali, že u této populace CD19+ B lymfocytů dochází k hyperexpresi molekuly CD21, tj. že v periferní krvi těchto pacientů cirkuluje signifikantně větší množství CD19+CD21++ B lymfocytů. Procento IgD-CD27+ paměťových buněk v periferní krvi pacientů s CRC je až dvojnásobně vyšší, než je tomu u zdravých kontrol, což by mohlo znamenat, že CRC ovlivňuje B lymfocytární homeostázu (Shimabukuro-Vornhagen, Schlosser et al. 2014). Současně bylo zjištěno, že periferní krev pacientů s CRC obsahuje vyšší procento aktivovaných B lymfocytů (CD19+CD20+CD86+), vyšší počet CD19+CD20–CD38<sup>high</sup> plazmatických buněk (tato populace měla současně velice silnou expresi CD27) a zvýšený počet CD24<sup>high</sup>CD27+ regulačních B lymfocytů (Shimabukuro-Vornhagen, Schlosser et al. 2014).

### 8.3.3 Nádorová onemocnění slinivky břišní

Nádorová onemocnění slinivky břišní zahrnují heterogenní skupinu onemocnění, která se svou povahou řadí mezi nejzhoubnější procesy v oblasti trávicí soustavy. Nádorová onemocnění slinivky břišní jsou vysoce maligní, benigní formy jsou vzácné (Leffler 2002). Morfologicky je 90 % nádorů slinivky břišní tvořeno karcinomem, 3 – 5 % představují neuroendokrinní nádory a 5 – 7 % představují nehomogenní cystické nádory (Leffler 2002). Existuje několik histologických typů karcinomu slinivky břišní. Duktální adenokarcinom, který je nalézán v 95 % případů, je nejzhoubnějším typem, zbylých 5 % diagnostikovaných případů představují cystické adenokarcinomy, acinární karcinom a intraduktální papilárně mucinózní karcinom (Leffler 2005). Nemoc má velmi nespecifickou symptomatologii, kam se řadí únavnost, zvýšená depresivita, hubnutí, nechutenství či bolesti v zádech. I proto dochází k podchycení choroby v pozdních stádiích a prognóza dalšího vývoje je velmi špatná (Pešková a Šváb 2003, Hlavsa, Man et al. 2008).

Incidence nádorů slinivky břišní se v České republice pohybuje kolem 15 až 20 případů na 100 000 obyvatel za rok, a má vzestupnou tendenci. Karcinomem jsou častěji postiženi muži než ženy (v poměru 1 : 1,5), a riziko rozvoje karcinomu vzrůstá s věkem (Leffler 2002, Pešková a Šváb 2003).

Mezi exogenní etiologické faktory patří kouření, vysokokalorická dieta s převahou živočišných tuků a bílkovin, nadváha, zvažuje se vliv zvýšené konzumace alkoholu a kávy, pracovního prostředí v chemických provozech (Leffler 2002, Pešková a Šváb 2003, Leffler 2005). Mezi významné endogenní činitele a zároveň identifikační znaky rozvoje karcinomu slinivky břišní patří především věk. Incidence choroby se strmě zvyšuje u osob nad 30 let. Dalšími jsou některá onemocnění, jako je chronický zánět slinivky a cukrovka. U chronické pankreatitidy se zvýšení rizika rozvoje karcinomu zvyšuje až 16x, studuje se genetická predispozice v případech zvýšeného familiárního výskytu nádorových onemocnění slinivky břišní (hereditární pankreatitida), ale i výskyt dalších hereditárních syndromů jako je Lynchův syndrom či BRCAII (Pešková a Šváb 2003).

#### **8.3.4 Identifikované populace B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s nádorovým onemocněním slinivky břišní**

V současné době bylo publikováno několik studií zaměřených na B lymfocytární populace a jejich funkci u pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu. Gunderson, Kaneda et al. (2016) došli k závěru, že B lymfocyty spolu s FcR $\gamma$ -aktivovanými myeloidními buňkami a některými makrofágy hrají klíčovou roli v regulaci funkčních vlastností CD8+T lymfocytů. Jako hlavní regulátory nádorové suprese identifikují BTK a PI3K $\gamma$ . Ve své studii prokázali (Gunderson, Kaneda et al. 2016), že jak u lidí, tak u myši dochází ve slezině k aktivaci tumor-rezidentních CD20+, CD11b+ a Fc $\gamma$ RI/III+ buněk (v porovnání s periferní krví).

Pylyayeva-Gupta, Das et al. (2016) zjistili, že významnou roli v rozvoji neoplázií pankreatu hrají B lymfocyty s fenotypem CD19+CD1dhiCD5+, a to prostřednictvím sekrece cytokinu IL-35, který se zapojuje do tumorigeneze.

## 9 Materiál a metody

### 9.1 Chemikálie, roztoky a monoklonální protilátky

#### 9.1.1 Chemikálie

Systematický název/název	Vzorec/označení	Výrobce
Azid sodný	NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deionizovaná H <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O	vlastní výroba, systém Millipore, Billerica, USA
Dihydrogen fosforečnan draselný	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	Penta, Chrudim, ČR
Hoechstovo barvivo	Hoechst 33258	Hoechst A, Frankfurt nad Mohanem, Německo
Chlorid draselný	KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chlorid sodný	NaCl	Lachema, Neratovice, ČR
Lymphoprep ( ρ: 1,007 ± 0,001 g/ml při 20 °C)		Axis-ShealdsPoC, Oslo, Norsko
Trypanová modř, Trypan Blue stain 0,4%	C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	Invitrogen, Carlsbad, USA
Želatina		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

#### 9.1.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátka	Označení	Klon	Výrobce
Mouse anti-human CD19	PE-Cy7	SJ25C1	BD Pharmingen, San Jose, USA
Izotypová kontrola myši IgG1 negativní	pro všechny fluochromy		Dako, Glostrup, Dánsko
Mouse anti-human CD20	PerCP-Cy5.5	2H7	eBioscience, San Jose, USA
Mouse anti-human CD21	APC	HB5	eBioscience, San Jose, USA
Mouse anti-human CD24	PE	SN3 A5-2H10	eBioscience, San Jose, USA
Mouse anti-human CD27	APC-H7	M-T271	BD Bioscience, San Jose, USA
Mouse anti-human CD38	Alexa Fluor 700	HIT2	BD Bioscience, San Jose, USA
Mouse anti-human IgM	FITC	SA-DA4	eBioscience, San Jose, USA
IgA	BV655	M24A	BioLegend, San Diego, USA
IgD	BV510	IA6-2	BioLegend, San Diego, USA
IgG	BV605	G18-145	BioLegend, San Diego, USA

### 9.1.3 Roztoky

#### 9.1.3.1 Pufrovaný fyziologický roztok

Pufrovaný fyziologický roztok (angl. *Phosphate Buffered Saline*, dále jen PBS) se používá pro stabilizaci pH v neutrální až lehce zásadité oblasti (pH 6 – 8,5). Pro potřeby experimentu jsme využili PBS ve dvou koncentracích: 10 x PBS a 1 x PBS. V první fázi jsme připravili 10x PBS.

Navážili a smíchali jsme 80 g NaCl, 2 g KCl, 29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O a 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Doplnili do objemu 1000 ml ddH<sub>2</sub>O a za stálého míchání rozpustili. Pomocí HCl jsme upravili pH na 7,2 – 7,4. Ve druhém kroku jsme připravili 1x PBS naředěním již připraveného 10x PBS destilovanou vodou, a opět zkontrolovali pH. Přehled viz Tabulka 5.

10x PBS	
Chemikálie	Navážka
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	29 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
ddH <sub>2</sub> O	Doplnit do 1000 ml

Tabulka 5 Složení potřebných roztoků PBS

1x PBS	
Chemikálie	Objem
10 x PBS	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	90 ml

#### 9.1.3.2 Promývací roztok

Promývací roztok (angl. *Wash/Staining Buffer*, dále jen WSB) slouží jako ředidlo protilátek a pufr při promývání buněk, které budou značeny imunofluorescenčními barvivy. Obsahuje želatinu, která snižuje nespecifickou vazbu protilátek a fluorochromů na cílové buňky, a metabolický inhibitor NaN<sub>3</sub>, který brání difuznímu pohybu integrálních proteinů na úrovni buněčné membrány (tzv. „*patching and capping*“).

Navážili jsme 1 g NaN<sub>3</sub> a dobře jej rozpustili v malém množství ddH<sub>2</sub>O. V tomto roztoku jsme rozpustili 4 ml želatiny a za stálého míchání doplnili ddH<sub>2</sub>O do objemu 1000 ml.

WSB	
Chemikálie	Navážka/objem
želatina	4 ml
NaN <sub>3</sub>	1 g
1x PBS	Doplnit do 1000 ml

Tabulka 6 Složení roztoku WSB

### 9.1.3.3 Použité přístrojové vybavení

Použito bylo přístrojové vybavení BTÚ AV ČR, v. v. i., Střediska Cytometrie a Mikroskopie MBÚ AV ČR, v. v. i. a Laboratoře molekulární antropologie Katedry antropologie a genetiky člověka PřF UK v Praze.

Přístroj	Výrobce
Automatické pipety	Gilson, Middleton, USA
Carl Zeiss Primovert inverzní mikroskop s AxioCam ERc 5 s kamerou	Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Německo
Centrifuga Alegra X-22R Centrifuge	Beckman-Coulter, Fulerton, USA
Digitální váha	Sartorius AG, Göttingen, Německo
pH metr inoLab p720	WTW, Weilheim, Německo
Průtokový cytometr LSRII	Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA
Vortex V-1 plus	Biosan, Riga, Litva
Výrobce ledu Bar line B 21 AS/WS	Frimont, Miláno, Itálie

Tabulka 7 Seznam přístrojového vybavení

### 9.1.3.4 Software

Pro pořízení, analýzu a zpracování dat byly kromě standardních programů balíku MS Office 365 PRO použity programy Diva v 5.0.1, GraphPadPrism 6 a Kalusa Analysis 1.5a.

Program	Výrobce
Diva v 5.0.1	Becton & Dickinson, Franklin Lakes, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Kalusa Analysis 1.5a	Beckman-Coulter, Fulerton, USA

Tabulka 8 Seznam použitého softwaru

### 9.1.3.5 Ostatní spotřební materiál

Popis	Výrobce
Latexové rukavice Sempercare	Sempermed, Northhamptonshire, VB
Mikrotitrační destičky (96 jamek)	TPP AG, Trasadingen, Švýcarsko
Eppendorfovy mikrozkuřavky	Eppendorf, Hamburg, Německo
Špičky k pipetám	Gilson, Middleton, USA
Pasteurovy pipety	Biologix Research Company, Lenexa, USA
Zkuřavky se šroubovacím uzávěrem (50 ml)	TPP AG, Trasadingen, Švýcarsko
Zkuřavky SepMate™	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada

Tabulka 9 Seznam použitého spotřebního materiálu

## 9.2 Vzorky periferní krve

Vzorky periferní krve kontrol a pacientů byly získány ve spolupráci s MUDr. Michaelou Schneiderovou z 1. Chirurgické kliniky – břišní, hrudní a úrazová chirurgie 1. LF a VFN v Praze (CRC a GC), s primářkou MUDr. Marií Sedláčkovou z Revmatologického a rehabilitačního oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze (CP, RA a AS); s MUDr. Annou Jonášovou z 1. Interní kliniky – hematologie 1. LF UK a VFN v Praze (MDS/AA a AA) a MUDr. Jánem Lakotou z Ústavu experimentálnej onkológie SAV v Bratislavě (MM). Všechny vzorky periferní krve byly získány na základě předem uděleného informovaného souhlasu a v souladu s etickým kodexem příslušné instituce.

### 9.2.1 Odběr periferní krve

Vzorky periferní krve pacientů i kontrol byly odebrány do 9 ml zkumavky s K<sub>3</sub>EDTA v odběrových ordinacích spolupracujících pracovišť. Po přenosu do laboratoře ke zpracování, byly tyto vzorky označeny číslem podle pořadí, ve kterém byly přijaty.

### 9.2.2 Izolace periferních mononukleárních buněk (PBMC)

V závislosti na době, která uběhla od odběru do zpracování, byly použity dva standardizované protokoly. Protokol A, podle kterého se postupovalo v případě, že vzorky byly zpracovávány v den odběru. Protokol B, který byl použit v případě, že vzorky krve byly zpracovány až následujícího dne. V tomto případě byly vzorky přes noc uchovávány při pokojové teplotě.

#### 9.2.2.1 Protokol A

Základní charakteristikou postupu podle Protokolu A je použití zkumavek SepMate™ (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada). Celý postup probíhá za pokojové teploty, a je časově méně náročný.

1. Pomocí Pasteurovy pipety jsme do 50 ml zkumavky SepMate™ nanесли 15 ml hustotního gradientového média Lymphoprep™ tak, aby byl prostor separační komory zcela vyplněn.
2. Vzorek periferní krve jsme přelili do sterilní 50 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zředili v poměru 1:1 1x PBS a pomocí Pasteurovy pipety jemně promíchali.

3. Na membránu zkumavky SepMate™ jsme pomocí Pasteurovy pipety opatrně nanесли 30 ml suspenze buněk periferní krve a 1x PBS získané v kroku 2.
4. Vzorek ve zkumavce SepMate™ jsme umístili do centrifugy a nechali stočit při nastavení:

Otáčky/min.	G	Čas	Teplota (°C)	Akcelerace	Decelerace
1200	277	10	15	7	7

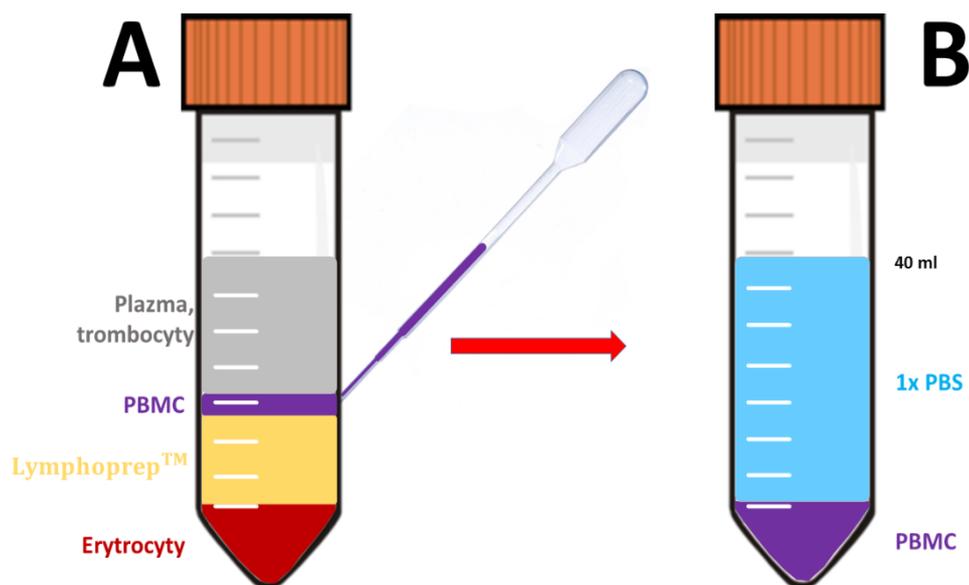
5. Po centrifugaci jsme vzniklý supernatant (tekutou část) vylili. Vzniklou peletu (pevnou část) jsme resuspendovali v nové kapalně fázi pomocí 20 ml 1x PBS za použití nové 50 ml sterilní zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
6. Takto získanou buněčnou suspenzi jsme stočili na centrifuze podle kroku 4.
7. Po centrifugaci jsme supernatant vylili. Vzniklou peletu jsme resuspendovali pomocí Pasteurovy pipety v nové kapalně fázi pomocí 2 – 10 ml WSB, podle míry zákalu.

#### 9.2.2.2 Protokol B

1. Připravili jsme si 50ml sterilní zkumavku se šroubovacím uzávěrem, do které jsme připravili 50ml média Lymphoprep™.
2. Vzorek periferní krve jsme přelili do sterilní 50 ml zkumavky se šroubovacím uzávěrem a zředili v poměru 1:1 1x PBS a pomocí Pasteurovy pipety jemně promíchali.
3. Pomocí Pasteurovy pipety jsme pomalu navrstvili vzorek získaný v kroku 2 na povrch média ve zkumavce připravené v kroku 1.
4. Takto připravený vzorek jsme stočili na centrifuze při nastavení:

Otáčky/min.	G	Čas	Teplota (°C)	Akcelerace	Decelerace
1600	400	40	15	0	0

5. Po provedení centrifugace jsme za pomoci Pasteurovy pipety odebrali prsteneček PBMC a přenesli jej do nové sterilní 50ml zkumavky (viz Obrázek 14, na straně 80).



Obrázek 14 Schéma rozvrstvení a odběru PBMC ze vzorku po první centrifugaci (A) a jeho příprava pro centrifugaci v kroku 5 podle protokolu (B)

6. Buněčnou suspenzi z kroku 5 jsme doplnili pomocí 1x PBS na objem 40 ml a nechali centrifugovat při nastavení:

Otáčky/min.	G	Čas	Teplota (°C)	Akcelerace	Decelerace
1200	277	10	15	7	7

7. Po centrifugaci jsme vzniklý supernatant vylili. Vzniklou peletu jsme resuspendovali v nové kapalné fázi pomocí 20 ml 1x PBS za použití nové 50 ml sterilní zkumavky se šroubovacím uzávěrem.
8. Takto získanou buněčnou suspenzi jsme stočili na centrifuze podle kroku 6.
9. Po centrifugaci jsme supernatant vylili. Vzniklou peletu jsme resuspendovali pomocí Pasteurovy pipety v nové kapalné fázi pomocí 2 – 10 ml WSB, podle míry zákalu.

### 9.2.3 Zjištění množství PBMC a metoda stanovení životnosti buněk

Abychom mohli vzorek úspěšně analyzovat na průtokovém cytometru, potřebovali jsme zjistit množství PBMC na 1 ml vzorku. Pro stanovení monokontrol a FMO kontrol musí vzorek určený ke značení fluorochromy obsahovat alespoň 500 000 živých PBMC, vlastní vzorky (tzv. mixy) pak musí obsahovat alespoň 1 000 000 živých PBMC.

Ke stanovení životnosti a počítání buněk jsme použili kolorimetrickou metodu za použití trypanové modři. Tato metoda je založena na propustnosti buněčných membrán, kdy živé buňky jsou schopny barvivo vyloučit. Porušená membrána mrtvých buněk umožňuje

prostoupení barviva do cytoplazmy, a proto se mrtvá buňka zbarví modře. Životnost a počet buněk jsme hodnotili mikroskopicky za použití Fuchs-Rosenthalovy komůrky a světelného mikroskopu (zvětšení 400x)

### 9.2.3.1 Postup

1. Do Eppendorfovy zkumavky jsme pipetou odebrali 50  $\mu$ l suspenze PBMC ve WSB.
2. Do této suspenze jsme přidali 5  $\mu$ l trypanové modři a důkladně promíchali za pomoci pipety.
3. Připravenou Fuchs-Rosenthalovu komůrku jsme naplnili obarvenou suspenzí získanou v kroku 2.
4. Pod světelným mikroskopem jsme při nastavení zvětšení na 400x počítali všechny živé buňky ve 4 velkých čtvercích Fuchs-Rosenthalovy komůrky.
5. Pro získání počtu (koncentrace) buněk v 1 ml suspenze jsme použili následující vzorec: (počet živých buněk x 4)/100.
6. Pro potřeby pipetování na mikrotitrační destičku jsme potřebovali zjistit, jaký objem suspenze budeme pipetovat do jedné jamky. Zde jsme použili vzorec: 500 / počet PBMC v 1 ml pro stanovení objemu monokontrol a FMO kontrol. Pro potřeby tzv. mixu jsme postupovali podle vzorce: (500 / počet PBMC) x 2.

### 9.2.4 Příprava protilátek

Pro potřeby experimentu byla potřeba připravit si protilátky a WSB ve správném poměru a ředění v závislosti na tom, k jakému účelu byly použity a kolik vzorků bylo analyzováno. V našem protokolu se používají následující označení: monokontroly, FMO kontroly a MIXy. Monokontroly obsahují vždy jen jednu monoklonální protilátku ve WSB. Slouží pro nastavení cytometru a pro vytvoření kompenzací potřebných pro analýzu. FMO kontroly (z angl. *fluorescence minus one controls*) obsahují všechny monoklonální protilátky ve WSB s výjimkou té, pro kterou slouží jako minus kontrola. FMO kontroly jsou nutné pro vymezení negativních a pozitivních subpopulací buněk, a tedy k vymezení jednotlivých B buněčných subpopulací. MIX obsahuje všechny monoklonální protilátky ve WSB a slouží pro vlastní měření konkrétního vzorku.

### 9.2.4.1 Postup

1. Připravili jsme si a číselně označili Eppendorfovy zkumavky pro monokontroly, FMO kontroly a MIXy.
2. Do takto připravených zkumavek jsme pipetovali WSB v množství potřebném pro daný experiment (viz Tabulka 10, strana 82, sloupec V WSB).
3. Do Eppendorfových zkumavek jsme pipetovali monoklonální protilátky v množství potřebném pro daný experiment (viz Tabulka 10, strana 82, sloupec V MoAB na test).

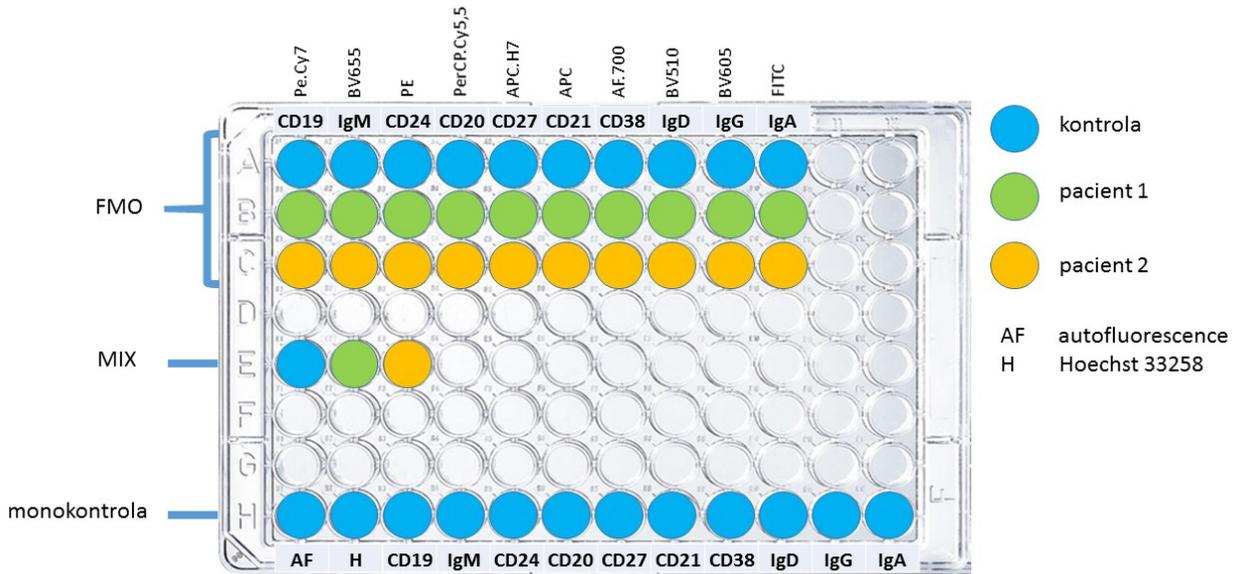
Monokontroly	ředění	počet vzorků	Test V (μl)	V MoAb na test (μl)	V WSB (μl)	V každé MoAb (μl)
CD19-Pe-Cy7	20	1	46	2	43,7	
IgM-BV655	20	1	46	2	43,7	
CD24-PE	20	1	46	2	43,7	
CD20-PerCP-Cy5.5	20	1	46	2	43,7	
CD27-APC H7	20	1	46	2	43,7	
CD21-APC	20	1	46	2	43,7	
CD38- Al. Fluor 700	20	1	46	2	43,7	
IgD-BV510	20	1	46	2	43,7	
IgG-BV605	20	1	46	2	43,7	
IgA-FITC	20	1	46	2	43,7	
FMO kontroly	ředění	počet vzorků	Test V (μl)	V MoAb na test (μl)	V WSB (μl)	V každé MoAb (μl)
-CD19-Pe-Cy7	20	1	46		25,3	2,3
-CD24-PE	20	6	161		88,55	8,1
-CD20-PerCP-Cy5.5	20	6	161		88,55	8,1
-CD27-APC H7	20	6	161		88,55	8,1
-CD21-APC	20	6	161		88,55	8,1
-CD38- Al. Fluor 700	20	6	161		88,55	8,1
-IgD-BV510	20	6	161		88,55	8,1
-IgG-BV605	20	6	161		88,55	8,1
-IgA-FITC	20	6	161		88,55	8,1
-IgM-BV655	20	1	46		25,3	2,3
MIX	20	6	161	8	80,5	8,1

Tabulka 10 Tabulka pro výpočet ředění mAb

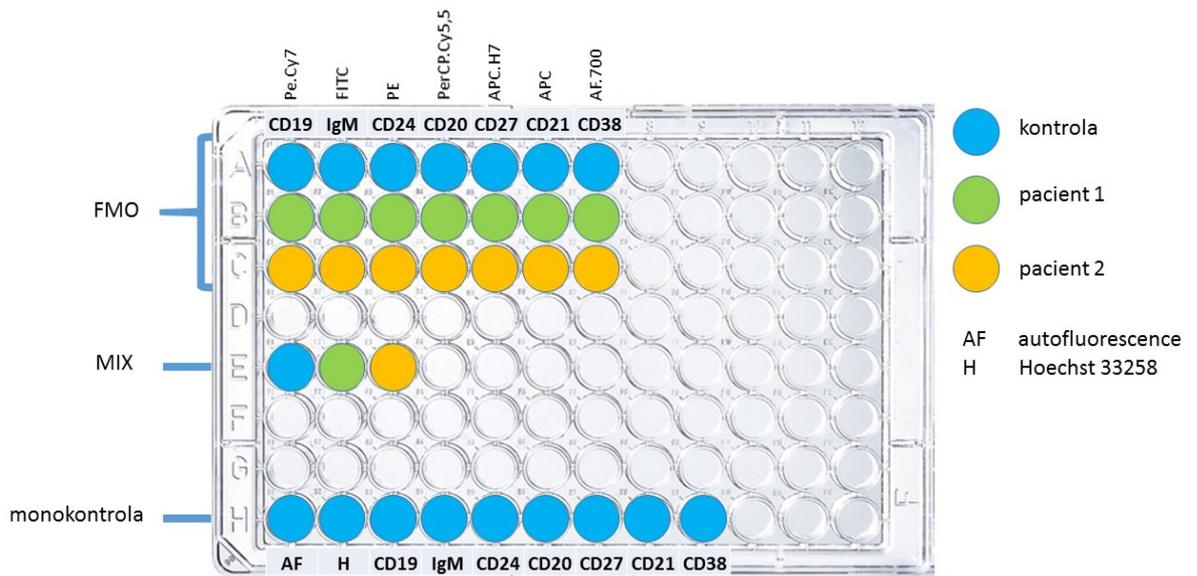
### 9.2.5 Značení buněk pro měření na průtokovém cytometru

Vlastní značení buněk v mikrotitrační destičce pro měření na průtokovém cytometru probíhalo podle dvou standardizovaných protokolů. Protokol A (osmibarevný panel) byl používán pro vzorky získané a analyzované do konce roku 2014. Tento panel zahrnoval analýzu následujících znaků – CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38 a IgM. Od ledna 2015 byl implementován Protokol B (jedenáctibarevný panel), který vznikl rozšířením původního osmibarevného panelu o další tři monoklonální protilátky: IgD, IgA a IgG. Rozvržení

experimentu podle jedenáctibarevného panelu bylo připraveno v závislosti na počtu vzorků, podle schématu, které znázorňuje Obrázek 15 na straně 83 (osmibarevný panel *a simile*, Obrázek 16 na straně 83). Veškeré manipulace s buňkami a protilátkami v mikrotitrační destičce byly prováděny na tající ledové tříšti.



Obrázek 15 Schéma rozvržení experimentu pro jedenáctibarevný protokol a značení v mikrotitrační destičce



Obrázek 16 Schéma rozvržení experimentu pro osmibarevný protokol a značení v mikrotitrační destičce

### 9.2.5.1 Postup značení a promývání vzorku v mikrotitrační destičce

1. Do mikrotitrační destičky jsme podle schématu experimentu pipetou nanесли vypočítané množství suspenze PBMC ve WSB.
2. Na každý vzorek jsme nanесли 100  $\mu$ l WSB a centrifugovali při nastavení:

Otáčky/min.	G	Čas	Teplota (°C)	Akcelerace	Decelerace
1200	177	10	15	7	7

3. Odstranili jsme supernatant tak, že jsme destičku rychlým pohybem překlípili nad výlevkou a překlípnou ji nechali chvíli vyschnout na filtračním papíru. Tímto postupem jsme se zbavili přebytečné tekutiny.
4. Destička byla připravena ke značení monoklonálními protilátkami.
5. Do každé jamky mikrotitrační destičky jsme za pomoci pipety nanесли 20  $\mu$ l naředěných protilátek podle toho, zda se jednalo o monokontrolu, FMO kontrolu nebo MIX.
6. Po nanesení se nechaly monoklonálními protilátkami označené vzorky v mikrotitrační destičce inkubovat 25 – 30 minut na tající ledové tříšti za absence světla (v temnu v lednici).
7. Po inkubaci jsme do každé jamky přidali 100  $\mu$ l WSB a mikrotitrační destičku se vzorky stočili na centrifuze při stejném nastavení jako v kroku 2.
8. Opakovali jsme postup uvedený v kroku 3 s tím, že jsme důsledně dbali na to, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých jamek sousedními protilátkami.
9. Do každé jamky jsme nanесли 100  $\mu$ l WSB a mikrotitrační destičku stočili na centrifuze při stejném nastavení jako v kroku 2.
10. Odstranili jsme supernatant podle kroku 3 a zopakovali jsme postup podle kroku 9.
11. Po odstranění supernatantu podle kroku 3 jsme do každé jamky pipetou nanесли 200  $\mu$ l WSB, destičku zabalili do alobalové folie.
12. Destička byla připravena k měření na průtokovém cytometru. V případě, že jsme nemohli provést měření na průtokovém cytometru v den přípravy destičky, uchovávali jsme ji v lednici nejpozději do druhého dne.

### 9.2.6 Měření na průtokovém cytometru

Měření všech vzorků probíhalo ve Středisku Cytometrie a Mikroskopie (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.) na přístroji LSR II za použití softwaru Diva v 5.0.1 (Becton & Dickinson, Franklin Lake, USA). Měření byla prováděna za asistence RNDr. Jana Svobody, PhD. Vždy 10 minut před zahájením každého měření na průtokovém cytometru bylo

do jednotlivých jamek pro všechny FMO kontroly a do jamky pro monokontrolu Hoechst přidáno vitální barvivo Hoechst 33258.

### 9.3 Vyhodnocení dat

Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno za použití programu Kaluza Analysis v1.5a. na základě stanovené strategie vymezení (tzv. *gate strategy*). Použité strategie vymezení vycházejí z prací Warnatze (CD21-CD38-; (Warnatz, Denz et al. 2002)), Kleina (CD27-CD20-; CD27-CD20+; CD27+CD20+; CD27+CD20-; (Klein, Rajewsky et al. 1998)), Benitezové (CD27-; (Benitez, Weldon et al. 2014)), Vlkové (CD21+CD38+; (Vlkova, Fronkova et al. 2010)), Berkowské (CD19+)(Berkowska, Driessen et al. 2011) a Poláka (CD21/CD20 (Polák 2016, nepublikováno)). Protokol pro zpracování vzorků programem Kaluza Analysis v1.5a byl vytvořen Mgr. Milanem Polákem ve spolupráci s Helenou Havelkovou a RNDr. Šárkou Růžičkovou, PhD.

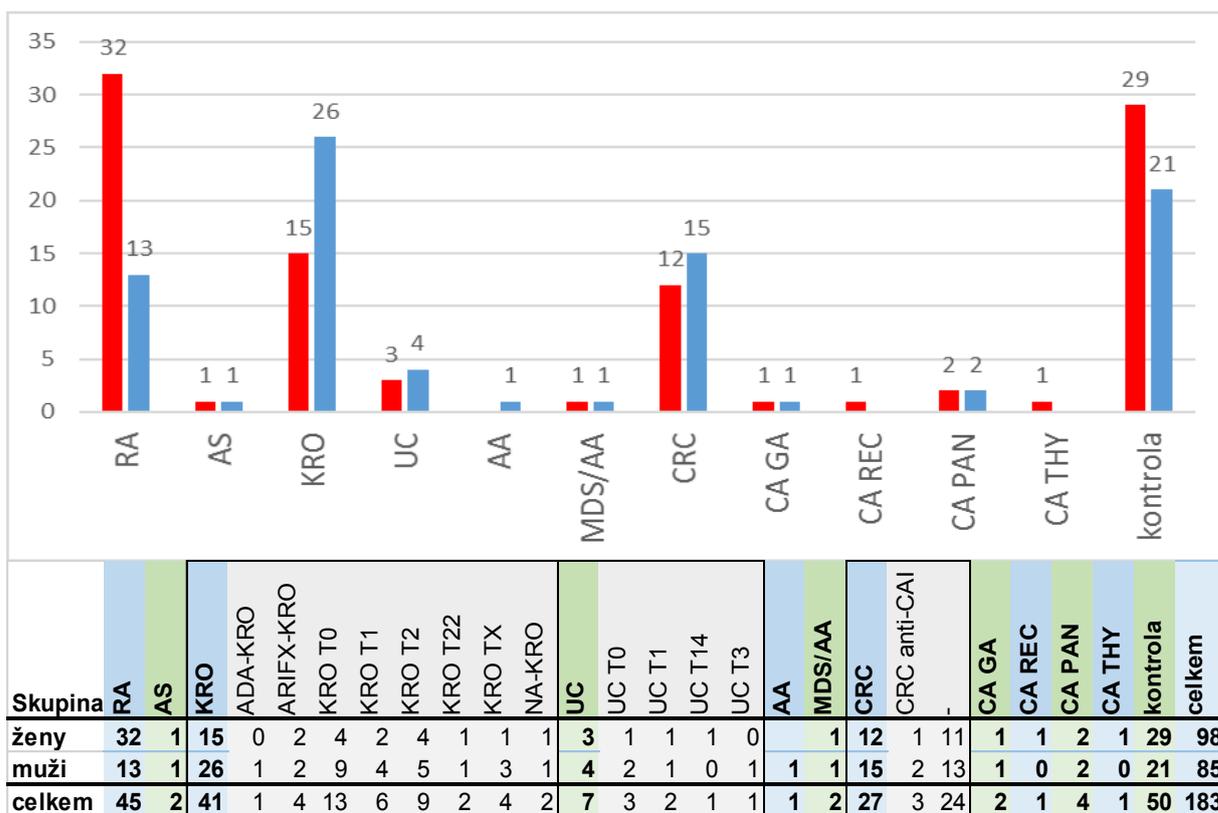
Všechny vzorky byly analyzovány pomocí dvojrozměrných bodových diagramů (tzv. *dot plot* diagramů). Dvojrozměrné bodové diagramy umožňují vizualizaci buněčných populací, neboť znázorňují všechny částice ve vzorku, u kterých byla vybraná hodnota (např. FSC) vyšší než stanovený práh (tzv. *threshold*). V momentě, kdy buňka prochází svazkem laserového paprsku, dochází k odrazu a sběru informace prostřednictvím optických detektorů. Způsob, míra a intenzita této deviace u každé buňky je zaznamenán, digitalizován a následně vizualizován pomocí dot plot grafů, ve kterých jsou buňky znázorněny jako tečky. Na základě těchto informací můžeme velmi přesně oddělit jednotlivé buněčné populace.

Vlastní analýza výstupu z vícebarevné průtokové cytometrie spočívá na postupném logickém vydělování jednotlivých subpopulací ze zřetězených a vzájemně provázaných dvojrozměrných bodových grafů v závislosti na sledovaném znaku. Takto se daří vydělit a popsat subpopulace buněk se složitým expresním profilem.

## 10 Výsledky

Pro potřeby této diplomové práce bylo do analýzy zahrnuto celkem 183 vzorků PBMC odebraných 137 jedincům v rozmezí od 11. února 2014 do 26. června 2015. Opakovaný odběr proběhl u 17 dlouhodobě sledovaných pacientů, s Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou, kteří procházejí biologickou léčbou (anti-TNF biosimilarika), a u 8 zdravých jedinců (dále jen „kontrola“). Přehled počtů vzorků pro jednotlivé diagnózy v absolutních číslech znázorňuje graf a Tabulka 11 na straně 86.

V prostředí programu Kaluza Analysis 1.5a byly vyhodnoceny všechny patientské vzorky, nicméně pro potřeby statistického výkaznictví nebyly použity výsledky získané od pacientů po nasazení léčby (zahrnuty byly pouze odběry v T0) – vzhledem k tomu, že u nich dochází k rychlým změnám v profilu. Sledování těchto změn je podstatou souvisejících projektů zaměřených na monitorování kinetiky buněčné odpovědi na indikovanou léčbu.



Tabulka 11 Přehled skupin vzorků pacientů a kontrol se zohledněním pohlaví; červeně – ženy, modře - muži

## 10.1 Databáze pacientů a kontrol

Pro potřeby diplomové práce byla vytvořena přehledová databáze pacientů a kontrol, která byla z pracovního prostředí MS Excel převedena do formulářového formátu v prostředí MS Access. V této databázi jsou u jednotlivých vzorků vedeny následující záznamy: číslo vzorku, datum přijetí vzorku laboratoří, jméno a příjmení pacienta/kontroly, rok narození, diagnóza, informace o podstoupené léčbě (v případě, že pacient podstupuje biologickou léčbu, uvádí se údaj, zda se jedná o odběr v čase 0 nebo 2 hodiny po infúzi, případně opakované podání po 14 dnech biologické léčby apod.) a případné další medikaci, zda je k dispozici sérum či plazma, informaci o tom, na jakém typu průtokového cytometru byl vzorek měřen, nebo zda se buňky sortují pro potřeby molekulárně biologické analýzy, současně je propojena se soubory .fcs pro každý sledovaný vzorek. Paralelně byla sbírána klinická data, která nebyla pro tuto diplomovou práci využita, ale předpokládáme jejich zpracování v navazujícím disertačním projektu.

### 10.1.1.1 Sledované B-lymfocytární subpopulace a strategie vymezení

Protokol vymezení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů zahrnuje tři základní kroky. V první fázi se vymezi všechny živé buňky (*live*; FSC-A/Hoechst), ve druhé fázi se ze všech živých buněk vymezi singlety (*singlets*; FSC-A/ FSC-H), ve třetí fázi se ze všech živých singletů vymezi lymfocyty a monocyty (*lymphomono*; FSC-A/SSC-A) a v poslední fázi se zacílíme na vymezení CD19<sup>+</sup> lymfocytů ze skupiny všech živých lymfocytárních singletů (CD19<sup>+</sup>/SSC-A).

### 10.1.1.2 Definice sledovaných subpopulací

Při stanovení strategie vymezení hraje klíčovou úlohu rozdělení B lymfocytárních subpopulací do základních diferenciačních typů, proto jsme se v první fázi vyhodnocení FACS dat zaměřili na vymezení populací naivních (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), paměťových (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) a plazmatických (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) buněk. K tomuto účelu slouží strategie vymezení podle Kleina et al. (1998), viz Obrázek 19 na straně 90 a Obrázek 20 na straně 91.

Ve druhé fázi jsme rozdělili populaci CD19<sup>+</sup> lymfocytů na CD21<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>CD24<sup>+/-</sup> podle Warnatz, Denz et al. (2002), viz Obrázek 22 na straně 93, a Vlkova,

Fronkova et al. (2010), viz Obrázek 23 na straně 94. Tato populace B lymfocytů je označena jako  $CD21^{low}CD38^{low}$  lymfocyty.

Ve třetím kroku jsme se zaměřili na definici folikulárních lymfocytů I ( $IgM^{+}CD19^{+}CD21^{+}CD24^{+}CD27^{-}CD38^{low}$ ) a folikulárních lymfocytů II ( $IgM^{++}CD19^{+}CD21^{+}CD24^{+}CD27^{-}CD38^{low}$ ) podle Vlkova, Fronkova et al. (2010), viz Obrázek 23 na straně 94.

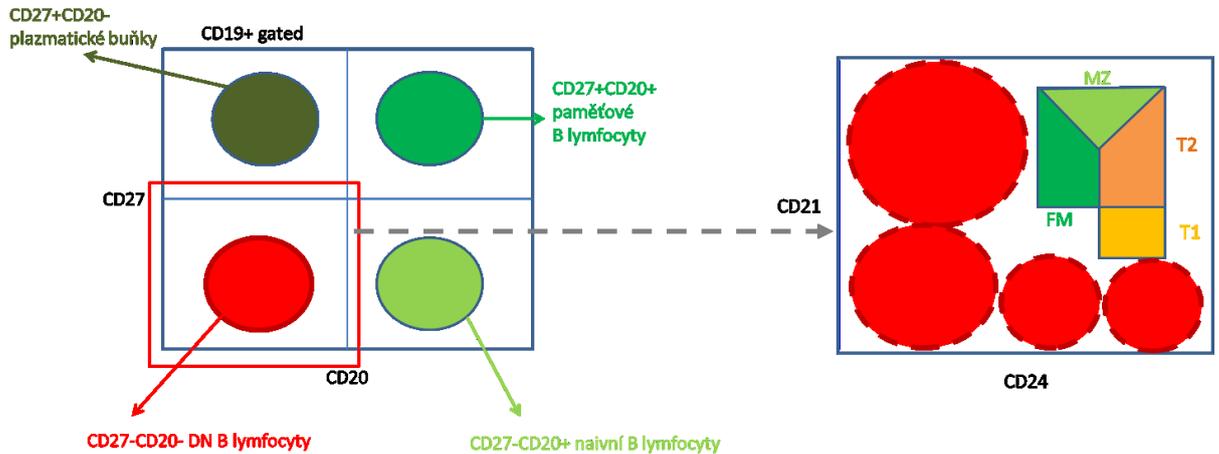
Čtvrtá fáze vyhodnocení byla zaměřena na nepaměťové lymfocyty, kde byly využity dva protokoly. Pomocí prvního protokolu došlo k vymezení B lymfocytů na nezralé tranzientní lymfocyty T1 ( $IgM^{+}CD19^{+}CD21^{low}CD24^{high}CD27^{-}$ ) a T2 ( $IgM^{+}CD19^{+}CD21^{high}CD24^{int}CD27^{-}$ ), zralé folikulární B lymfocyty ( $IgM^{+}CD19^{+}CD21^{int}CD24^{int}CD27^{-}$ ) a lymfocyty marginální zóny ( $IgM^{+}CD19^{+}CD21^{high}CD24^{high}CD27^{-}$ ) podle Benitez, Weldon et al. (2014), viz Obrázek 21 na straně 92. V rámci druhého protokolu jsme pozornost zaměřili na tranzientní a extratranzientní lymfocyty podle Berkowska, Driessen et al. (2011), viz Obrázek 24 na straně 95 a Obrázek 25 na straně 96.

Logiku provázání použitých protokolů znázorňuje Obrázek 18 na straně 89.

Tento složitě vypadající analyzačně-vyhodnocovací postup založený vycházející z kombinace klasických strategií vymezení byl vytvořen pro potřeby této diplomové práce. Jeho výhodou je, že nám umožňuje postihnout skutečně všechna stádia B lymfocytární diferenciaci v periferní krvi u lidí, a dokonce nám umožňuje identifikaci pravděpodobně ještě rannějších stádií než jsou transientní T1 B lymfocyty. K jeho sestavení bylo použito v první řadě vyhodnocení dle Kleina (1998), které umožnilo identifikaci  $CD19^{+}CD20^{-}CD27^{-}$  DN B lymfocytů, přičemž tato populace se po doplnění znaků jako je CD24 a CD21 ještě dále rozpadá na raritní populace, viz dále v textu.

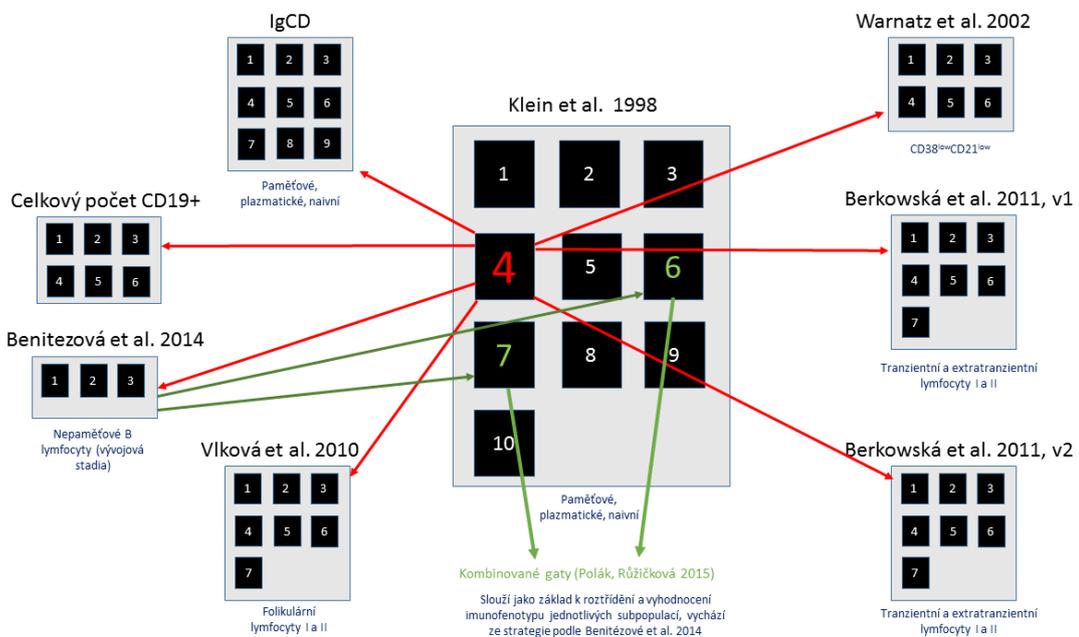
Navíc jsme zjistili, že schéma stanovení bran vymezení podle Benitezové (2014) nám při použití tzv. zpětné brány vymezení (*back gate*) spolehlivě ukazuje, zda identifikovaný subset představuje vyztřálé B lymfocyty nebo jejich ranější stádia (ještě před T1 B lymfocyty), která se pak vyskytují mimo oblast T1, T2, FM a MZ buněk. Tento předpoklad jsme opakovaně ověřili i pomocí schématu dle Kleina, kdy se paměťové a plazmatické buňky po použití zpětné

brány vymezení objevovaly v oblasti FM nebo MZ, zatímco naivní B lymfocyty spadaly do T2 a T1 oblasti, viz Obrázek 17 na straně 89.

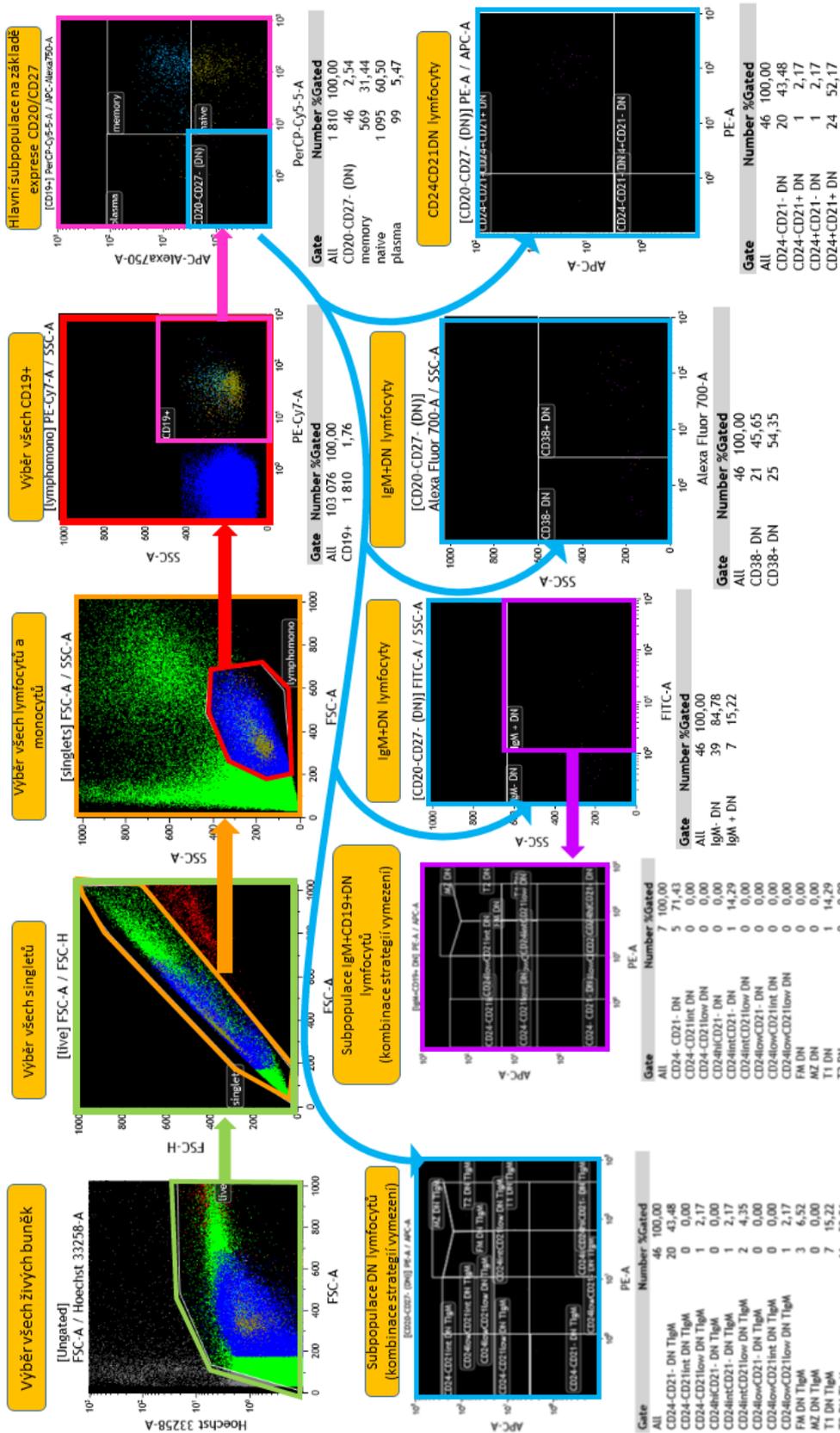


Obrázek 17 Schematické znázornění logiky sestavení strategie vymezení bran mezi klasickým schématem dle Kleina (1998) a Benítezovou (2014)

Jak se ukázalo, právě CD20-CD27- DN B buněčná populace je velmi zajímavá a bude jí věnována detailnější pozornost, protože zřejmě vykazuje znaky specifity pro určitý typ nemoci, anebo by mohla sloužit jako indikátor patologického stavu.



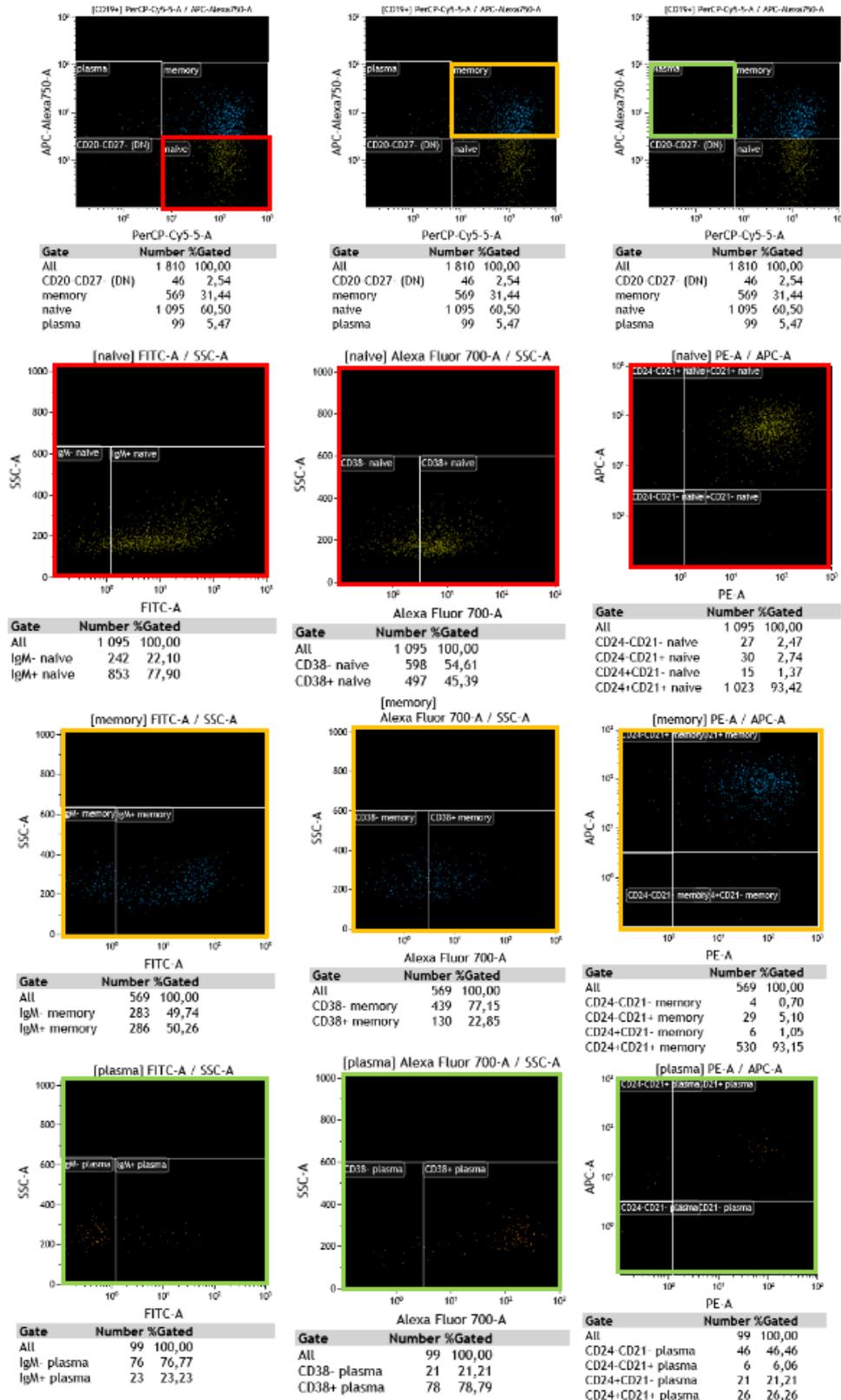
Obrázek 18 Vyhodnocení získaných dat, vizualizace propojení použitých protokolů.



vychází z postupného vyčleňování jednotlivých populací do různých tříd na oddělené frakce na základě vybraných markerů. Každá frakce se dále rozdělí k oddělení všech živých buněk na jednotlivé typy, tj. buňky, které jsou samostatné, nebo jsou součástí bočního rozptylu SSC-A a FSC-A. Tato analýza umožňuje pro jednotlivé typy vymezených populací

Obrázek 19 Základní rozdělení populací na naivní, paměťové a plazmatické, podle Klein et al. 1998 (vzorek č. 195)

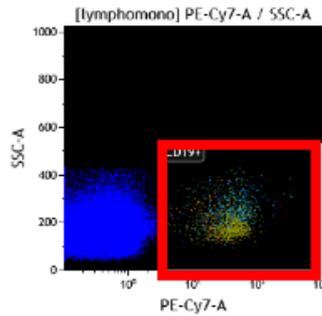
## Vnitřní heterogenita subpopulací naivních, paměťových a plazmatických buněk



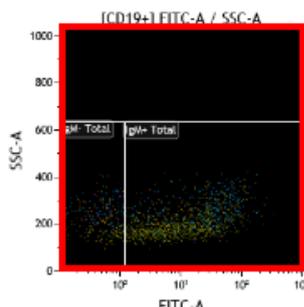
Obrázek 20 Strategie vymezení a heterogenita subpopulací naivních, paměťových a plazmatických buněk na základě exprese molekuly CD21, CD24, CD38 a IgM. Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze které je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

## Celkový počet CD19+ lymfocytů

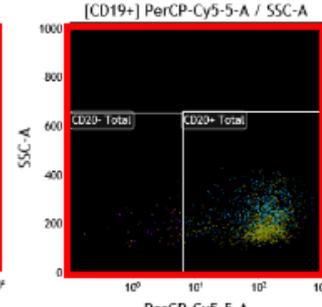
Výchozí gate  
Výběr všech CD19+ dle Kleina



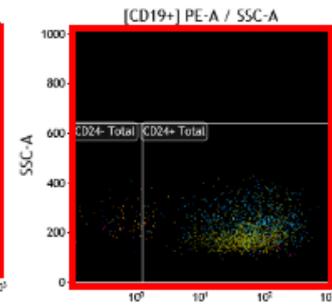
Gate	Number	%Gated
All	103 076	100,00
CD19+	1 810	1,76



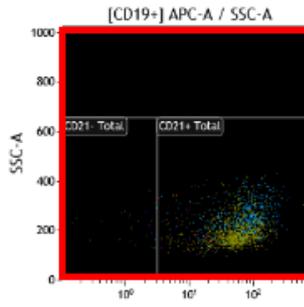
Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
IgM- Total	640	35,36
IgM+ Total	1 170	64,64



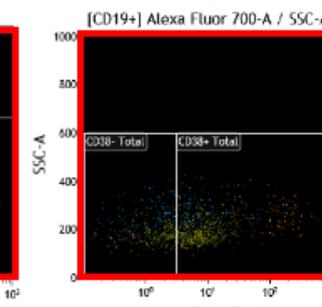
Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD20- Total	145	8,01
CD20+ Total	1 665	91,99



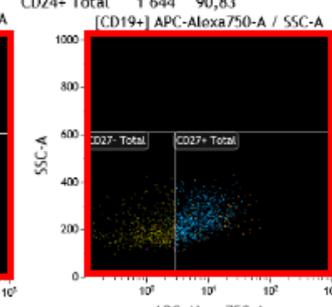
Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD24- Total	166	9,17
CD24+ Total	1 644	90,83



Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD21- Total	140	7,73
CD21+ Total	1 670	92,27

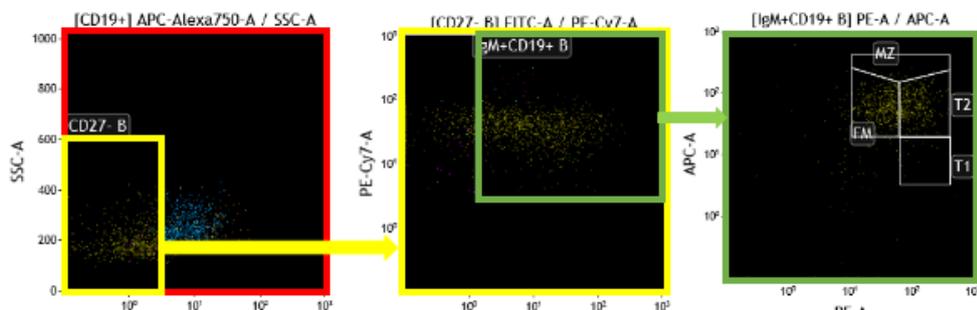


Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD38- Total	1 079	59,61
CD38+ Total	731	40,39



Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD27- Total	1 142	63,09
CD27+ Total	667	36,85

## Benitezová et al. 2014 (Nepaměťové B lymfocyty)



Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD27- B	1 142	63,09

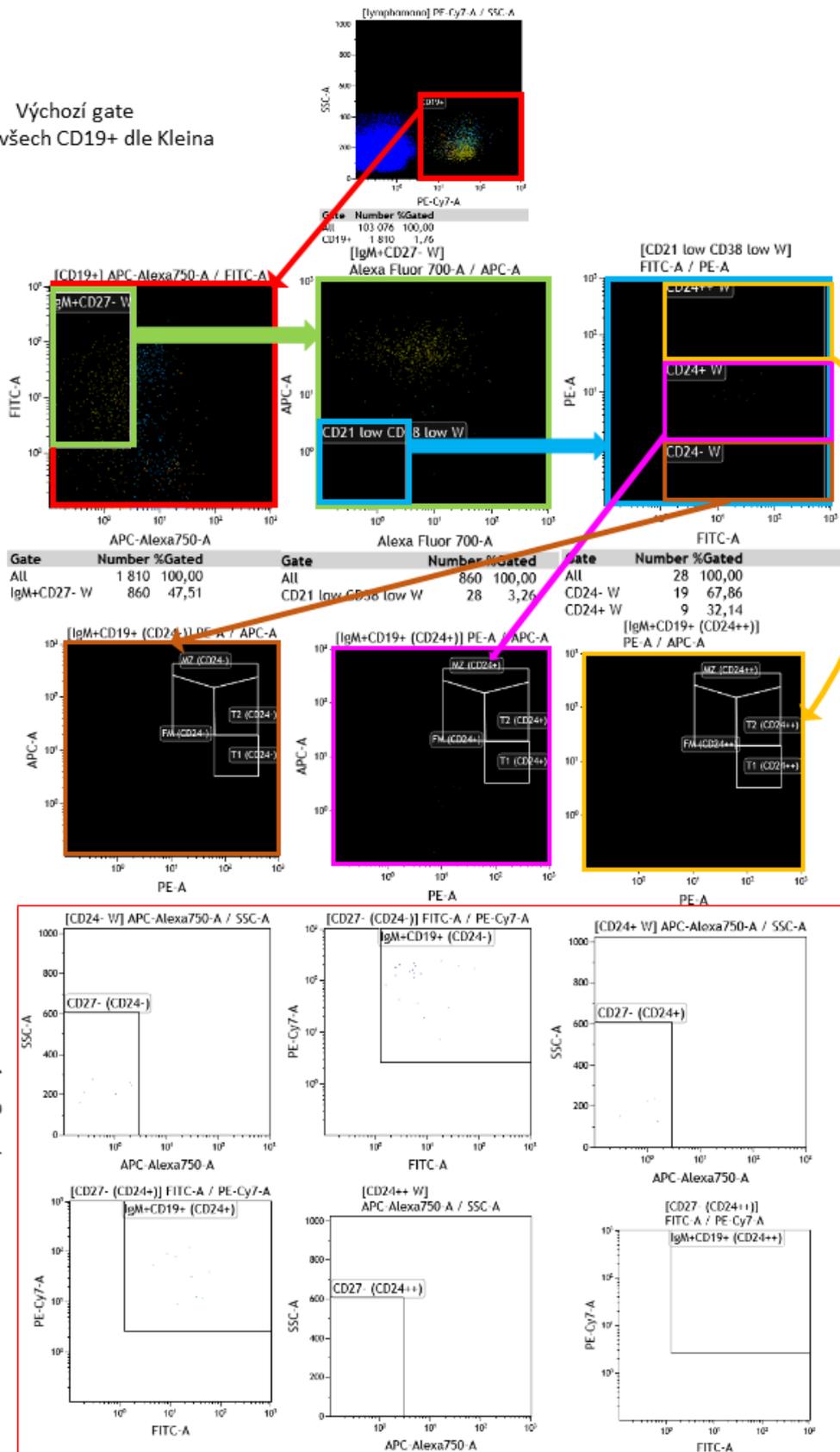
Gate	Number	%Gated
All	1 142	100,00
IgM+CD19+ B	853	74,69

Gate	Number	%Gated
All	853	100,00
FM	392	45,96
MZ	18	2,11
T1	14	1,64
T2	290	34,22

Obrázek 21 Rozdělení populace CD19+ podle míry exprese molekul IgM, CD20, CD24, CD21, CD38 a CD27 a strategie vymezení nepaměťových B lymfocytů podle Benitezové et al. (2014). Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze kterých je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

# Warnatz et al. 2002

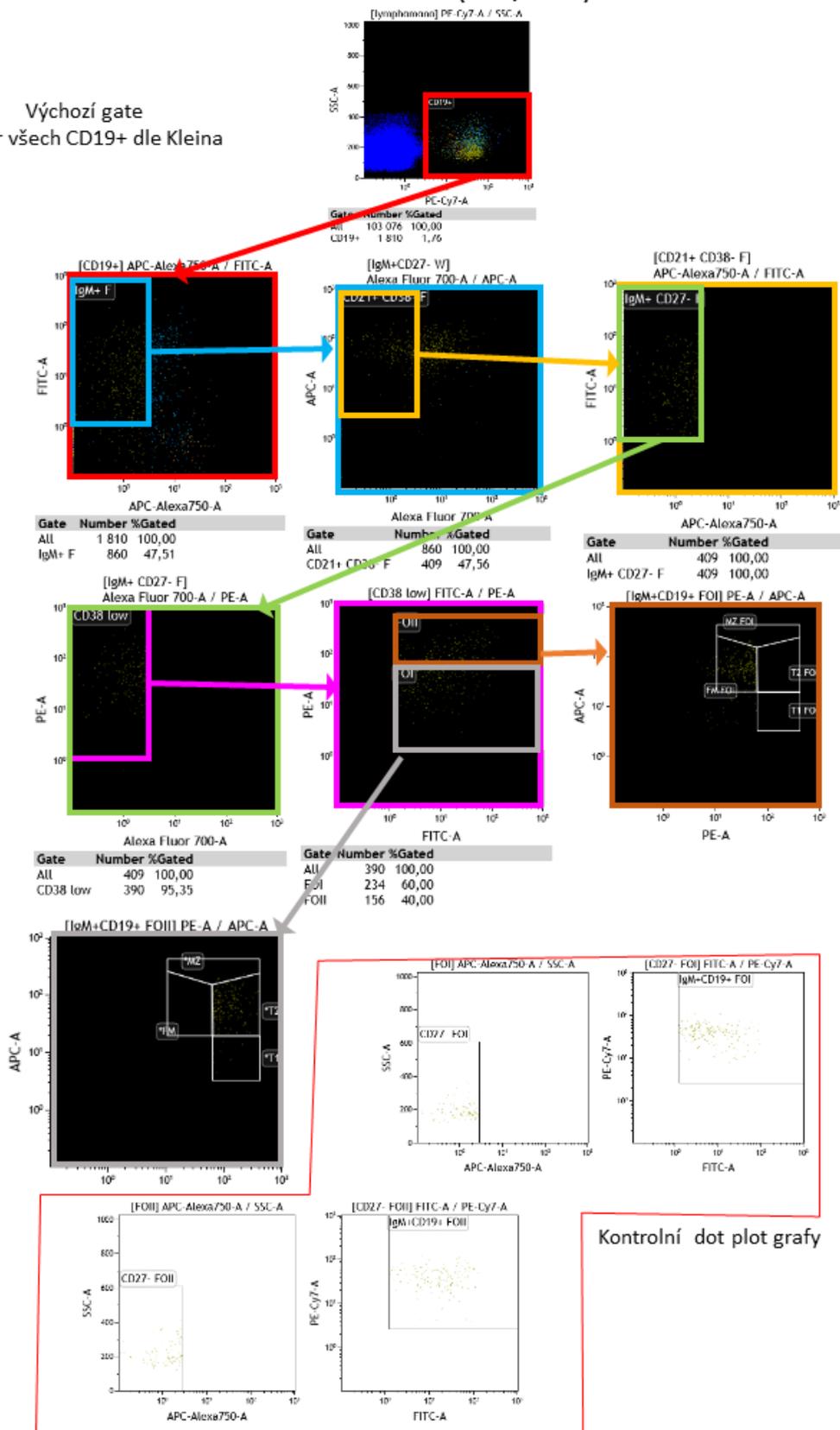
Výchozí gate  
Výběr všech CD19+ dle Kleina



Obrázek 22 Strategie vymezení CD21lowCD38low lymfocytů podle Warnatz et al. (2002) a Vlkové et al. (2010). Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze kterých je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

# Vlková et al. 2011 (FOI/FOII)

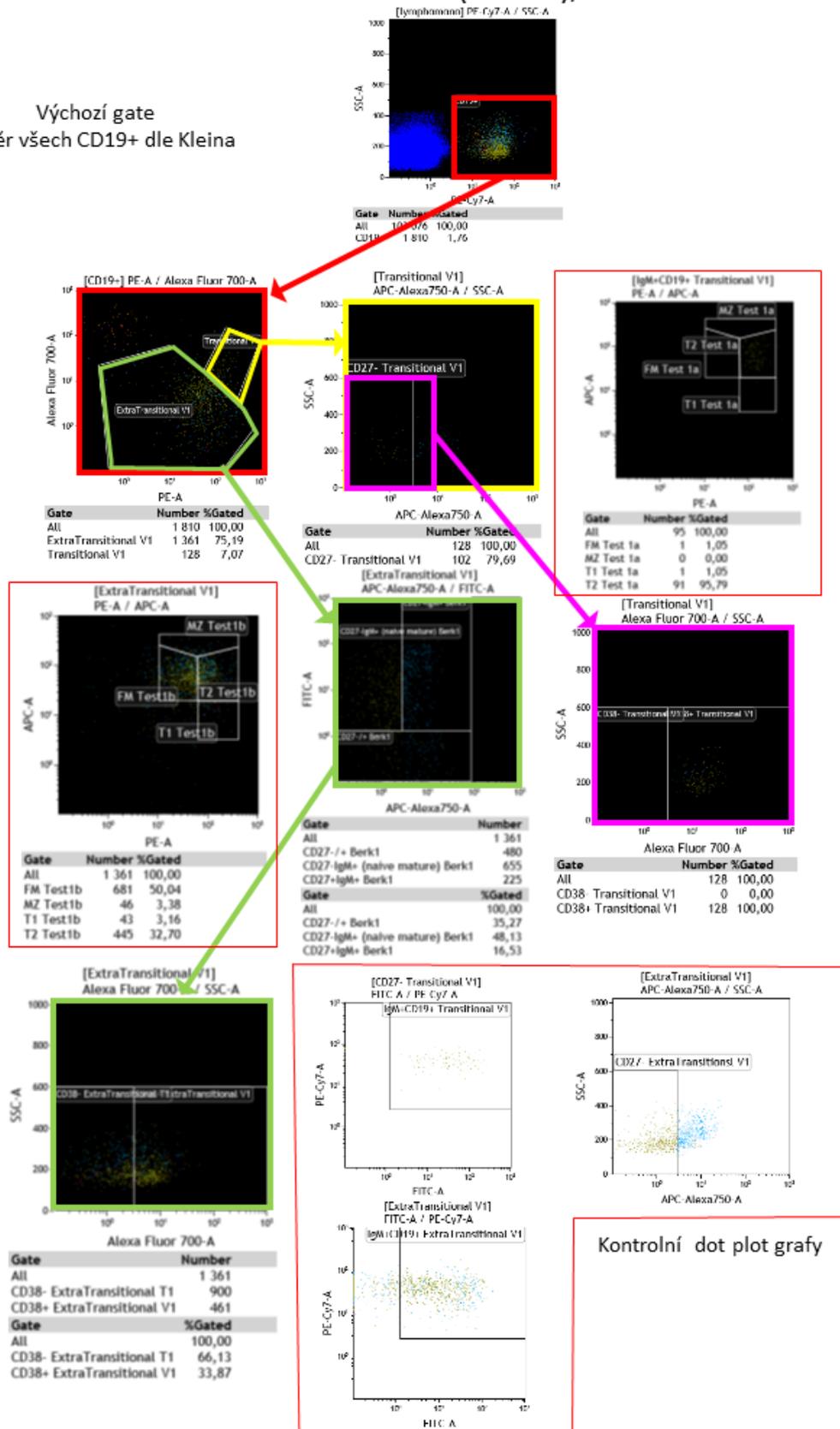
Výchozí gate  
Výběr všech CD19+ dle Kleina



Obrázek 23 Strategie vymezení subpopulací folikulárních lymfocytů I a folikulárních lymfocytů II podle Vlkova et al. (2010). Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze kterých je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

# Berkowska et al. 2011 (CD19+), verze I

Výchozí gate  
Výběr všech CD19+ dle Kleina

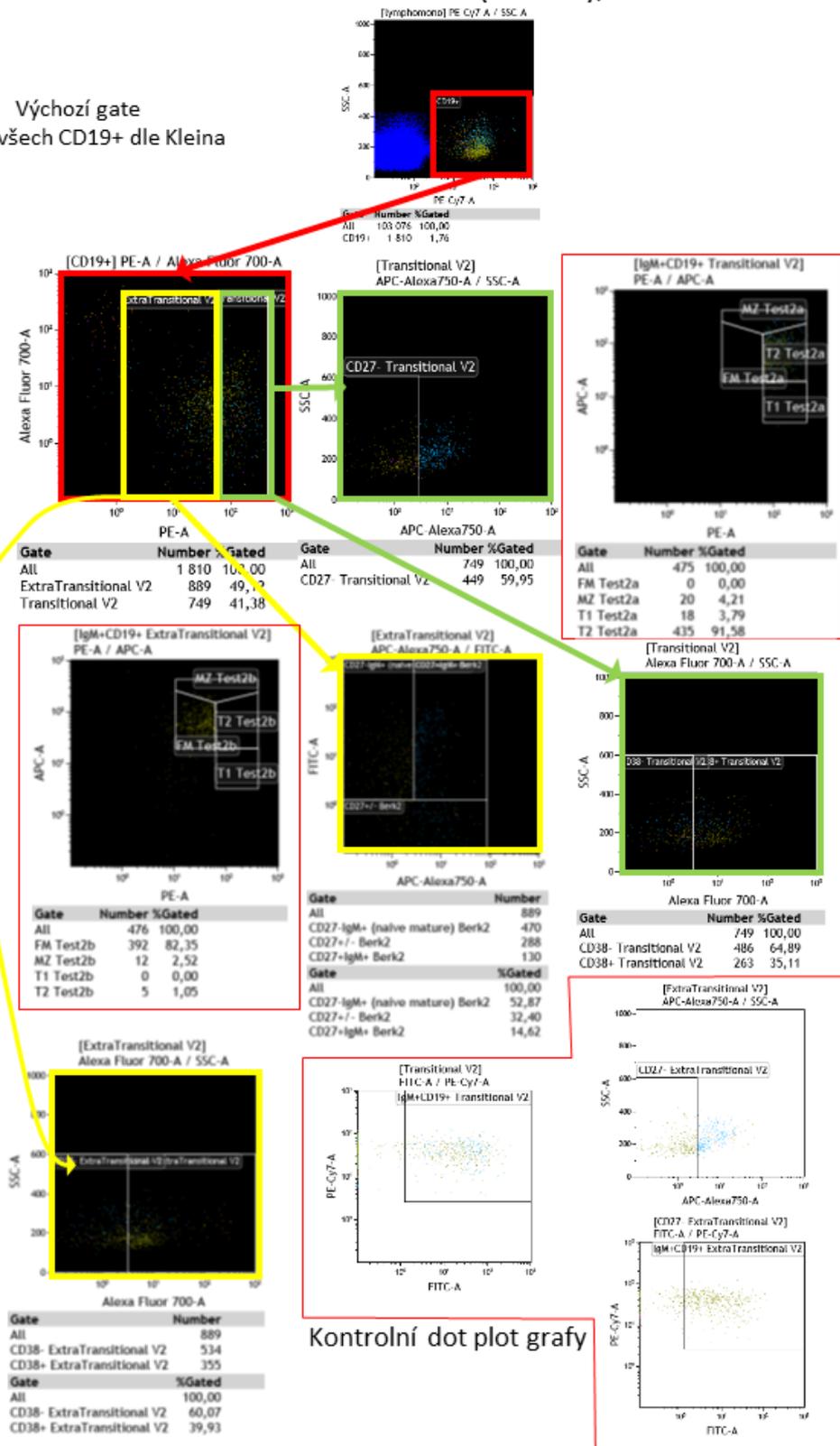


Kontrolní dot plot grafy

Obrázek 24 Strategie vymezení tranzientních a extratranzientních B lymfocytů podle Berkowska et al. (2011), verze 1. Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze kterých je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

# Berkowska et al. 2011 (CD19+), verze II

Výchozí gate  
Výběr všech CD19+ dle Kleina



Obrázek 25 Strategie vymezení tranzientních a extratranzientních B lymfocytů podle Berkowska et al. (2011), verze 2. Vnější ohraničení vždy odkazuje na zdrojovou množinu buněk, ze kterých je výběr prováděn. Tabulky pod obrázky uvádějí základní statistické ukazatele pro jednotlivé typy vymezených populací (absolutní počet a procentuální zastoupení) (vzorek 195).

## 10.2 Distribuce CD19+ periferních lymfocytárních subpopulací ve vyšetřovaném souboru: CD19+, naivní, maturované, plazmatické a dvojitě negativní (CD20-CD27-)

### 10.2.1 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru kontrol

Při statistickém hodnocení byly u souboru zdravých kontrol popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozmezí 0,41 % - 16,99 % s mediánem 5,17 %, směrodatnou odchylkou 4,121 % a hladinou spolehlivosti (95%) 1,461. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty (CD19+CD20+CD27-) zastoupeny v rozmezí 53,7 % - 97,170 % s mediánem 79,37 %, směrodatnou odchylkou 12,766 % a hladinou spolehlivosti (95%) 4,527. Paměťové B lymfocyty (CD19+CD20+CD27+) se vyskytovaly s frekvencí 0,14% - 45,61%, % s mediánem 13,07 %, směrodatnou odchylkou 12,779 % a hladinou spolehlivosti (95%) 4,531. Populace plazmatických buněk (CD19+CD20-CD27+) nabývala hodnot frekvence v intervalu 0,1 % - 12,64 %, přičemž její medián byl 1,53 %, směrodatná odchylka 3,065 % při hladině spolehlivosti (95%) 1,087 (Tabulka 12 na straně 97), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101). Z pohledu této diplomové práce je nejzajímavější populace CD19+CD20-CD27-DN lymfocytů, která nabývala frekvencí v rozsahu 0,03% - 18,73%, s mediánem 0,410%, směrodatnou odchylkou 3,671 % při hladině spolehlivosti (95%) 1,302.

	<i>CD20- CD27-</i>	<i>memory</i>	<i>naive</i>	<i>plasma</i>	<i>CD19+</i>
Stř. hodnota	1,804	17,886	77,988	2,564	6,382
Chyba stř. hodnoty	0,639	2,225	2,222	0,534	0,717
Medián	0,410	13,070	79,370	1,530	5,170
Směr. odchylka	3,671	12,779	12,766	3,065	4,121
Rozdíl max-min	18,700	45,470	43,400	12,540	16,280
Minimum	0,030	0,140	53,770	0,100	0,410
Maximum	18,730	45,610	97,170	12,640	16,690
Počet	33,000	33,000	33,000	33,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	1,302	4,531	4,527	1,087	1,461

Tabulka 12 Popisná statistika hlavních populací u skupiny zdravých kontrol

### 10.2.2 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s revmatoidní artritidou

V rámci statistického hodnocení byly u souboru pacientů s revmatoidní artritidou popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozsahu 0,54 % - 12,49 % s mediánem 5,17 %, směrodatnou odchylkou 4,121 % a hladinou spolehlivosti (95%) 1,461.

směrodatnou odchylkou 3,278 % a hladinou spolehlivosti (95%) 1,417. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty zastoupeny v intervalu 40,52% - 94,280 % s mediánem 77,530 %, směrodatnou odchylkou 14,795 % a hladinou spolehlivosti (95%) 6,398. Paměťové B lymfocyty se vyskytovaly s frekvencí 4,910% - 56,99%, s mediánem 18,160 %, směrodatnou odchylkou 13,302 % a hladinou spolehlivosti (95%) 5,752. Populace plazmatických buněk měla hodnoty frekvence v intervalu 0,08 % - 13,110 %, přičemž její medián byl 0,82 %, směrodatná odchylka 3,61 % při hladině spolehlivosti (95%) 1,561. Populace CD20CD27DN lymfocytů nabývala frekvencí v rozsahu 0,09% - 3,290% , s mediánem 0,490%, směrodatnou odchylkou 0,792 % a hladině spolehlivosti (95%) 0,342 (Tabulka 13 na straně 98), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101).

	<b>CD20- CD27-</b>	<b>memory</b>	<b>naive</b>	<b>plasma</b>	<b>CD19+</b>
<b>Stř. hodnota</b>	<b>0,749</b>	<b>22,070</b>	<b>74,934</b>	<b>2,390</b>	<b>6,273</b>
<b>Chyba stř. hodnoty</b>	<b>0,165</b>	<b>2,774</b>	<b>3,085</b>	<b>0,753</b>	<b>0,683</b>
<b>Medián</b>	<b>0,490</b>	<b>18,160</b>	<b>77,530</b>	<b>0,820</b>	<b>6,810</b>
<b>Směr. odchylka</b>	<b>0,792</b>	<b>13,302</b>	<b>14,795</b>	<b>3,610</b>	<b>3,278</b>
<b>Rozdíl max-min</b>	<b>3,200</b>	<b>52,080</b>	<b>53,760</b>	<b>13,030</b>	<b>11,950</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,090</b>	<b>4,910</b>	<b>40,520</b>	<b>0,080</b>	<b>0,540</b>
<b>Maximum</b>	<b>3,290</b>	<b>56,990</b>	<b>94,280</b>	<b>13,110</b>	<b>12,490</b>
<b>Počet</b>	<b>23,000</b>	<b>23,000</b>	<b>23,000</b>	<b>23,000</b>	<b>23,000</b>
<b>Hladina spolehlivosti (95,0%)</b>	<b>0,342</b>	<b>5,752</b>	<b>6,398</b>	<b>1,561</b>	<b>1,417</b>

Tabulka 13 Popisná statistika hlavních populací u skupiny pacientů s revmatoidní artritidou

### 10.2.3 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s kolorektálním karcinomem

Během statistického hodnocení byly u souboru pacientů s kolorektálním karcinomem popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozmezí 2,15 % - 13,11 % s mediánem 6,3 %, směrodatnou odchylkou 3,039 % a hladinou spolehlivosti (95%) 1,562. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty zastoupeny v intervalu 30,36% - 81,64 % s mediánem 23,64 %, směrodatnou odchylkou 15,449 % a hladinou spolehlivosti (95%) 7,943. Paměťové B lymfocyty se objevovaly s frekvencí 5,7% - 53,41%, s mediánem 23,64 %, směrodatnou odchylkou 12,273 a hladinou spolehlivosti (95%) 6,310. Populace plazmatických buněk dosahovala hodnot frekvence v intervalu 0,55 % - 26,78 %, přičemž její medián byl 5,45 %, směrodatná odchylka 6,918 % při hladině spolehlivosti (95%) 3,557. Populace CD20CD27DN lymfocytů vykazovala frekvenci v rozsahu 0,24% - 21,07% , s mediánem 4,55%, směrodatnou odchylkou 7,16 %, při hladině spolehlivosti (95%) 3,681 (Tabulka 14 na straně 99), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101).

	<b>CD20- CD27-</b>	<b>memory</b>	<b>naive</b>	<b>plasma</b>	<b>CD19+</b>
<b>Stř. hodnota</b>	<b>7,389</b>	<b>22,854</b>	<b>62,671</b>	<b>7,579</b>	<b>6,904</b>
<b>Chyba stř. hodnoty</b>	<b>1,737</b>	<b>2,977</b>	<b>3,747</b>	<b>1,678</b>	<b>0,737</b>
<b>Medián</b>	<b>4,550</b>	<b>23,640</b>	<b>65,300</b>	<b>5,450</b>	<b>6,300</b>
<b>Směr. odchylka</b>	<b>7,160</b>	<b>12,273</b>	<b>15,449</b>	<b>6,918</b>	<b>3,039</b>
<b>Rozdíl max-min</b>	<b>20,830</b>	<b>47,710</b>	<b>51,280</b>	<b>26,320</b>	<b>10,960</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,240</b>	<b>5,700</b>	<b>30,360</b>	<b>0,550</b>	<b>2,150</b>
<b>Maximum</b>	<b>21,070</b>	<b>53,410</b>	<b>81,640</b>	<b>26,870</b>	<b>13,110</b>
<b>Počet</b>	<b>17,000</b>	<b>17,000</b>	<b>17,000</b>	<b>17,000</b>	<b>17,000</b>
<b>Hladina spolehlivosti (95,0%)</b>	<b>3,681</b>	<b>6,310</b>	<b>7,943</b>	<b>3,557</b>	<b>1,562</b>

Tabulka 14 Popisná statistika hlavních populací u skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem

#### 10.2.4 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s ulcerózní kolitidou

	<b>CD20- CD27-</b>	<b>memory</b>	<b>naive</b>	<b>plasma</b>	<b>CD19+</b>
<b>Stř. hodnota</b>	<b>10,150</b>	<b>16,572</b>	<b>68,536</b>	<b>4,736</b>	<b>6,604</b>
<b>Chyba stř. hodnoty</b>	<b>6,836</b>	<b>3,837</b>	<b>6,469</b>	<b>1,191</b>	<b>1,834</b>
<b>Medián</b>	<b>3,770</b>	<b>10,890</b>	<b>72,530</b>	<b>4,690</b>	<b>5,160</b>
<b>Směr. odchylka</b>	<b>15,287</b>	<b>8,579</b>	<b>14,465</b>	<b>2,664</b>	<b>4,101</b>
<b>Rozdíl max-min</b>	<b>35,450</b>	<b>18,620</b>	<b>36,700</b>	<b>5,460</b>	<b>9,870</b>
<b>Minimum</b>	<b>1,920</b>	<b>9,870</b>	<b>44,150</b>	<b>1,990</b>	<b>1,310</b>
<b>Maximum</b>	<b>37,370</b>	<b>28,490</b>	<b>80,850</b>	<b>7,450</b>	<b>11,180</b>
<b>Počet</b>	<b>5,000</b>	<b>5,000</b>	<b>5,000</b>	<b>5,000</b>	<b>5,000</b>
<b>Hladina spolehlivosti (95,0%)</b>	<b>18,981</b>	<b>10,652</b>	<b>17,961</b>	<b>3,307</b>	<b>5,092</b>

Tabulka 15 Popisná statistika hlavních populací u pacientů s ulcerózní kolitidou

V rámci statistického hodnocení byly u souboru pacientů s ulcerózní kolitidou popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozmezí 1,31 % - 11,18 % s mediánem 5,16 %, směrodatnou odchylkou 4,101 % a hladinou spolehlivosti (95%) 5,092. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty zastoupeny v rozmezí 44,15% - 80,85 % s mediánem 10,89 %, směrodatnou odchylkou 14,165 % a hladinou spolehlivosti (95%) 17,961. Paměťové B lymfocyty se vyskytovaly s frekvencí 9,87% - 28,49%, s mediánem 10,89 %, směrodatnou odchylkou 8,579 % a hladinou spolehlivosti (95%) 10,652. Populace plazmatických buněk dosahovala hodnot frekvence v intervalu 1,99 % - 7,45 %, přičemž její medián byl 4,69 %, směrodatná odchylka 2,664 % při hladině spolehlivosti (95%) 3,307. Populace CD20CD27DN lymfocytů nabývala frekvencí v rozsahu 1,92% - 37,37% , s mediánem 3,77%, směrodatnou odchylkou 15,287 % na hladině spolehlivosti (95%) 18,981 (Tabulka 15 na straně 97), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101).

### 10.2.5 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s Crohnovou chorobou

Během statistického hodnocení byly u souboru pacientů s Crohnovou chorobou popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozmezí 1,52 % - 9,77 % s mediánem 7,82 %, směrodatnou odchylkou 2,772 % a hladinou spolehlivosti (95%) 1,863. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty přítomny v rozmezí 62,46% - 96,1 % s mediánem 81,63 %, směrodatnou odchylkou 2,137 % a hladinou spolehlivosti (95%) 7,245. Paměťové B lymfocyty se vyskytovaly s frekvencí 1,01% - 36,27%, s mediánem 13,75 %, směrodatnou odchylkou 11,01 % a hladinou spolehlivosti (95%) 7,397. Populace plazmatických buněk dosahovala hodnot frekvence v intervalu 0 % - 7,29 %, přičemž její medián byl 1,87 %, směrodatná odchylka 2,137 % při hladině spolehlivosti (95%) 1,436. Populace CD20CD27DN lymfocytů vykazovala frekvencí v rozsahu 0% - 27,09%, s mediánem 0,97%, směrodatnou odchylkou 7,903 % při hladině spolehlivosti (95%) 5,309 (Tabulka 16 na straně 100), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101).

	<b>CD20- CD27-</b>	<b>memory</b>	<b>naive</b>	<b>plasma</b>	<b>CD19+</b>
<b>Stř. hodnota</b>	<b>3,349</b>	<b>13,623</b>	<b>81,096</b>	<b>1,957</b>	<b>7,039</b>
<b>Chyba stř. hodnoty</b>	<b>2,383</b>	<b>3,320</b>	<b>3,252</b>	<b>0,644</b>	<b>0,836</b>
<b>Medián</b>	<b>0,970</b>	<b>13,750</b>	<b>81,630</b>	<b>1,870</b>	<b>7,820</b>
<b>Směr. odchylka</b>	<b>7,903</b>	<b>11,010</b>	<b>10,784</b>	<b>2,137</b>	<b>2,772</b>
<b>Rozdíl max-min</b>	<b>27,090</b>	<b>35,260</b>	<b>33,640</b>	<b>7,290</b>	<b>8,250</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,000</b>	<b>1,010</b>	<b>62,460</b>	<b>0,000</b>	<b>1,520</b>
<b>Maximum</b>	<b>27,090</b>	<b>36,270</b>	<b>96,100</b>	<b>7,290</b>	<b>9,770</b>
<b>Počet</b>	<b>11,000</b>	<b>11,000</b>	<b>11,000</b>	<b>11,000</b>	<b>11,000</b>
<b>Hladina spolehlivosti (95,0%)</b>	<b>5,309</b>	<b>7,397</b>	<b>7,245</b>	<b>1,436</b>	<b>1,863</b>

Tabulka 16 Popisná statistika hlavních populací u skupiny pacientů s Crohnovou chorobou

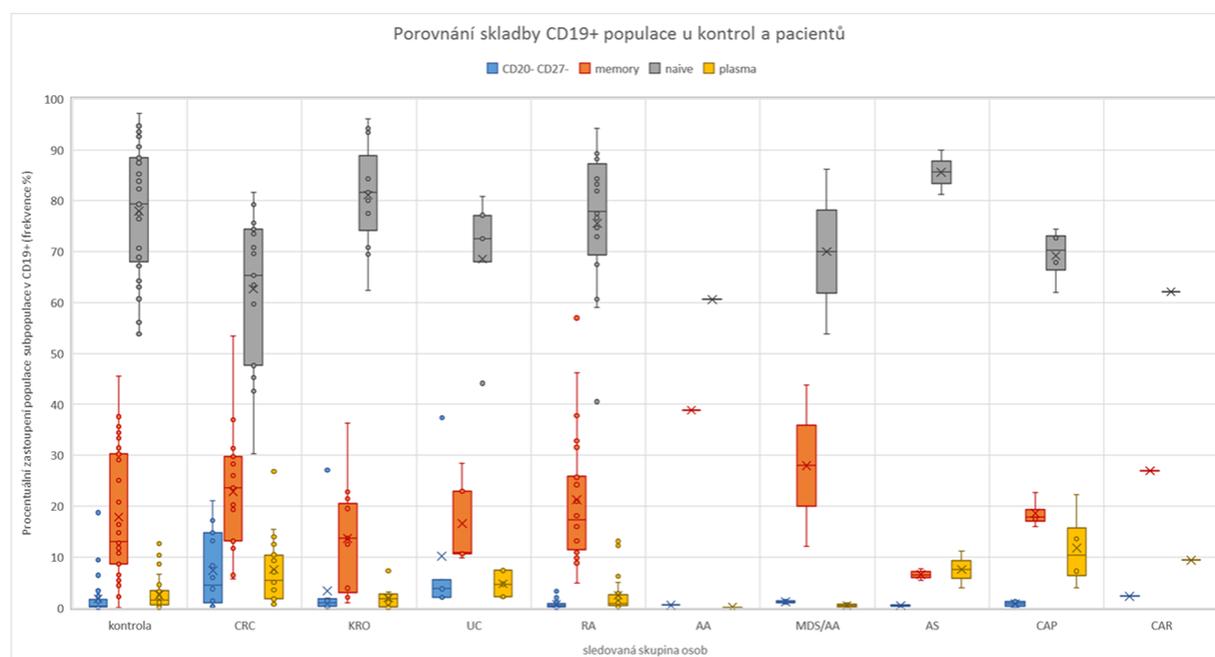
### 10.2.6 Distribuce CD19+ B populace a jejích subpopulací u souboru pacientů s karcinomem pankreatu

V průběhu statistického hodnocení byly u souboru pacientů s karcinomem pankreatu popsány frekvence CD19+ lymfocytů v rozmezí 1,43 % - 11,26 % s mediánem 4,29 %, směrodatnou odchylkou 3,81 % a hladinou spolehlivosti (95%) 4,731. V rámci CD19+ B subpopulace byly naivní B lymfocyty zastoupeny v rozmezí 61,97% - 74,46 % s mediánem 67,86 %, směrodatnou odchylkou 5,08 % a hladinou spolehlivosti (95%) 7,201. Paměťové B lymfocyty se vyskytovaly s frekvencí 15,93% - 26,99%, s mediánem 18,32 %, směrodatnou odchylkou 4,501 % a hladinou spolehlivosti (95%) 5,589. Populace plazmatických buněk

dosahovala hodnot frekvence v intervalu 3,99 % - 22,33 %, přičemž její medián byl 9,38 %, směrodatná odchylka 7,081 % na hladině spolehlivosti (95%) 8,792. Populace CD20CD27DN lymfocytů dosahovala frekvencí v rozsahu 0,2% - 2,3% , s mediánem 1,26%, směrodatnou odchylkou 0,841 % při hladině spolehlivosti (95%) 1,044 (Tabulka 17 na straně 101), (grafické znázornění Obrázek 26 na straně 101).

	<i>CD20- CD27-</i>	<i>memory</i>	<i>naive</i>	<i>plasma</i>	<i>CD19+</i>
<b>Stř. hodnota</b>	1,094	20,270	67,812	11,308	4,814
<b>Chyba stř. hodnoty</b>	0,376	2,013	2,594	3,167	1,704
<b>Medián</b>	1,260	18,320	67,860	9,380	4,290
<b>Směr. odchylka</b>	0,841	4,501	5,800	7,081	3,810
<b>Rozdíl max-min</b>	2,100	11,060	12,490	18,340	9,830
<b>Minimum</b>	0,200	15,930	61,970	3,990	1,430
<b>Maximum</b>	2,300	26,990	74,460	22,330	11,260
<b>Počet</b>	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
<b>Hladina spolehlivosti (95,0%)</b>	1,044	5,589	7,201	8,792	4,731

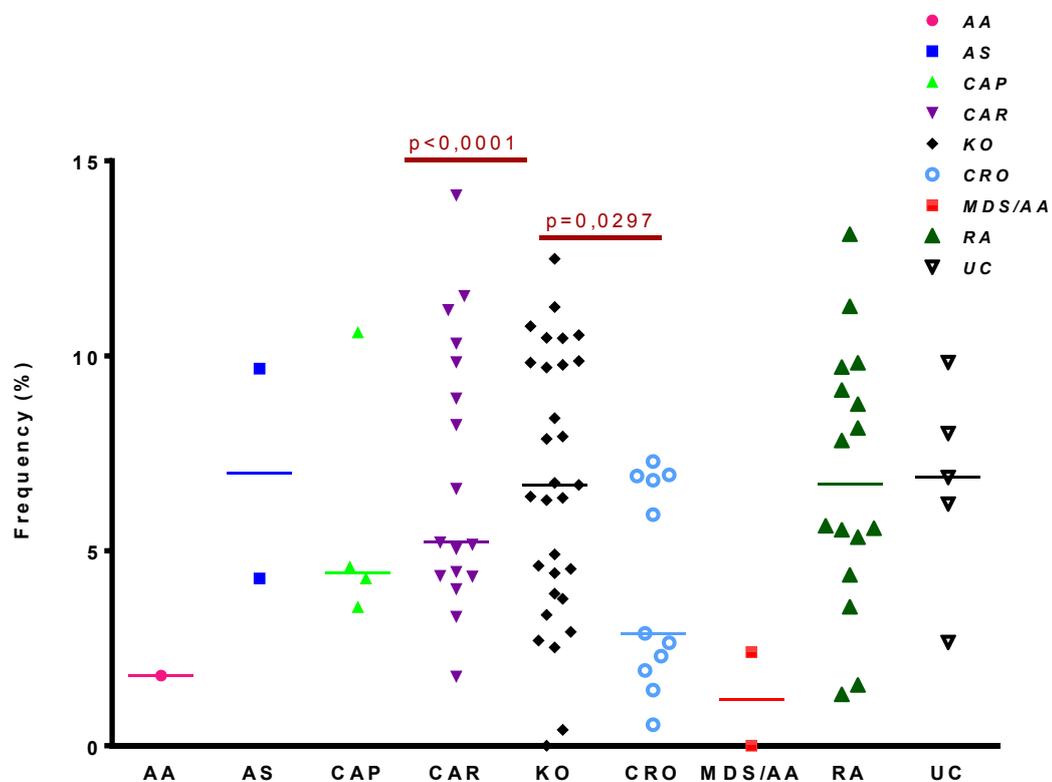
Tabulka 17 Popisná statistika hlavních populací u pacientů s karcinomem pankreatu



Obrázek 26 Grafické znázornění a srovnání zastoupení hlavních populací CD19+ B lymfocytů v periferní krvi kontrol a u pacientů s patologickými stavy. CRC – kolorektální karcinom; KRO – Crohnova choroba; UC – ulcerózní kolitida; RA – Revmatoidní artritida; AA – aplastická anemie; MDS/AA – myelodysplastický syndrom; CAP – karcinom pankreatu; CAR – karcinom konečníku

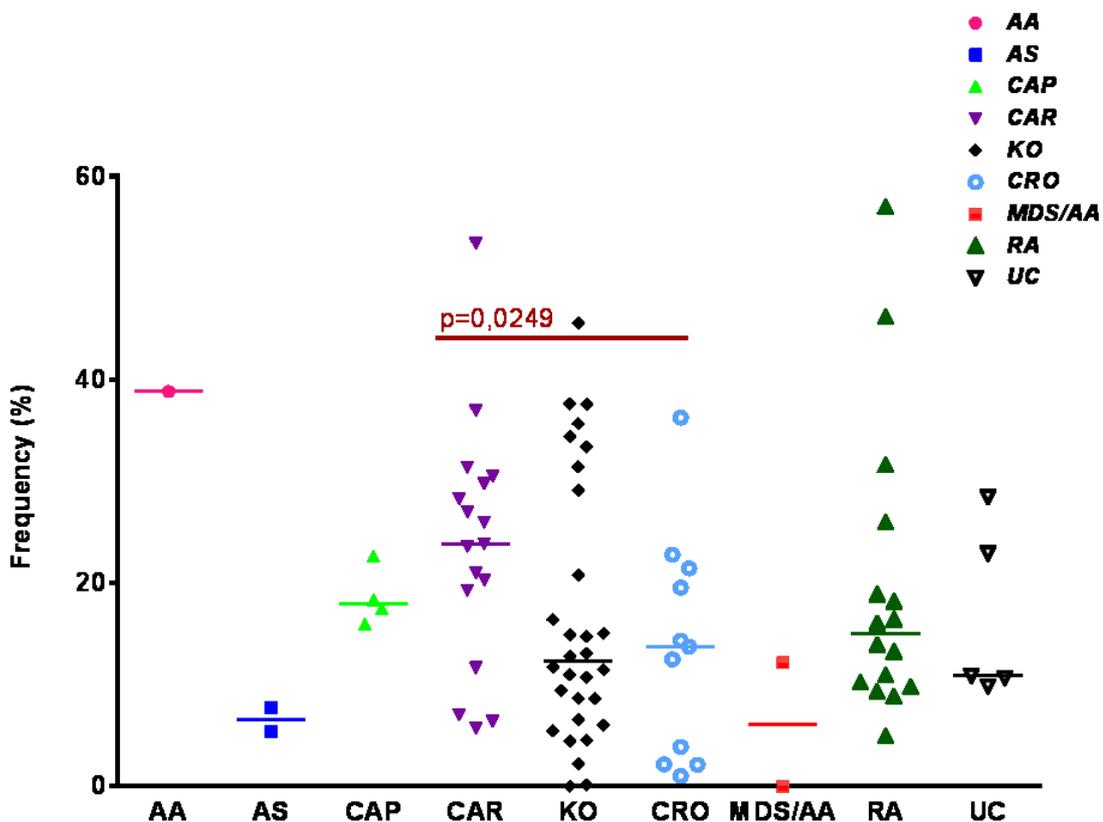
### 10.3 Statistická analýza distribucí frekvencí hlavních CD19+ periferních lymfocytárních populací

Statistická analýza distribucí frekvencí CD19+ periferních B lymfocytárních populací byla provedena neparametrickým testem podle Mann-Whitneyové za využití programu GraphPad Prism6. Porovnávány byly distribuce u souboru kontrol a pacientů s jednotlivými patologiemi, a to včetně těch, které byly zastopeny malým počtem vzorků. V grafech jsou vždy označeny signifikantní rozdíly pro hladiny pravděpodobnosti  $p < 0,05$ . Jako nejzajímavější se jeví v literatuře dosud nepopsaná populace CD19+CD20-CD27- DN B lymfocytů v periferní krvi (viz Obrázek 28 na straně 103), která se po přidání znaků CD24 a CD21 dále rozpadá na minoritní populace (jsou popsány v následující kapitole).

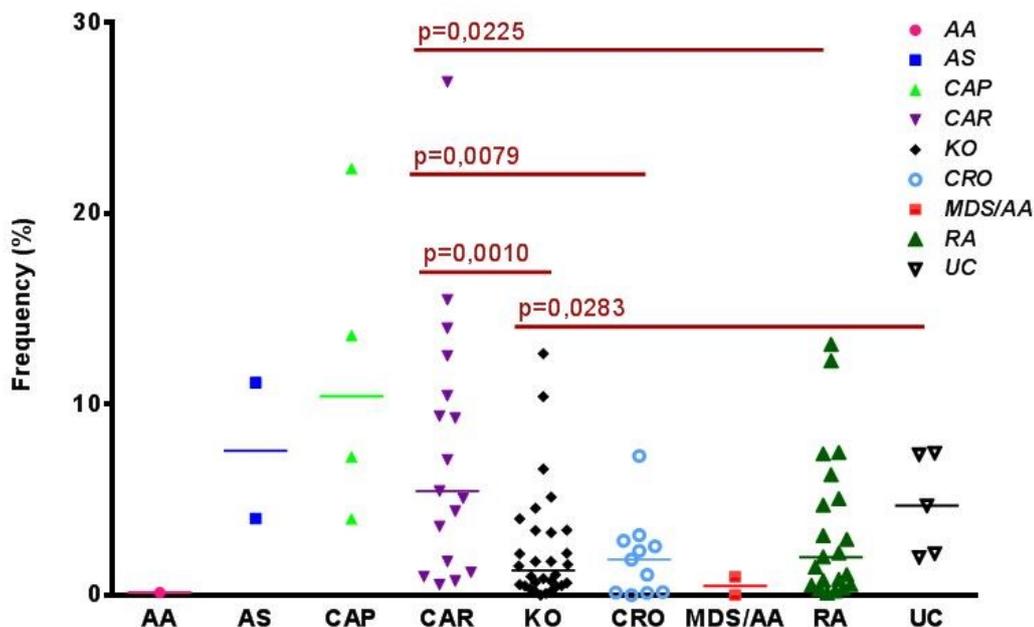


Obrázek 27 Frekvence CD19+ B lymfocytů v periferní krvi (řazeno abecedně, AA-aplastická anémie, AS – ankylozující spondylitida, CAP-carcinom pankreatu, CAR-kolorektální karcinom, KO-kontroly, CRO-Crohnova nemoc, MDS/AA - překrývající se myelodysplastický syndrom s aplastickou anémií, RA-revmatoidní artritida, UC - ulcerózní kolitida).





Obrázek 31 Frekvence CD19+CD20+CD27+ paměťových B lymfocytů v periferní krvi (řazeno abecedně, AA-aplastická anémie, AS – ankylozující spondylitida, CAP-carcinom pankreatu, CAR-kolorektální karcinom, KO-kontroly, CRO-Crohnova nemoc, MDS/AA -překrývající se myelodysplastický syndrom s aplastickou anémií, RA-revmatoidní artritida, UC-ulcerózní kolitida).

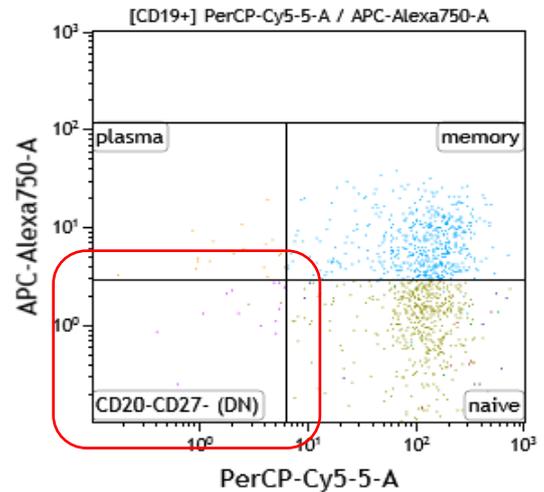


Obrázek 30 Frekvence CD19+CD20-CD27+ plazmatických buněk v periferní krvi (řazeno abecedně, AA-aplastická anémie, AS – ankylozující spondylitida, CAP-carcinom pankreatu, CAR-kolorektální karcinom, KO-kontroly, CRO-Crohnova nemoc, MDS/AA -překrývající se myelodysplastický syndrom s aplastickou anémií, RA-revmatoidní artritida, UC-ulcerózní kolitida).

## 10.4 Distribuce CD20-CD27-DN lymfocytárních subpopulací ve sledovaném souboru

### 10.4.1 CD20-CD27- DN populace CD19+ lymfocytů

Při statistické analýze CD19+ B lymfocytů rozdělených do hlavních populací podle Kleina, se nám s pravidelností podařilo zachycovat buňky, které se ve velmi nízkých frekvencích vyskytovaly v segmentu CD20-CD27- (Obrázek 26, na straně 101). Pro zachycení a popis CD20-27-DN populace jsme použili kombinovanou strategii vymezení bran podle Kleina a Benitezové, která byla doplněna našimi vlastními branami, zachycující buňky, které v rámci těchto standardních schémat nešlo zachytit, ale které se prokazatelně v daných segmentech pravidelně vyskytovaly ve velmi nízkých frekvencích (Obrázek 33 na straně 106). Tímto



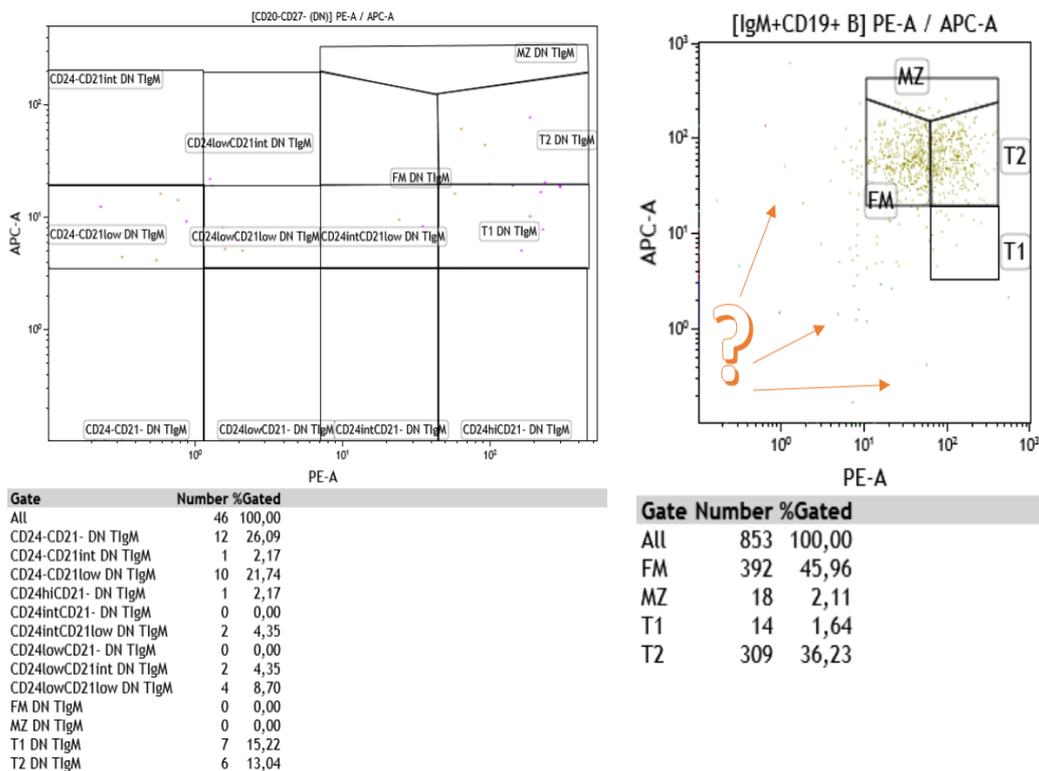
Gate	Number	%Gated
All	1 810	100,00
CD20-CD27- (DN)	46	2,54
memory	569	31,44
naive	1 095	60,50
plasma	99	5,47

Obrázek 32 CD19+CD20-CD27- B lymfocyty v klasickém rozdělení podle Kleina

způsobem jsme zachytili 13 zcela individuálních CD20-CD27-DN B lymfocytů subpopulací, jejichž imunofenotypovou charakteristiku shrnuje Tabulka 18 na straně 105.

	CD19	CD20	CD27	CD21	CD24	IgM
<b>CD24- CD21- DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21-	CD24-	IgM+
<b>CD24- CD21low DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21low	CD24-	IgM+
<b>CD24- CD21int DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21int	CD24-	IgM+
<b>CD24hi CD21- DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21-	CD24++	IgM+
<b>CD24intCD21- DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21-	CD24+	IgM+
<b>CD24intCD21low</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21low	CD24+	IgM+
<b>CD24low CD21 int DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21int	CD24low	IgM+
<b>CD24low CD21low</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21low	CD24low	IgM+
<b>CD24lowCD21- DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21-	CD24low	IgM+
<b>FM DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21+	CD24+	IgM+
<b>MZ DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21++	CD24hi	IgM+
<b>T1 DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21+	CD24+	IgM+
<b>T2 DN</b>	CD19+	CD20-	CD27-	CD21+	CD24++	IgM+

Tabulka 18 Imunofenotypy CD20-CD27- subpopulace CD19+ B lymfocytů



Obrázek 33 CD19+CD20-CD27-DN B lymfocyty v modifikované strategii vymezení bran podle Benítezové (vlevo) a originální brána vymezení dle Benítezové (vpravo), která umožňuje rozlišit vývojové fáze tranzientních B lymfocytů (T1 a T2), folikulárních maturovaných B lymfocytů (FM) a lymfocytů marginální zóny (MZ).

Vzhledem k počtu zjištěných CD20-CD27-DN populací a rozsahovým limitům diplomové práce neuvádím popisnou statistiku jednotlivých CD27-CD20-DN populací v textové části, ukazatele jednotlivých populací shrnuje Tabulka 19 na str. 107.

Zajímavé jsou z tohoto pohledu především skupiny pacientů s nespecifikovanými záněty střev a kolorektálním karcinomem, u kterých lze již na této úrovni postihnout rozdíly v distribuci frekvencí především u populací CD24-CD21int DN, CD24hiCD21- DN, CD24-CD21low DN, CD24lowCD21int DN. Z prvních analýz se zdá, že existují rozdíly v imunofenotypové skladbě B lymfocytárních populací mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou. Současně naše primární výsledky ukazují, že na této úrovni se imunofenotypový profil u pacientů s ulcerózní kolitidou blíží profilu u pacientů s kolorektálním karcinomem. U pacientů s revmatoidní artritidou v porovnání s kontrolami je postihnutelná změna v distribuci především populace CD24lowCD21lowDN. Grafické znázornění včetně popisných statistických ukazatelů shrnuje pro soubor kontrol a pacientů s CRC Obrázek 34 na straně 108, pro UC a KRO Obrázek 35 na straně 109 a pro RA a CAP Obrázek 36 na straně 110.

CD24-CD21- DN TlgM						
Stř. hodnota	60,842	59,778	62,776	44,494	55,188	53,062
Chyba stř. hodnoty	11,400	6,707	6,020	5,562	9,873	5,031
Medián	64,330	60,660	58,670	39,645	55,100	56,250
Směr. odchylka	25,490	21,210	24,822	26,089	22,076	28,902
Rozdíl max-min	61,850	76,720	75,000	89,130	51,300	100,000
Minimum	20,780	21,110	25,000	0,000	27,270	0,000
Maximum	82,630	97,830	100,000	89,130	78,570	100,000
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	31,651	15,173	12,762	11,567	27,410	10,248
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24hCD21- DN TlgM						
Stř. hodnota	5,436	0,769	0,671	2,565	2,000	1,506
Chyba stř. hodnoty	5,366	0,769	0,284	1,105	2,000	0,783
Medián	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	11,999	2,432	1,172	5,182	4,472	4,499
Rozdíl max-min	26,900	7,690	4,050	18,920	10,000	21,590
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	26,900	7,690	4,050	18,920	10,000	21,590
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	14,899	1,740	0,603	2,298	5,553	1,595
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24-CD21int DN TlgM						
Stř. hodnota	4,948	4,529	1,449	2,778	3,004	2,248
Chyba stř. hodnoty	2,851	1,856	0,668	1,040	1,316	0,706
Medián	3,210	1,105	0,000	0,610	3,330	0,000
Směr. odchylka	6,376	5,868	2,756	4,879	2,942	4,053
Rozdíl max-min	15,460	16,670	10,420	20,000	6,250	18,270
Minimum	0,570	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	16,030	16,670	10,420	20,000	6,250	18,270
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	7,917	4,198	1,417	2,163	3,653	1,437
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24intCD21- DN TlgM						
Stř. hodnota	3,282	10,374	1,159	3,163	0,666	0,754
Chyba stř. hodnoty	1,811	5,007	0,620	1,779	0,666	0,309
Medián	1,750	0,490	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	4,050	15,832	2,557	8,342	1,489	1,774
Rozdíl max-min	9,880	39,330	10,170	36,360	3,330	7,690
Minimum	0,560	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	10,440	39,330	10,170	36,360	3,330	7,690
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	5,029	11,326	1,315	3,699	1,849	0,629
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24-CD21low DN TlgM						
Stř. hodnota	14,336	9,887	18,432	21,144	28,832	25,823
Chyba stř. hodnoty	3,948	3,420	4,349	4,059	9,880	3,855
Medián	15,410	6,420	14,290	19,830	19,050	21,950
Směr. odchylka	8,828	10,816	17,930	19,037	22,092	22,147
Rozdíl max-min	24,620	27,780	52,080	66,670	56,970	76,740
Minimum	0,530	0,000	0,000	0,000	6,670	0,000
Maximum	25,150	27,780	52,080	66,670	63,640	76,740
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	10,961	7,737	9,219	8,441	27,431	7,853
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24intCD21low DN TlgM						
Stř. hodnota	0,714	0,899	0,576	1,996	0,666	0,964
Chyba stř. hodnoty	0,353	0,899	0,343	0,668	0,666	0,635
Medián	0,570	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	0,790	2,843	1,416	3,133	1,489	3,647
Rozdíl max-min	1,830	8,990	5,560	10,000	3,330	20,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	1,830	8,990	5,560	10,000	3,330	20,000
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,980	2,034	0,728	1,389	1,849	1,293
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24lowCD21- DN TlgM						
Stř. hodnota	0,148	0,376	4,072	6,938	2,620	0,789
Chyba stř. hodnoty	0,148	0,284	1,578	2,804	1,730	0,336
Medián	0,000	0,000	2,380	1,175	0,680	0,000
Směr. odchylka	0,331	0,899	6,505	13,153	3,868	1,929
Rozdíl max-min	0,740	2,780	25,000	45,450	9,090	7,690
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	0,740	2,780	25,000	45,450	9,090	7,690
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,411	0,643	3,345	5,832	4,803	0,684
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

FM DN TlgM						
Stř. hodnota	0,718	0,436	0,037	0,894	0,000	2,673
Chyba stř. hodnoty	0,718	0,388	0,037	0,460	0,000	1,624
Medián	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	1,605	1,226	0,153	2,158	0,000	9,330
Rozdíl max-min	3,590	3,900	0,630	9,090	0,000	50,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	3,590	3,900	0,630	9,090	0,000	50,000
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	1,993	0,877	0,079	0,957	0,000	3,308
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

CD24lowCD21int DN TlgM						
Stř. hodnota	0,624	3,577	0,132	0,655	0,000	0,463
Chyba stř. hodnoty	0,300	2,202	0,112	0,352	0,000	0,380
Medián	0,460	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	0,671	6,962	0,463	1,652	0,000	2,183
Rozdíl max-min	1,750	20,000	1,900	6,900	0,000	12,500
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	1,750	20,000	1,900	6,900	0,000	12,500
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,834	4,981	0,238	0,732	0,000	0,774
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

MZ DN TlgM						
Stř. hodnota	0,780	0,023	0,000	0,000	0,000	0,144
Chyba stř. hodnoty	0,780	0,023	0,000	0,000	0,000	0,128
Medián	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	1,744	0,073	0,000	0,000	0,000	0,734
Rozdíl max-min	3,900	0,230	0,000	0,000	0,000	4,200
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	3,900	0,230	0,000	0,000	0,000	4,200
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	2,166	0,052	0,000	0,000	0,000	0,260
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

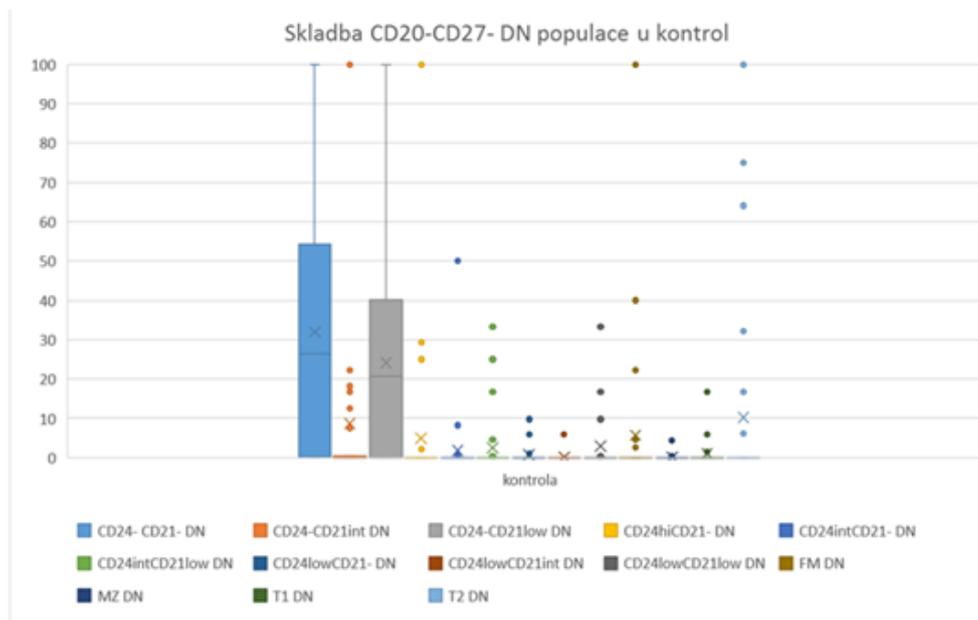
CD24lowCD21low DN TlgM						
Stř. hodnota	0,652	1,000	4,852	8,351	0,272	1,556
Chyba stř. hodnoty	0,458	1,000	1,990	3,052	0,272	0,709
Medián	0,000	0,000	0,430	1,880	0,000	0,000
Směr. odchylka	1,024	3,162	8,205	14,316	0,608	4,072
Rozdíl max-min	2,340	10,000	28,810	60,000	1,360	20,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	2,340	10,000	28,810	60,000	1,360	20,000
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	1,272	2,262	4,219	6,347	0,755	1,444
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

T1 DN TlgM						
Stř. hodnota	0,106	0,214	2,265	1,125	3,334	0,812
Chyba stř. hodnoty	0,106	0,143	1,517	0,585	3,334	0,377
Medián	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	0,237	0,453	6,254	2,742	7,455	2,164
Rozdíl max-min	0,530	1,160	25,000	10,810	16,670	10,000
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	0,530	1,160	25,000	10,810	16,670	10,000
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,294	0,324	3,216	1,216	9,257	0,767
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

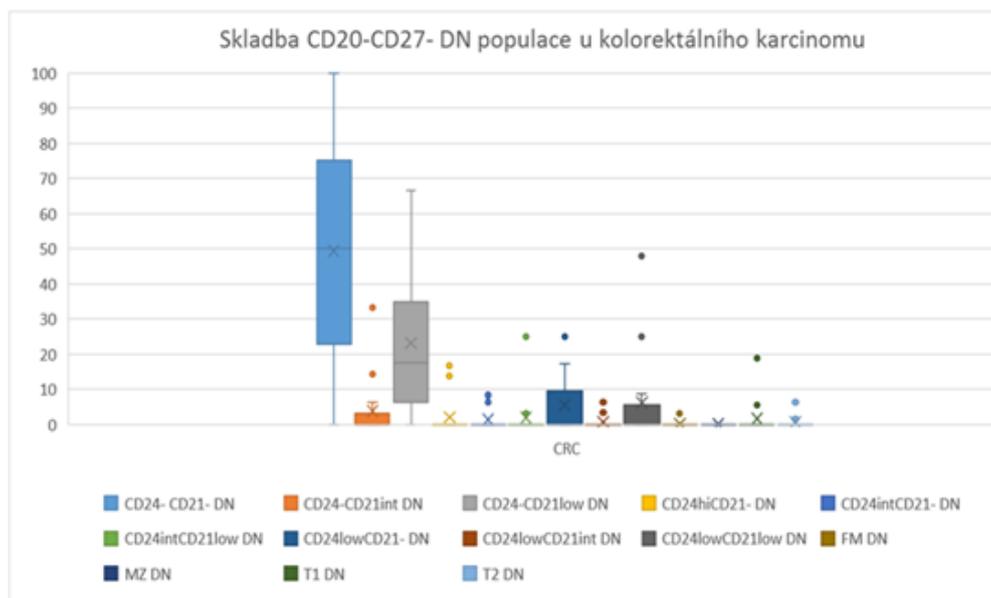
T2 DN TlgM						
Stř. hodnota	3,360	0,284	1,899	3,503	0,666	5,567
Chyba stř. hodnoty	3,221	0,200	1,496	1,681	0,666	2,798
Medián	0,280	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	7,201	0,634	6,166	7,885	1,489	16,074
Rozdíl max-min	16,240	1,860	25,000	31,080	3,330	66,670
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	16,240	1,860	25,000	31,080	3,330	66,670
Počet	5,000	10,000	17,000	22,000	5,000	33,000
Hladina spolehlivosti (95,0%)	8,942	0,453	3,170	3,496	1,849	5,700
	UC	KRO	CRC	RA	CPAN	kontrola

Tabulka 19 Porovnání popisných statistických ukazatelů pro jednotlivé CD20-CD27-DN populace 19+B lymfocytů u kontrol a vybraných patologických stavů (s ohledem na počty vzorků v souborech nebyly skupiny patologických stavů, kde počet vzorků  $n < 5$  do porovnání zařazeny)

UC – ulcerózní kolitida; KRO – Crohnova choroba; CRC – kolorektální karcinom; RA – revmatoidní artritida; CPAN – karcinom pankreatu



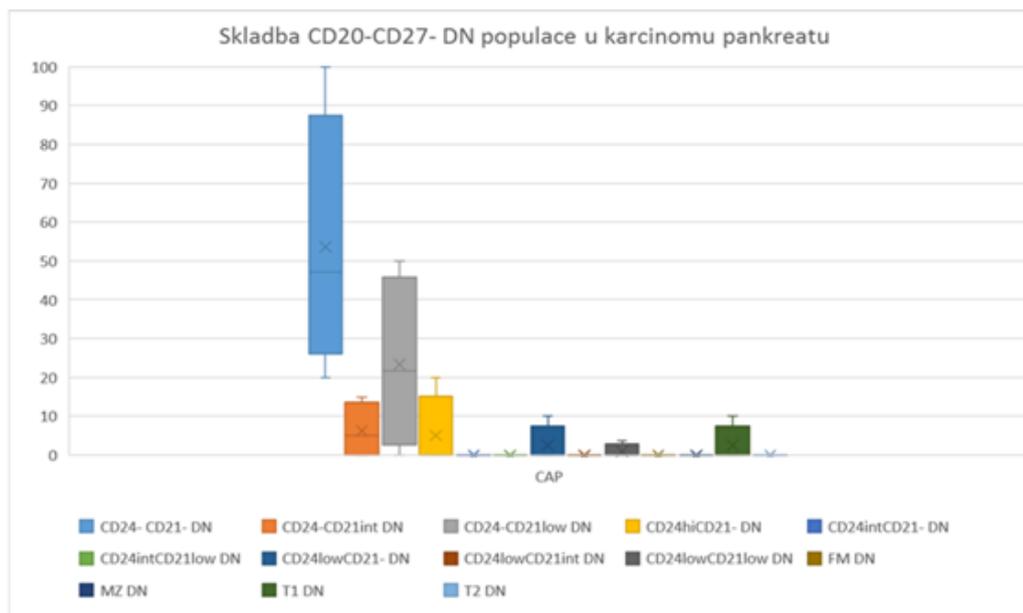
	CD24- DN T1gM	CD24- CD21int DN T1gM	CD24- CD21low DN T1gM	CD24hi - DN T1gM	CD24int CD21- DN T1gM	CD24int CD21low DN T1gM	CD24low CD21- DN T1gM	CD24low CD21int DN T1gM	CD24low CD21low DN T1gM	FM DN T1gM	MZ DN T1gM	T1 DN T1gM	T2 DN T1gM
Stř. hodnota	53,0621212	2,24818182	25,8230303	1,50636364	0,75393939	0,96424242	0,78878788	0,4630303	1,55636364	2,67333333	0,14393939	0,81181818	5,5669697
Chyba stř. hodnoty	5,0311789	0,70550117	3,85524226	0,7831347	0,30878119	0,63494811	0,33584661	0,38001109	0,70891654	1,62423156	0,12784189	0,37672016	2,79810476
Medián	56,25	0	21,95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Směr. odchylka	28,9019224	4,05279568	22,1466807	4,49876637	1,77181288	3,64749917	1,9292919	2,18299749	4,07241545	9,33049994	0,73439575	2,16409256	16,0718881
Rozdíl max-min	100	18,27	76,74	21,59	7,69	20	7,69	12,5	20	50	4,2	10	66,67
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maximum	100	18,27	76,74	21,59	7,69	20	7,69	12,5	20	50	4,2	10	66,67
Počet	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
Hladina spolehlivosti [95,0%]	10,2481761	1,43705886	7,85287151	1,59519319	0,6289667	1,29334697	0,68409716	0,77405725	1,44401573	3,30845142	0,26040541	0,76735385	5,69955288



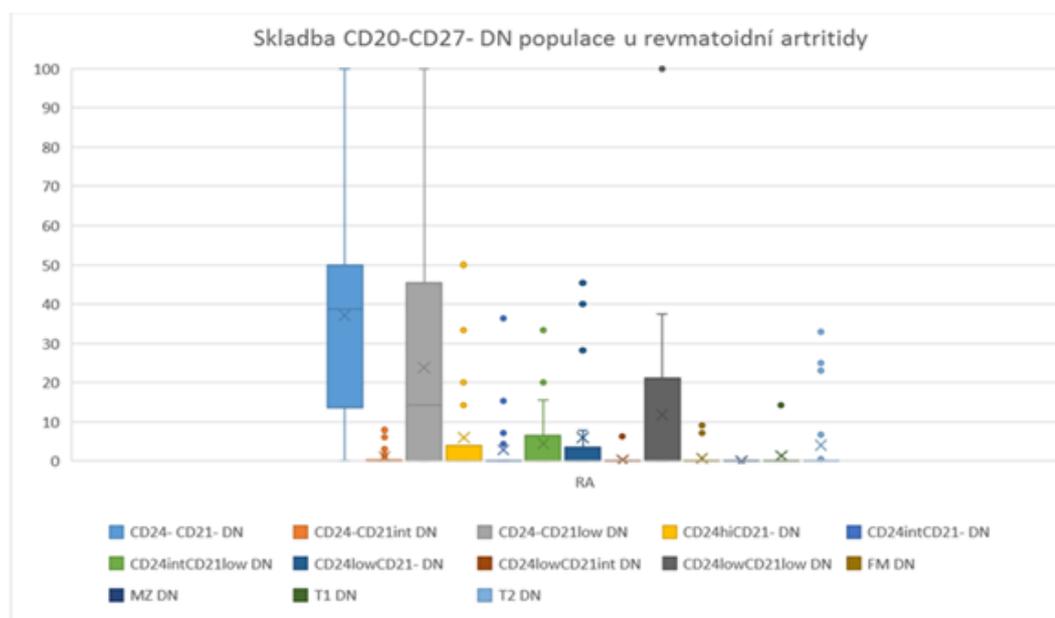
	CD24- DN T1gM	CD24- CD21int DN T1gM	CD24- CD21low DN T1gM	CD24hi - DN T1gM	CD24int CD21- DN T1gM	CD24int CD21low DN T1gM	CD24low CD21- DN T1gM	CD24low CD21int DN T1gM	CD24low CD21low DN T1gM	FM DN T1gM	MZ DN T1gM	T1 DN T1gM	T2 DN T1gM
Stř. hodnota	62,776	1,449	18,432	0,671	1,159	0,576	4,072	0,132	4,852	0,037	0,000	2,265	1,899
Chyba stř. hodnoty	6,020	0,668	4,349	0,284	0,620	0,343	1,578	0,112	1,990	0,037	0,000	1,517	1,496
Medián	58,670	0,000	14,290	0,000	0,000	0,000	2,380	0,000	0,430	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	24,822	2,756	17,930	1,172	2,557	1,416	6,505	0,463	8,205	0,153	0,000	6,254	6,166
Rozdíl max-min	75,000	10,420	52,080	4,050	10,170	5,560	25,000	1,900	28,810	0,630	0,000	25,000	25,000
Minimum	25,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	100,000	10,420	52,080	4,050	10,170	5,560	25,000	1,900	28,810	0,630	0,000	25,000	25,000
Počet	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000	17,000
Hladina spolehlivosti [95,0%]	12,762	1,417	9,219	0,603	1,315	0,728	3,345	0,238	4,219	0,079	0,000	3,216	3,170

Obrázek 34 Grafické a tabelární porovnání ukazatelů popisné statistiky pro distribuci jednotlivých CD20-CD27- DN populací u kontrol a pacientů s kolorektálním karcinomem





	CD24- DN TjyM	CD24- CD21int DN TjyM	CD24- CD21low DN TjyM	CD24hi CD21-DN TjyM	CD24int CD21-DN TjyM	CD24int CD21low DN TjyM	CD24low CD21-DN TjyM	CD24low CD21int DN TjyM	CD24low CD21low DN TjyM	FM DN TjyM	MZ DN TjyM	T1 DN TjyM	T2 DN TjyM
Stř. hodnota	55,188	3,004	28,832	2,000	0,666	0,666	2,620	0,000	0,272	0,000	0,000	3,334	0,664
Chyba stř. hodnoty	9,873	1,316	9,880	2,000	0,666	0,666	1,730	0,000	0,272	0,000	0,000	3,334	0,664
Medián	55,100	3,330	19,050	0,000	0,000	0,000	0,680	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	22,076	2,942	22,092	4,472	1,489	1,489	3,868	0,000	0,608	0,000	0,000	7,455	1,489
Rozdíl max-min	51,300	6,250	56,970	10,000	3,330	3,330	9,090	0,000	1,360	0,000	0,000	16,670	3,330
Minimum	27,270	0,000	6,670	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	78,570	6,250	63,640	10,000	3,330	3,330	9,090	0,000	1,360	0,000	0,000	16,670	3,330
Počet	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
šířina spolehlivosti (95,0%)	27,410	3,653	27,431	5,553	1,849	1,849	4,803	0,000	0,755	0,000	0,000	9,257	1,849



	CD24- DN TjyM	CD24- CD21int DN TjyM	CD24- CD21low DN TjyM	CD24hi CD21-DN TjyM	CD24int CD21-DN TjyM	CD24int CD21low DN TjyM	CD24low CD21-DN TjyM	CD24low CD21int DN TjyM	CD24low CD21low DN TjyM	FM DN TjyM	MZ DN TjyM	T1 DN TjyM	T2 DN TjyM
Stř. hodnota	44,494	2,778	21,144	2,565	3,163	1,996	6,938	0,655	8,351	0,894	0,000	1,125	3,503
Chyba stř. hodnoty	5,562	1,040	4,059	1,105	1,779	0,668	2,804	0,352	3,052	0,460	0,000	0,585	1,681
Medián	39,645	0,610	19,830	0,000	0,000	0,000	1,175	0,000	1,880	0,000	0,000	0,000	0,000
Směr. odchylka	26,089	4,879	19,037	5,182	8,342	3,133	13,153	1,652	14,316	2,158	0,000	2,742	7,885
Rozdíl max-min	89,130	20,000	66,670	18,920	36,360	10,000	45,450	6,900	60,000	9,090	0,000	10,810	31,080
Minimum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum	89,130	20,000	66,670	18,920	36,360	10,000	45,450	6,900	60,000	9,090	0,000	10,810	31,080
Počet	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000	22,000
šířina spolehlivosti (95,0%)	11,567	2,163	8,441	2,298	3,699	1,389	5,832	0,732	6,347	0,957	0,000	1,216	3,496

Obrázek 36 Grafické a tabelární porovnání ukazatelů popisné statistiky pro distribuci jednotlivých CD20-CD27- DN populací u pacientů s karcinomem pankreatu (CAP) a revmatoidní artritidou

## 10.5 Statistická analýza distribucí frekvencí CD19+CD20-CD27- periferních lymfocytárních subpopulací

Za využití neparametrického testu podle Mann-Whitneyové byla provedena statistická analýza distribucí frekvencí CD19+CD20-CD27- periferních B lymfocytárních subpopulací. Ke zpracování získaných dat byl využit program GraphPad Prism6. Pro potřeby statistické analýzy byly testovány populace s následujícími imunofenotypy:

CD19+CD20-CD27-CD24-CD21- (Obrázek 37 na straně 112)

CD19+CD20-CD27-CD24-CD21int (Obrázek 38 na straně 112)

CD19+CD20-CD27-CD24-CD21low (Obrázek 39 na straně 113)

CD19+CD20-CD27-CD24highCD21- (Obrázek 40 na straně 113)

CD19+CD20-CD27-CD24intCD21- (Obrázek 41 na straně 114)

CD19+CD20-CD27-CD24intCD21low (Obrázek 42 na straně 114)

CD19+CD20-CD27-CD24lowCD21- (Obrázek 43 na straně 115)

CD19+CD20-CD27-CD24lowCD21int (Obrázek 44 na straně 115)

CD19+CD20-CD27-CD24lowCD21low (Obrázek 45 na straně 116).

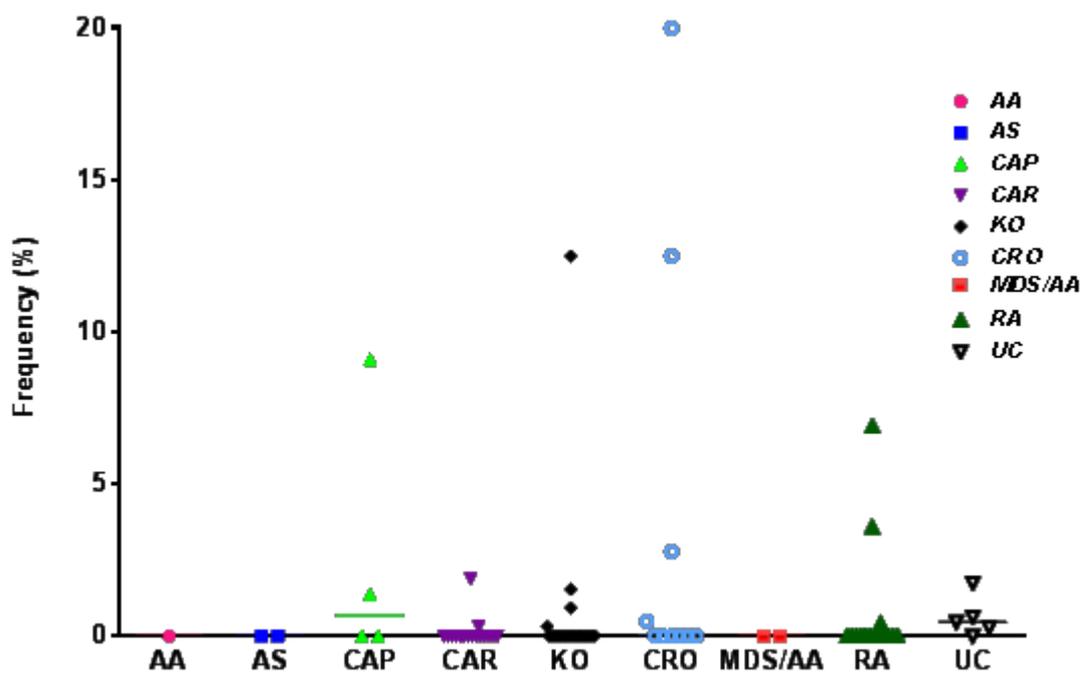
U jednotlivých zjištěných subpopulací byly porovnávány distribuce zjištěné u souboru kontrol a u pacientů s jednotlivými patologiemi, a to včetně těch, které byly zastoupeny malým počtem vzorků. V grafech jsou vždy označeny signifikantní rozdíly pro hladiny pravděpodobnosti  $p < 0,05$ . Ačkoli rozdíly ve frekvencích mezi jednotlivými studovanými skupinami jsou patrné, neobjevili jsme žádné signifikantní rozdíly.





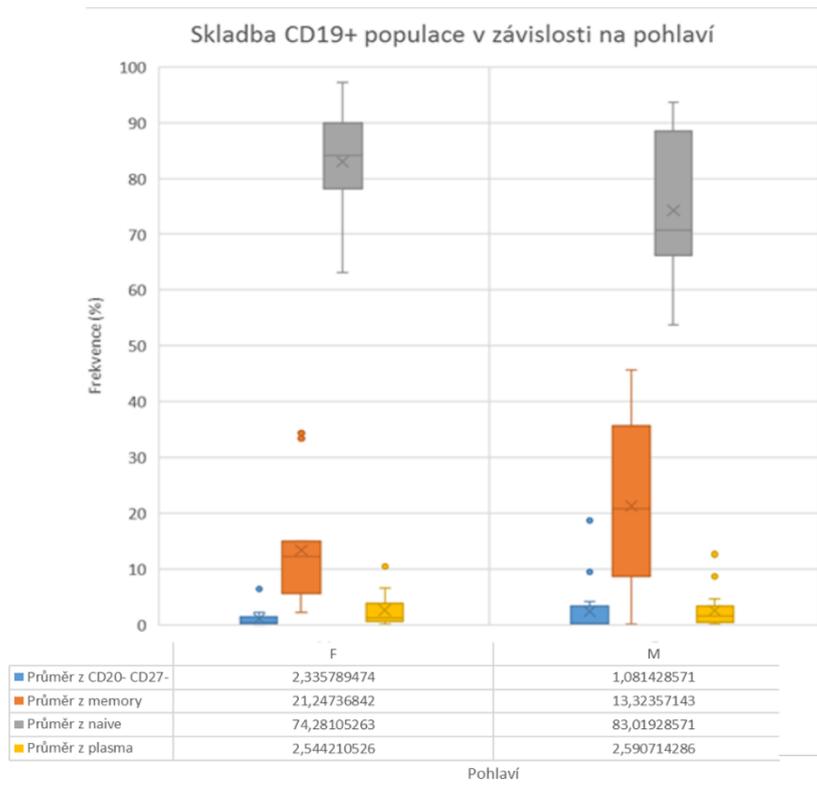






Obrázek 45 Frekvence CD19+CD20-CD27-CD24lowCD21low DN B lymfocytů (řazeno abecedně, AA-aplastická anémie, AS – ankylozující spondylitida, CAP-karcinom pankreatu, CAR-kolorektální karcinom, KO-kontroly, CRO-Crohnova nemoc, MDS/AA -překrývající se myelodysplastický syndrom s aplastickou anémií, RA-revmatoidní artritida, UC -ulcerózní kolitida).

## 10.6 Skladba CD19+ periferních populací lymfocytů v závislosti na pohlaví

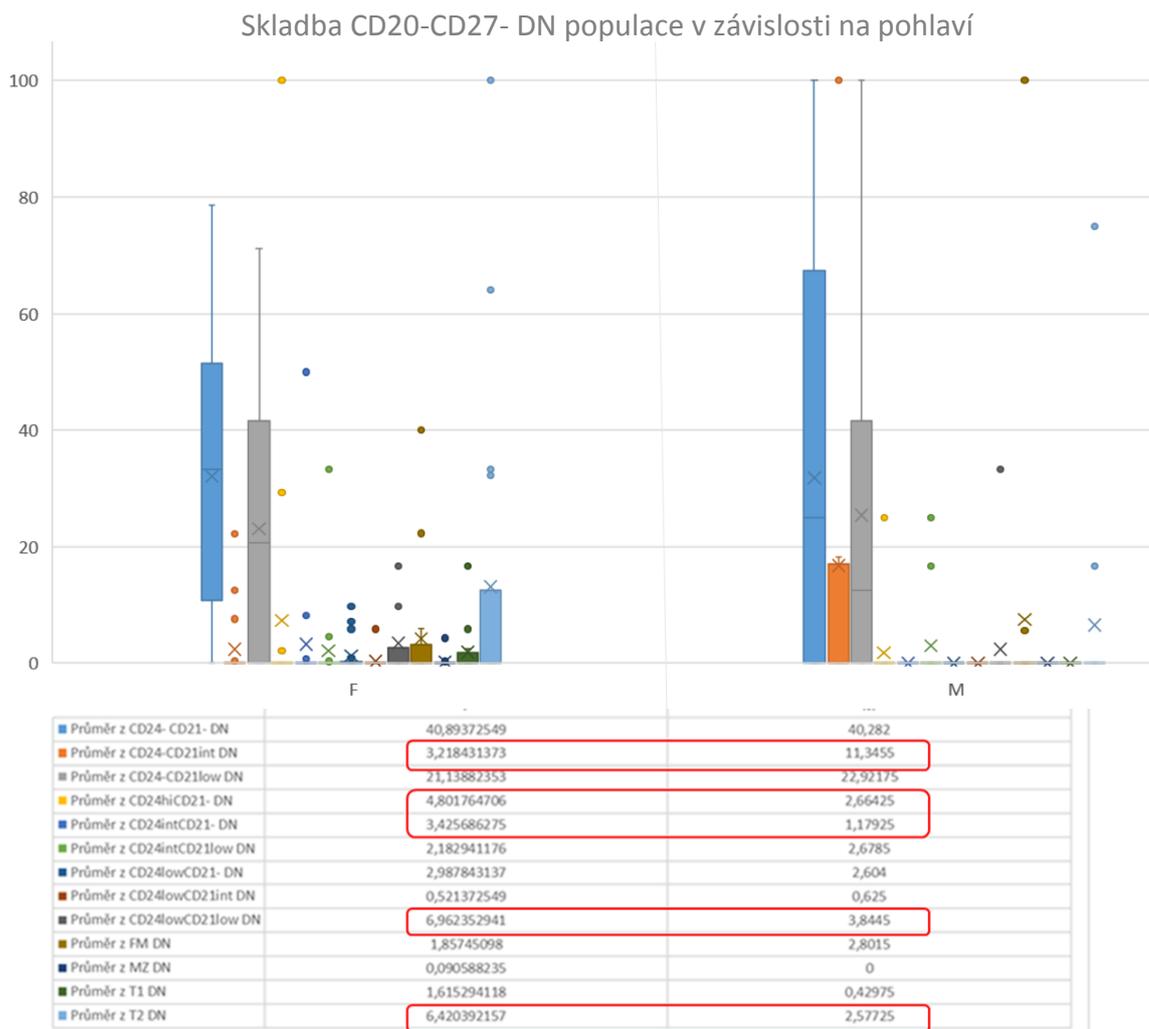


Obrázek 46 Skladba CD19+ periferních lymfocytárních populací v závislosti na pohlaví

jsme například probandy, kteří uvedli, že v nedávné době prodělali velmi mírně probíhající infekci). Ukázalo se, že vliv pohlaví na skladbu těchto populací nelze vyloučit.

Podobně při zaměření se na zájmovou CD20-CD27- DN populaci se ukázalo, že lze zaznamenat odchylky v jejich průměrném zastoupení především u populace CD24-CD21<sup>int</sup> DN, CD24<sup>hi</sup>CD21- DN, CD24<sup>int</sup>CD21- DN, CD24<sup>low</sup>CD21<sup>low</sup> a u T2 DN, viz Obrázek 47 na straně 118. Byť jsme si vědomi omezení použití tohoto parametru, především u takto nízkého počtu probandů, v příštích experimentech bychom rádi doplnili databázi vzorků tak, abychom mohli zjistit, zda je vazba pohlaví na distribuci jednotlivých subpopulací statisticky významná.

Autoimunitní onemocnění se často vyskytují u jednoho z pohlaví s vyšší incidencí (Baumgart a Carding 2007, Perez-Andres, Paiva et al. 2010, Molodecky, Soon et al. 2012), zajímalo nás proto, zda jsou u CD19+ periferních lymfocytů postihnutele rozdíly v jejich distribuci již na úrovni hlavních populací. Do sledované skupiny jsme zařadili 14 zdravých mužů a 18 zdravých žen, kteří v době odběru nehlásili žádné obtíže (vyloučili



Obrázek 47 Srovnání skladby populací CD20-CD27- DN v závislosti na pohlaví

## 10.7 Další raritní subpopulace zjištěné v periferní krvi

S ohledem na to, že jsme použili velmi komplexní manuální postup strategie vymezení bran, podařilo se nám vytypovat přes 20 dalších velmi raritních populací, které se vyskytovaly jak u kontrol, tak u pacientů. Z tohoto pohledu se jako velmi zajímavá skupina jeví *non-memory* B lymfocyty podle definice Benítezové (2014), tedy nezralé T1 (IgM+CD19+CD21lowCD24highCD27-) a T2 (IgM+CD19+CD21highCD24intCD27-) tranzientní lymfocyty, zralé folikulární B lymfocyty (IgM+CD19+CD21intCD24intCD27-) a lymfocyty marginální zóny (IgM+CD19+CD21highCD24highCD27-), ale také tranzientní a extratranzientní lymfocyty definované podle definice Berkowské (2011) a folikulární lymfocyty I (IgM+CD19+CD21+CD24+CD27-CD38low) a folikulární lymfocyty II (IgM++CD19+CD21+CD24+CD27-CD38low), které se po přidání markerů CD38, IgG, IgD a IgA rozpadají do mikropopulací s frekvencí nižší než 0,001 %, tyto byly leckdy zastoupeny

jednou jedinou buňkou. Vzhledem k extrémní vzácnosti těchto populací jsme se rozhodli je do diplomové práce neuvádět, naopak se na ně pokusíme zaměřit v navazujících experimentech realizovaných na vzorcích periferní krve odebrané zdravým osobám v množství alespoň 60 ml tak, abychom je případně zachytili ve vyšších relativních četnostech.

Současně jsme při stanovování FMO kontrol u pacientů s karcinomem pankreatu zachytili zcela unikátní, 100 % se opakující velmi malou a denzní subpopulaci, která při zpětném vymezení spadala do populace CD19+ lymfocytů. Také tuto populaci jsme zatím blíže necharakterizovali.

Podrobné analýzy výše zmíněných populací budou taktéž předmětem navazujícího disertačního projektu.

## 11 Diskuze

Téma práce přímo navazuje na předchozí výzkumnou činnost týmu a zejména na poznatky, které byly získány v rámci společného grantového projektu Dr. Růžičkové a Dr. Vlkové zaměřeného na studium B lymfocytárních populací za fyziologického stavu u zdravých jedinců a u pacientů s CVID (z angl. *common variable immunodeficiency*, běžná variabilní imunodeficience). Data byla publikována v *Journal of Immunology* v roce 2010 (Vlková et al. 2010), kdy byl použit šestibarevný B buněčný panel (CD27, CD38, IgM, CD21, CD24 a CD19), pomocí kterého se poprvé podařilo prokázat existenci FO I (IgM<sup>int</sup>CD27<sup>neg</sup>CD38<sup>int</sup>CD24<sup>int</sup>) a FO II (IgM<sup>high</sup>CD27<sup>neg</sup>CD38<sup>int</sup>CD24<sup>pos</sup>) B lymfocytů u člověka. Tato práce byla dalším kamínkem mozaiky potvrzujícím hypotézu, že klasicky přijímané makropopulace B lymfocytů v periferní krvi člověka nejsou homogenní (hlavní populace B lymfocytů viz Obrázek 48 na str. 120), a že při rozšíření panelu sledovaných znaků bude možné poodkrýt tajemství této heterogenity a popsat menší buněčné populace, které mohou hrát svou roli, ať pozitivní nebo negativní, v patogenezi celého spektra chorob.

Populace B lymfocytů	Imunofenotyp									
naivní	CD19+	CD20+	CD27-							
paměťové	CD19+	CD20+	CD27+							
plazmatické	CD19+	CD20-	CD27+							
T1 (tranzientní 1)	CD19+			CD21low	CD23low	CD24high		IgMhigh	IgDlow	
T2 (tranzientní 2)	CD19+			CD21high	CD23high	CD24high		IgMhigh	IgDhigh	
FM (folikulární maturované)	CD19+			CD21+	CD23+	CD24+	CD38+	IgM+	IgD+	
FO I (folikulární I)	CD19+		CD27-	CD21+		CD24+	CD38low	IgM+		
FO II (folikulární II)	CD19+		CD27-	CD21+		CD24++	CD38low	IgM++		
MZ (marginální zóny)	CD19+			CD21high	CD23-			IgMhigh	IgD+	

Obrázek 48 Hlavní populace B lymfocytů, zjednodušeno - Klein et al. (1998) a Vlková et al. (2010)

Strategie použitá při realizaci jedenáctibarevného B buněčného panelu pro potřeby tohoto diplomového projektu se inspiroje protokolem vytvořeným Kalinou (2009) a aplikovaným Vlkovou (2010) a dále rozpracovaným Mgr. Pokáskem (Polák 2014), ale došlo k významné modifikaci spočívající v rozšíření počtu sledovaných povrchových znaků o molekuly, které hrají výraznou roli při diferenciaci B lymfocytů v rámci lymfopoézy, konkrétně o molekuly IgD, IgA, IgG a CD20. Současně jsme přehodnotili skladbu a odečet kompenzačních a individuálních kontrol, významně upravená byla strategie vymezení, která vychází z prací Kleina et al. (1998), Warnatze et al. (2002), Berkowské et al. (2011) a Benítezové et al. (2014) (nepaměťové B lymfocyty, tzv. *non-memory B cells*). Tento přístup nám umožnil identifikovat ve sledovaných vzorcích periferní krve i mini- až mikropopulace B lymfocytů, které jsme podřadili pod termín „raritní“.

Jak bylo nastíněno v úvodní rešerši, výzkum raritních populací je provázen některými specifickými problémy: je důležité přísně dbát na zachování srovnatelných odběrových podmínek, analýzy (a tedy i získaná data) jsou omezeny velikostí vzorku, ovlivněny poměrem signálu/šumu použité metody, reprodukovatelnost experimentu, softwarové zpracování dat, statistické vyhodnocení nastavení kontrolních mechanismů a interpretace získaných výsledků.

## 11.1 Limitace velikosti vzorku

Velikost vzorku v případě raritních populací je jedním z jejích definičních znaků, a není mnoho způsobů, jakými by bylo lze jej zvětšit. Čím nižší je frekvence cílového populace, tím větší vzorek je potřeba zanalyzovat. Zdánlivě nejjednodušší způsob, tedy zvýšení odebíraného množství periferní krve, naráží na etická omezení. Nelze aplikovat přístup, při kterém by zvýšení výtěžnosti vzorku znamenalo neúměrnou zátěž subjektu. Proto je potřeba zvolit takový postup, který povede k maximalizaci zisku informace za standardních odběrových podmínek, v našem případě odběr 7 ml periferní krve do zkumavek EDTA a následná izolace 0,5 milionu PBMC využitých pro měření na průtokovém cytometru.

Prvním způsobem zvýšení výtěžnosti vzorku je využití průtokové cytometrie s tříděčem buněk za použití vzorku, který prošel imunomagnetickou separací, druhou cestu představuje koncentrace vzorku modifikací rychlosti toku buněk při průchodu optickou částí průtokového cytometru a třetí nastavení prahové hodnoty fluorescence (Donnenberg a Donnenberg 2007).

### 11.1.1 Limitace použitou separační metodou

Standardně byla použita imunomagnetická separace (IMS, z angl. *immunomagnetic separation*), což je metoda, pomocí které se vytrídí buňky na základě přítomnosti určitých povrchových identifikačních znaků. Metoda vychází z vazby buněk na magnetické částice, které jsou potaženy specifickými selekčními molekulami. Po navázání lze vzniklé komplexy buňka-magnetická částice z heterogenní suspenze separovat pomocí vnějšího magnetického pole. Použití magnetické selekce jako předkroku pro průtokovou cytometrii vede ke zvýšení koncentrace zájmových buněk v analyzovaném vzorku (Paulík 2005, Bartůňková, Paulík et al. 2011).

Omezení této metody vyplývají z její podstaty, během separace buněk může dojít k odfiltrování buněk, které nesou některý ze zájmových povrchových znaků, a získaná data tak

nemusejí odpovídat skutečnosti (Donnenberg a Donnenberg 2007). Právě vysoké riziko možnosti ztráty celých skupin buněk a zkreslení získaných dat bylo důvodem, proč jsme tento postup pro rutinní analýzu nakonec nezvolili.

### 11.1.2 Modifikace rychlosti toku buněk

Ovlivnění koncentrace vzorku pomocí modifikace rychlosti toku buněk vychází z odlišných tlakových vlastností hnací kapaliny a vzorku. Pokud je tlak vzorku vyšší než tlak hnací kapaliny, dojde k rozšíření jeho proudového paprsku. Záporům tohoto postupu je, že se zvyšuje míra koincidence, neboť ve stejnou dobu se mohou do prostoru snímacího prostoru dostat dvě buňky, vznikají tzv. dublety (tzv. *doublents*). S tím je nutno počítat během vyhodnocování vzorku, a pomocí specifické brány vymezení je z analýzy odstranit (Donnenberg a Donnenberg 2007).

Jako optimální se jeví postup, kdy dojde ke koncentraci vzorku těsně pod mez maximální detekční rychlosti přístroje. Vzhledem k technické náročnosti tohoto postupu, zvýšené možnosti ztráty buněk ze zájmových populací, které by se mohly snadno dostat do dubletu a obtížné realizaci na přístroji, který je komerčně využíván širokou vědeckou veřejností, jsme tento postup ani nezvažovali.

### 11.1.3 Nastavení fluorescenčního prahu

Poslední cestou, kterou lze zvýšit výtěžnost vzorku, je nastavení fluorescenčního prahu detekce. Fluorescenčním prahem rozumíme nejnižší intenzitu signálu emitovanou fluoreskující částicí, kterou lze odlišit od pozadí (Wood a Hoffman 1998). Tento postup je ovlivněn hladinou šumu pozadí (angl. *background noise*) a efektivitou konverze signálu přecházejícího z molekuly fluorochromu na fotoelektron (Wood a Hoffman 1998). Pro použití tohoto postupu je vhodné značit vzorek svítivými (jasnými) protilátkami (Donnenberg a Donnenberg 2007).

Tento přístup jsme zvolili pro potřeby našich analýz. V rámci použitého 11-barevného panelu jsme využili protilátky vázané na brilantní violet z produkce společnosti BD Horizon jako jsou BV510 (IgD), BV605 (IgG) nebo BV655 (IgM).

## 11.2 Poměr signál/šum

Poměr signál/šum se používá pro srovnání hladiny zájmového, užitečného signálu s hladinou šumu pozadí. Jako šum označujeme všechny signály, které mohou být zaměněny se

signálem emitovaným fluorochromy na povrchu živých buněk. Šum můžeme rozdělit do dvou kategorií, na elektronický šum a biologický šum.

Elektronický šum vzniká náhodným kolísáním elektronického signálu, případně jeho samovolnou novotvorbou. Elektronický šum lze jen obtížně odstranit, je to šum, který je inherentní, vzniká přímo ve vodičích a polovodičích použitých ve vlastním zařízení a jeho součástkách (Vobecký a Záhlava 2005).

Druhou kategorii představuje šum biologický. Pod pojem biologický šum spadají např. signály apoptotických nebo mrtvých buněk, autofluorescence některých povrchových molekul, signály vyplývající z nespecifické vazby fluorochromu, které imitují nebo narušují užitečný signál produkovaný zájmovými buňkami (Donnenberg a Donnenberg 2007). Tyto rušivé signály – šum – by mohly být zdrojem zanesení arteficiálních informací, proto je potřeba je před vlastní analýzou vzorku odfiltrovat, případně zajistit jednotnou hodnotu šumu pro negativní a pozitivní populace tak, aby bylo lze zajistit homogenní původ sledovaného signálu.

V mnohobarevné průtokové cytometrii se riziko vzniku nežádoucího biologického šumu zvyšuje. Aby se při vyhodnocování zamezilo falešně pozitivním výsledkům, využívá se při barvení buněk nastavení několika druhů kontrol (Shapiro 2005, Roth 2015). V první řadě se využívají izotypové kontroly, které slouží jako kontrola nespecifické vazby protilátky a také jako identifikační znak negativních populací ve vzorku (Shapiro 2005, Roth 2015). Pro nastavení kompenzace vzorku jsou nezbytné monoklonální kontroly (angl. *single stained controls*, jednobarevné kontroly, monokontroly). Po nabarvení vzorku jedním fluorochromem získáme vzorek s buňkami, které budou pro daný znak pozitivní, a ostatní, nenabarvené, které značí negativní populaci (Shapiro 2005, Roth 2015). V mnohobarevné cytometrii jsou nezbytné tzv. FMO kontroly (angl. *fluorescence minus one controls*). FMO kontrola obsahuje všechny fluorochromy použité v panelu vždy s výjimkou právě jednoho, který je jako negativní kontrola měřen. FMO kontrola slouží k určení hranic bran vymezení ve zvolené strategii, a může pomoci s odstraněním některých chyb vzniklých v důsledku nesprávné kompenzace vzorku (Shapiro 2005, Roth 2015).

Tento doporučený postup jsme aplikovali i v případě našeho laboratorního protokolu, kdy jsme v rámci barvení vzorků jednotlivými fluorochromy označili pozitivní populace pomocí monoklonálních kontrol a negativní populace pomocí FMO kontrol. Výsledná měření jsme prováděli na tzv. mixech, tedy na vzorcích označených všemi fluorochromy. Stanovení

hranic bran vymezení v jednotlivých protokolech pak probíhalo na základě odečtu hranic FMO kontrol.

Příprava monoklonálních protilátek a následné značení buněk je náročné na koncentraci i čas. Abychom se při těžení dat vyhnuli možnosti zanesení/vytvoření arteficiálních populací, byly všechny kroky jak odběru, zpracování vzorku, tak vyhodnocovacích protokolů přísně kontrolovány. Veškeré zpracování vzorků prováděly dvě osoby současně, s tím, že jedna osoba manipulaci se vzorkem prováděla, a druhá osoba tuto činnost dozorovala. V pravidelných intervalech se pak obě osoby při těchto činnostech střídaly. Tímto postupem jsme se snažili omezit možnost zanesení chyby z nesprávné manipulace se samotným vzorkem.

Analýza vzorku probíhala vždy na stejném přístroji, tedy na průtokovém cytometru BD LSR II, který je k dispozici v Centru pro Cytometrii a Mikroskopii MBÚ AVČR v. v. i., při stejném nastavení všech technických parametrů. Vlastní analýza probíhala vždy za asistence RNDr. Jana Svobody, PhD. Důvodem tohoto postupu bylo zachování maximální objektivizace dat, která jsou sbírána v delších časových úsecích.

### **11.3 Volba softwarového řešení pro analýzu dat**

Vzhledem k tomu, že naše výzkumná práce je zaměřena na analýzu diferenciačních stavů velmi malých populací B lymfocytů, je kladen vysoký nárok na softwarové rozhraní, které bude při analýzách použito. Proto byla potřeba zvolit program, který by splňoval vysoké nároky na možnost vizualizace analyzovaných dat, rychlost, individualizaci protokolu, a především výpočetní kapacitu pro zpracování mnoha miliónů událostí v reálném čase.

Po pečlivém uvážení všech alternativ dostupných na trhu a také těch, které jsou v portfoliu programového vybavení Přírodovědecké fakulty UK přístupného pro studenty magisterských oborů, byl pro analýzu vzorků periferní krve zvolen program Kaluza 1.5a (Beckman and Coulter), který umožňuje zpracování multiparametrických dat s objemem až 10 miliónů událostí na datovou složku. Mezi nepochybné přednosti tohoto programu patří i to, že vedle řady standardních analytických nástrojů ve 2D prostředí, jako jsou histogramy, dot plot grafy či konturové grafy apod., umožňuje též 3D analýzu v podobě tzv. radarových grafů, tzv. *radar plot*, s možností vymezení hran ve 3D vizualizaci, či shlukování analyzovaných populací na základě strategie vymezení do souvztažných rodokmenů s možností zkombinování dat z až 28 dvourozměrných grafů v podobě tzv. *pedigree plot*. Pro potřeby imunofenotypové

charakterizace cílových populací se jednalo o nejhodnější řešení, neboť takovéto srovnání dat umožňuje orientaci ve vzájemných vztazích mezi jednotlivými vymezenými populacemi až do hloubky 8 rovin. Pro technickou a interpretační náročnost 3D analýzy dat nebyla tato pro potřeby této diplomové práce využita, počítáme s jejím rutinním použitím v navazujícím disertačním projektu.

Program Kaluza 1.5a splnil naše očekávání, přesto pro budoucí práce na souboru dat získaných z 11 – barevného panelu v rámci analýzy B lymfocytů zvažujeme i možnost využití dalších, především opensource programů. Jmenovitě se jedná o programy Flowing Software či Cytobank, které umožňují vysokorychlostní analýzu dat v reálném čase a tvorbu tzv. heat map či fosforylační analýzy (Sahraneshin Samani, Moore et al. 2014), což jsou nástroje, které v programu Kaluza 1.5a nejsou zatím dostupné. Uvažujeme i o využití automatického softwarového vyhodnocení cytometrických dat za pomoci opensource programu FLOCK (FLOW Clustering without K) (Qian Y et al., 2010).

Předpokládáme, že přehledná, čitelná a názorná vizualizace komplexních biologických dat pořízená v prostředí programu Kaluza 1.5a doplněná o soubor tzv. *heat map* nám umožní vytvořit jednoduše interpretovatelné protokoly, které by mohly být využitelné v klinické praxi jako pomocný nástroj v diagnostice cílových onemocnění. Tyto protokoly budou jedním z výstupů disertační práce, která navazuje na tento diplomový projekt.

#### **11.4 Vyhodnocení naměřených dat – vstupní a výstupní kontrola**

Významným rizikem při vyhodnocování takto rozsáhlého souboru dat jsou i osoby, které analýzu provádějí. Vzhledem k rozsahu souboru, množství analyzovaných dat a riziku zanesení interindividuální chyby jsme v rámci týmu jednotlivé práce na tzv. „*raw data*“, tedy datech v podobě, ve které jsou jako .fcs soubory získány z průtokového cytometru, a kroky související s vyhodnocovacími protokoly, rozdělili. Mgr. Andrea Grígelová byla zodpovědná za kompenzaci veškerých dat a odečet FMO kontrol, kontrolu výstupu dat z kompenzací prováděl Mgr. Milan Polák, stanovení hranic bran ve zvolených strategiích vymezení u jednotlivých vzorků ve všech definovaných protokolech realizovala Mgr. Andrea Grígelová spolu s Mgr. Renatou Suchou podle unifikovaného postupu, před vlastní finalizací a statistickým vyhodnocením dat byl celý postup a konečný výstup opět kontrolován Mgr. Milanem Polákem.

Vlastní analýza naměřených dat před zahájením vymezení populací prošla kontrolou na stabilitu měření, kdy se porovnal parametr času s analýzou bočního rozptylu. Po tomto mezikroku jsme se zaměřili to, abychom data tzv. vyčistili. V první fázi jsme se zaměřili pouze na živé buňky a ze vzorku odstranili veškeré mrtvé buňky a debris za použití parametru barviva Hoechst 33258 a parametru FSC-A, následně odstranili všechny dublety pomocí parametrů FSC-H a FSC-A. Teprve z takto vyčištěných dat jsme vymežili populaci lymfomonocytárních buněk (lymfomono), která sloužila jako výchozí populace pro další rozbor. Jako vnitřní kontrola jednotlivých kroků v rámci protokolu byla ve všech případech použita strategie tzv. *backgating control*, tedy zpětného vymezení bran, pomocí které jsme mohli ověřit alokaci jednotlivých buněk do správné imunofenotypové rodiny (použitý protokol je znázorněn na stránkách 89 – 96). Tímto způsobem jsme se snažili zabránit umělému vnesení arteficiálních populací a získat „*fair data*“, která by za použití stejného protokolu byla verifikovatelná nezávislým měřením třetí osobou.

## 11.5 Použitý panel protilátek

V námi použitým B buněčném panelu sledujeme expresi až deseti povrchových znaků, současně (CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38, IgM, IgD, IgA a IgG). Jedná se nejdůležitější molekuly asociované s diferenciací B lymfocytů během jejich periferního vývoje, a tento panel se pro účely naší analýzy jeví jako vhodný. Vzhledem k tomu, že do periferní krve mohou z orgánů primární lymfopoézy proniknout i ranější vývojová stadia B lymfocytů, a současně s narůstajícím objemem informací a postupem poznání o heterogenitě lidských B lymfocytárních populací, především o B-1b lymfocytech, zvažujeme rozšíření B lymfocytárního panelu o sledování znaků CD5 a CD10. CD5 bychom rádi přidali, neboť se ukazuje, že CD5+ B lymfocyty umí na antigen reagovat bez pomoci T lymfocytů, podílejí se reakčních mechanismech vrozené imunity a jsou velmi často asociovány s autoimunitními chorobami. Současně se jedná o B lymfocyty, které vznikají ve fetálních játrech během rané ontogeneze, ke své sebeobnově nepotřebují kostní dřeň a v dospělosti je jejich koncentrace vysoká především v peritoneální a pleurální dutině (Herzenberg, Kantor et al. 1992, Neil, Summers et al. 1992, Hardy, Li et al. 2000, Hardy 2006, Esplin, Welner et al. 2009). Povrchový znak CD10 se během diferenciaci objevuje nejprve na Pro-B lymfocytech a ztrácí se v průběhu maturace. Jeho exprese se opakovaně zvyšuje při průchodu B lymfocytu zárodečným centrem, a dozrávání buněk, které jej exprimují, je tak antigenně dependentním procesem. CD10+ B lymfocyty jsou potom buňkami, které v rámci své maturace musely projít germinálním centrem

(Rossi, Yokota et al. 2003, Palanichamy, Barnard et al. 2009, Suponitskaia, Aleksankin et al. 2015).

Jako zajímavé se tak jeví nejen schéma jejich ontogenetického, ale také fylogenetického původu. S ohledem na tkáňový původ progenitorových buněk, by se mohlo jednat o B lymfocyty, které prošly odlišnou evoluční historií než konvenční B lymfocyty. Teoreticky lze předpokládat, že v lidském těle budou existovat místa primitivní lymfopoézy, která si zachovala svou evolučně konzervativní lokalizaci – mohlo by se to týkat shluků imunokompetentních buněk v oblasti GALT, především pozání B lymfocytárních populací ve tkáni Peyerových plaků nebo apendixu by mohly vnést více světla do pochopení patogenese onemocnění (Butler 1998, Eaden, Abrams et al. 2001, Weill, Weller et al. 2004, Lanning, Rhee et al. 2005, Danese a Fiocchi 2011, Gibbons a Spencer 2011, Molodecky, Soon et al. 2012).

## 11.6 Interpretace získaných výsledků

Celkem bylo nalezeno přes 40 minoritních nebo raritních subpopulací lidských periferních B lymfocytů, z nichž žádná nebyla doposud popsána.

Největší problém v interpretaci našich výsledků není dán pouze skutečností, že se jedná o data zcela nová a unikátní, ale také tím, že v podstatě neexistuje spolehlivý zvířecí model, který by představoval alespoň analogickou situaci jako u lidí.

Klasické myší modely nejsou pro naše účely použitelné vůbec, protože způsob vymezení a analýzy vždy zahrnuje použití povrchového znaku CD27 jako spolehlivého markeru paměťových B lymfocytů tzn. těch, které prošly reakcí v germinálním centru a jsou tedy antigenně zkušené. U myší takový povrchový znak nebyl popsán. Podobná situace platí pro povrchový znak CD38, jehož exprese a regulace je u myší a lidí odlišná, zároveň je rozdílná i jeho ontogenetická manifestace na povrchu buněk (Asquith, Miller et al. 2009, Gibbons a Spencer 2011, Breban, Araujo et al. 2014, Goyal, Rana et al. 2014).

Podobná omezení platí i pro studium imunitních pochodů u dalších rutinně využívaných modelových organismu jako jsou prasata (včetně gnotobiologických bezmikrobních kmenů nebo linií), krysy, kralíci, psi nebo kuřata (Zhou, Ord et al. 1991, Butler 1998, Lories 2006, Asquith, Miller et al. 2009, Bircan-Yıldırım, Çek et al. 2011, Gibbons a Spencer 2011, Breban, Araujo et al. 2014, Goyal, Rana et al. 2014). Ani u zástupců nižších či

vyšších primátů se nelze spoléhat na fylogenetickou a evoluční příbuznost imunitních systémů (Messaoudi, Estep et al. 2011).

Kromě toho každý lidský jedinec (stejně jako zvířecí) je během svého života již od jeho nejranějších fází kolonizován různými bakteriemi a viry, a výsledné spektrum individuálně specifické skladby mikrobiomu nutně interaguje s celým imunitním systémem, tedy i s různorodým spekterem B buněčných subpopulací existujících v celém organismu (Butler 1998, Gibbons a Spencer 2011).

Zároveň se potvrzuje, že bez použití rutinizovaných standardních postupů se cytometrická data mezi jednotlivými laboratořemi liší, zejména proto, že každá používá jiný cytometrický panel s jinou kombinací povrchových markerů a jinou strategii vymezení brán, a tím i určení výchozí populace.

První studie, která se alespoň podle demonstrováných dat věnovala významné podobnosti B lymfocytárních populací mezi člověkem a zvířecím modelem, je recentní práce Changa et al. z roku 2017.

V této práci se podařilo pomocí kombinace znaků CD3, CD20, CD21, CD27, IgM a IgG nalézt shodné nebo velmi podobné B lymfocytární populace u zdravých jedinců druhu makaka *Macaca rhesus* (též *M. mulatta*) a u zdravých lidských kontrol. V této studii bylo potvrzeno, že proběhlá nebo rekurentní infekce makaka virem opičího imunodeficitu (angl. *simian immunodeficiency virus* – SIV, analog lidského HIV) značně mění zastoupení některých minoritních B buněčných subpopulací.

Nejzajímavější výsledky jsme získali u patologií střevního traktu, především u skupiny pacientů s nespecifickým zánětem střev v podobě Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy a u onkologických pacientů s karcinomem pankreatu a kolorektálním karcinomem. Pacienti s kolorektálním karcinomem měli statisticky významně snížené nebo zvýšené frekvence v případě CD19+ B lymfocytární makropopulace, CD19+CD20-CD27- DN B lymfocytů, CD19+CD20+CD27- naivních, CD19+CD20+CD27+ paměťových B lymfocytů a CD19+CD20-CD27+ plazmatických buněk oproti kontrolám nebo Crohnově chorobě, respektive.

Pokud porovnáme frekvence výše uvedených B lymfocytárních populací mezi skupinou pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou, je patrný opačný trend (v

případě CD19+CD20-CD27- DN B lymfocytů a CD19+CD20-CD27+ plazmatických buněk statisticky významný).

Tento jev byl pozorovatelný i v případě, kdy jsme pomocí znaků CD21 a CD24 rozdělili populaci CD19+CD20-CD27- DN B lymfocytů na subsety ještě jemněji. Rovněž v tomto případě je imunofenotypový vzor u pacientů s Crohnovou chorobou opačný než u pacientů s ulcerózní kolitidou. To je v dobrém konsensu s klinickým pozorováním, neboť z lékařské praxe je známo, že Crohnova choroba a ulcerózní kolitida představují nejen klinicky, ale také histologicky odlišné nosologické jednotky. Pokud se naše pozorování heterogenity B lymfocytárních populací potvrdí i na rozsáhlejší souboru pacientů, budeme chtít tyto výlučné imunofenotypy ověřit a podložit analýzou molekulární exprese na úrovni mRNA a vyvinout cytometrický nástroj diferenciální diagnostiky.

Dále se nám potvrdilo, že subpopulace B buněk vykazují jednoznačně změny ve frekvencích v modu závislém na věku, kdy jsme ve frekvencích u populace paměťových CD19+CD27+ B lymfocytů, ale i cílové populace CD19+CD20-CD27- DN B lymfocytů sledovali trend jejich mírného poklesu v souvislosti se zvyšujícím se stářím jedince. Oproti tomu mírný nárůst jsme v souvislosti se stárnutím zaznamenali u populace naivních CD19+CD27- B lymfocytů. Frekvence populace plazmatických B lymfocytů byla napříč věkovými kategoriemi konstantní. Vzhledem k tomu, že námi sledovaný vzorek zdravých jedinců je velmi omezený (n = 33, při vyloučení opakovaných odběrů u stejného jedince), nemohli jsme data podrobit spolehlivé statistické analýze, nicméně naše pozorování jsou ve shodě s publikovanými údaji o imunosenescenci B lymfocytárních populací u člověka (Signer, Montecino-Rodriguez et al. 2007, Colonna-Romano, Bulati et al. 2008, Weiskopf, Weinberger et al. 2009, Nescakova a Bystricky 2011).

Podobně sledování rozdílů mezi frekvencemi naivních, paměťových, plazmatických a CD20-CD27- B lymfocytů, ale také mezi frekvencemi námi nově definovaných subpopulací, v závislosti na pohlaví ukazuje, že hormonální profil jedince, může jejich skladbu ovlivňovat. Vliv pohlaví na skladbu B lymfocytárních populací a rozvoj SLE sledovali Fan, Dong et al. (2014), kteří potvrdili, že na úrovni genové exprese B lymfocytů existují pohlavím podmíněné rozdíly, a že tyto rozdíly mohou být vázány na přítomnost estrogenů v těle (Fan, Dong et al. 2014). Domníváme se tak, že i v našem případě může být odlišná skladba CD20-CD27- DN subpopulací u mužů a žen podmíněna právě sníženou/zvýšenou produkcí estrogenů a receptorů pro něj, současně nemůžeme vyloučit vliv dalších vnitřních faktorů, jako je fáze ovulačního

cyklu, vliv hormonální aktivity tukové tkáně u jedinců s nadváhou až obesitou, případně vliv vnějších faktorů, jakými jsou například endokrinní disruptory v životním prostředí a stravě. Všechny tyto presumpce budeme muset zohlednit v rámci sběru populačních dat pro potřeby našich dalších pozorování.

Kromě korelace našich pozorování s klinickými daty vycházejícími z rutinně vyšetřovaných biochemických markerů zjištěných ze vzorků periferní krve v rámci odběru vzorku, bychom rádi vypracovali podrobnější formulářový dotazník rozšířený o anamnestické údaje týkající se informací o proběhlých akutních i chronických infekcích (horní dýchací cesty, trávící a urogenitální trakt, EBV a CMV), prodělaných operačních výkonech (např. apendektomie, adenotomie ) apod. Zároveň bychom rádi zahrnuli i informace o antropometrii sledovaného jedince a zmapování životního stylu, včetně stravovacích návyků.

## **11.7 Zdroje heterogenity B lymfocytárních populací v periferní krvi**

Imunitní systém je tvořen širokou paletou buněčných typů, přičemž hlavní populace adaptivního imunitního systému představují T lymfocyty a B lymfocyty. Klasické systematické dělení buněk organismu do různých buněčných typů vychází z jejich morfologické a fenotypové charakteristiky, tedy z jejich strukturních vlastností (Achim a Arendt 2014). Všechny buněčné typy v těle mnohobuněčných organismů vznikají diferenciací zygoty, jedné jediné buňky s kompletní sadou chromozomů. To znamená, že všechny buněčné typy v živočišném těle mají původ v jedné mateřské buňce. Pokud se zaměříme na evoluční vznik jednotlivých linií imunokompetentních buněk, můžeme se opírat o biogenetický zákon Ernsta Haeckla, tedy že ontogeneze je zkrácenou fylogenezí, a využít poznatky o ontogenetickém vývoji strukturního a molekulárního aparátu leukocytů pro pochopení jejich evolučního pozadí (Lovtrup 1978)? Nebo můžeme za jedno z východisek považovat třetí zákon von Baera, tedy že živočišná embrya jsou si v raných fázích velmi podobná a postupně během svého vývoje hromadí změny (Lovtrup 1978, Kalinka a Tomancak 2012)? Můžeme na pochopení příčin a momentů rozrůznění jednotlivých imunokompetentních buněčných typů aplikovat poznatky komparativní biologie? Je otázkou, do jaké míry lze na evoluci jednotlivých buněčných typů uplatnit poznatky týkající se Henigovy fylogenetické speciace. Je možné, že jednotlivé buněčné typy evolučně diferencovaly procesem anageneze, podobně jako živočišné druhy? Nebo můžeme na diferenciaci jednotlivých buněčných typů nahlížet jako na proces kladogeneze, tedy jako na proces, kdy dochází k oddělení jednotlivých vývojových linií, které se po odštěpení od

mateřského organismu vyvíjejí zcela samostatně. Jakou měrou se na heterogenitě B lymfocytárních populací podílejí genetické faktory podmíněné fylogenezí a evolucí? A do jaké míry se projevují faktory ontogenetické?

Skladba B lymfocytárních populací na ontogenetické úrovni organismu je bez pochyby ovlivněna faktory jako jsou genetické předpoklady, stravovací, pracovní návyky jedince, etnická příslušnost, pohlaví, věk včetně imunosenescence organismu, sezonalita a vliv biorytmů, skladba mikrobiomu, individuální klinická anamnéza a farmakoterapie včetně prodělané vakcinace. Je však otázníkem, jaký podíl na této vysoké heterogenitě nesou faktory evoluční a fylogenetické (např. přechod živých organismu z vodního prostředí na souš, klimatické výkyvy, proměny rozmnožovací strategie, změny ekologické niky a druhové skladby, transformace vzorců potravního chování atd.), byť jejich stopy si v těle nese každý organismus.

## **11.8 Alternativní pohled na B buněčnou adaptivní imunitu**

S postupem poznání se názor na postavení B lymfocytů v dichotomickém dělení imunitního systému na vrozený a adaptivní mění - B lymfocyty mají klíčovou roli jak v procesech vrozené, tak adaptivní imunity (Zouggari, Ait-Oufella et al. 2013).

Porovnejme si proto obecně přijímané vlastnosti imunitních buněk vrozené a adaptivní imunity. U vrozené imunity, jejíž elementy neprocházejí vývojem podobným somatické hypermutaci či genové konverzi, je obecně přijímána skutečnost, že její buňky jsou vybaveny arsenálem funkčních molekul (cytokiny, interleukiny, TLR, PRR atd.) umožňujících okamžitý nástup imunitní odpovědi. Vzhledem k jejich konzervativnímu programu je rychlost jejich adaptace na dynamicky se měnící podmínky okolního prostředí velmi pomalá, a změny v jejich profilu budou pozorovatelné v dlouhém evolučním měřítku na úrovni druhu. Oproti tomu buňky humorální složky adaptivní imunity, které jsou obecně považovány za evolučně pokročilejší, se od buněk vrozené imunity odlišují svou schopností s vysokou specifitou reagovat na měnící se prostředí jak vnitřní, tak vnější. Tato pružnost imunitní odpovědi má svůj podklad v molekulárních mechanismech jako jsou somatická hypermutace nebo izotypový přesmyk, které reflektují na imunologickou zkušenost získanou během ontogeneze konkrétního jedince. Na rozdíl od buněk vrozené imunity umí buňky adaptivní imunity generovat „imunologickou paměť“, a při opakovaném setkání se stejným antigenem reagovat na další ohrožení účinněji a rychleji. Oproti buňkám vrozené imunity představují pro organismus vyšší

nebezpečí, protože se schopností somatické mutace stoupá riziko vzniku autoreaktivních buněk, které by mohly ohrozit životaschopnost jedince cestou narušení vitálních tkání, orgánů, potažmo funkcí. V jejich vnitřní složitosti se odráží fylogeneticky narůstající komplexita spektra protilátek produkovaných B lymfocyty jednotlivých taxonů.

V rámci studia B lymfocytů narůstá množství poznatků o tom, že si jejich vybrané subsety zachovaly zcela starobylé funkce, jako je schopnost fagocytózy nebo cytocidní a mikrobicidní aktivita, které dosud byly připisovány výhradně složkám vrozené imunity. Je to dalším dokladem vzájemné podmíněnosti, závislosti a nutné kooperace obou v teorii definovaných systémů, které reálně nejsou odděleny, naopak jsou vzájemně provázány signalizačními drahami, bez nichž by obě složky nemohly plně fungovat. S ohledem na publikované informace v oblasti adaptivní (anticipatorní) imunitní odpovědi u zástupců nižších taxonů lze dovozovat, že adaptivní mechanismy a adaptivní imunitní odpověď organismu *per se* je starší než nástup specializovaných subsetů imunocytů a celý koncept je třeba revidovat (Slavik, Hutchcroft et al. 1999, Litmann et al. 2005, Para, Takizawa et al. 2013).

Závěrem tohoto oddílu lze shrnout, že k vývoji adaptivní a přirozené imunitní odpovědi docházelo současně a ve vzájemné kooperaci, nikoli konsekutivně. Z tohoto pohledu lze na B lymfocyty nahlížet jako na subset buněk, které si zachovaly své evolučně konzervované vlastnosti, avšak vlivem (nejen) celogenomových duplikací u nich došlo k posílení „adaptivních funkcí“ na úkor funkcí „vrozených“, byť jejich původní univerzální povaha zůstala v genetickém kódu ponechána.

Lze přepokládat, že s postupem prohlubování poznání o genetickém pozadí a funkčních biologických vlastnostech jednotlivých minoritních populací (nejen) B lymfocytů v organismu dojdeme k poznání, že funkční (efektorové, regulační) vlastnosti jednotlivých subsetů představují kontinuální spektrum dokládající posun a specializaci některých populací „vrozené“ imunity směrem k imunitě „adaptivní“, a to v závislosti na nárůstu komplexity organismu a environmentálních výzvách, kterým v průběhu makroevoluce i mikroevoluce musel daný druh čelit.

## 12 Shrnutí

Cílem této práce byl vývoj a rozpracování metody polychromatické průtokové cytometrie pro účely detekce raritních populací B lymfocytů v lidské periferní krvi – v osmi barevném a posléze 11-ti barevném schématu (včetně viability).

Součástí studie bylo vytypování kombinace povrchových CD znaků tak, aby bylo možno sledovat vývojová (aktivačně/diferenciační) stádia od migrujících T1 buněk z kostní dřeně až po terminálně diferencované plazmatické buňky. Dále bylo nutné vyvinout analyzační postup, který by byl co nejvíce objektivní a co nejméně závislý na osobě konkrétního hodnotitele naměřených dat.

Hlavní záměrem bylo zjistit, zda se raritní B buněčné populace v periferní krvi vůbec vyskytují a zda je možné je detekovat, a zda je jejich výskyt podobný nebo rozdílný ve skupině zdravých kontrol a pacientů s různými (imuno)patologiemi.

Byl vytypován panel obsahující následující znaky CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38, IgM; později doplněný o zbývající imunoglobulinové izotypy IgD, IgG a IgA. Výhodou tohoto panelu je, že jako tzv. zlatý standard a zároveň vnitřní kontrolu můžeme použít stanovení naivních, paměťových a plazmatických buněk dle Kleina.

Přítomnost raritních populací B lymfocytů v periferní krvi s frekvencemi pod 0,01% až 1‰ byla opakovaně potvrzena u souboru zdravých kontrol i pacientů s imunopatologiemi nebo nádorovými onemocněními. Rovněž byly nalezeny rozdíly ve frekvencích těchto populací v periferní krvi mezi kontrolami a pacienty, dokonce v případě karcinomu pankreatu byla nalezena zcela unikátní populace, která nebyla detekována u žádné testované skupiny osob.

Celkem jsme detekovali přes 40 B buněčných raritních subpopulací, vesměs dosud nepopsaných a nepublikovaných. Podle imunofenotypového vzoru se lze domnívat, že některé z těchto nově objevených subtypů jsou z hlediska ontogeneze na úrovni fetálních buněk.

V rámci rešeršní fáze diplomové práce a mezidruhové komparativní analýzy mechanismů B buněčné adaptivní imunity jsem došla k závěru, že u obratlovců existují ontogeneticky a fylogeneticky konzervativní tkáňové struktury a buněčné typy podržující si embryonální a fetální charakteristiky. Během experimentální práce jsem skutečně v periferní krvi objevila netypická B buněčná stádia, která např. nenesou žádné povrchové

imunoglobuliny, nebo CD19+ B lymfocyty, které postrádají expresi aktivačně/diferenciačních molekul CD20 a CD27. Právě tyto buňky by mohly odpovídat embryonálně-fetálním progenitorům neznámého původu, biologické a lokalizace.

Výsledky práce jsou podkladem pro navazující disertační práci, v níž jednak budou data dále analyzována a korelována s klinickými parametry a jejímž cílem je vytvořit jednoduché individualizované grafické schéma imunofenotypu konkrétního jedince.

## 13 Seznam použité literatury

Citace v textu byly vytvořeny za použití citačního programu EndNote X7. Příložený seznam použité literatury byl generován ve stejném rozhraní. Online zdroje byly validovány ke dni 27. 4. 2017.

1. Adlowitz, D. G., Barnard, J., Bear, J. N., Cistrone, C., Owen, T., Wang, W., Palanichamy, A., Ezealah, E., Campbell, D., Wei, C., Looney, R. J., Sanz, I. a Anolik, J. H. (2015). "Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response." *PLoS One* 10(6): e0128269.
2. Adolfosson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M. a Jacobsen, S. E. (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." *Cell* 121(2): 295-306.
3. Agematsu, K., Nagumo, H., Oguchi, Y., Nakazawa, T., Fukushima, K., Yasui, K., Ito, S., Kobata, T., Morimoto, C. a Komiyama, A. (1998). "Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: synergistic effect of interleukin-10 and CD27/CD70 interaction." *Blood* 91(1): 173-180.
4. Agius, C. a Roberts, R. J. (2003). "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." *J Fish Dis* 26(9): 499-509.
5. Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C. F., Malinin, N. L., Wallach, D., Yagita, H. a Okumura, K. (1998). "CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase." *J Biol Chem* 273(21): 13353-13358.
6. Alamanos, Y. a Drosos, A. A. (2005). "Epidemiology of adult rheumatoid arthritis." *Autoimmun Rev* 4(3): 130-136.
7. Allman, D. a Pillai, S. (2008). "Peripheral B cell subsets." *Curr Opin Immunol* 20(2): 149-157.
8. Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. a Hardy, R. R. (2001). "Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation." *J Immunol* 167(12): 6834-6840.
9. Anderson, C. A., Boucher, G., Lees, C. W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K. D., Lee, J. C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., Lagace, C., Scott, R., Amininejad, L., Bumpstead, S., Baidoo, L., Baldassano, R. N., Barclay, M., Bayless, T. M., Brand, S., Buning, C., Colombel, J. F., Denson, L. A., De Vos, M., Dubinsky, M., Edwards, C., Ellinghaus, D., Fehrmann, R. S., Floyd, J. A., Florin, T., Franchimont, D., Franke, L., Georges, M., Glas, J., Glazer, N. L., Guthery, S. L., Haritunians, T., Hayward, N. K., Hugot, J. P., Jobin, G., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., McGovern, D. P., Milla, M., Montgomery, G. W., Morley, K. I., Mowat, C., Ng, A., Newman, W., Ophoff, R. A., Papi, L., Palmieri, O., Peyrin-Biroulet, L., Panes, J., Phillips, A., Prescott, N. J., Proctor, D. D., Roberts, R., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Schumm, P., Seibold, F., Sharma, Y., Simms, L. A., Seielstad, M., Steinhart, A. H., Targan, S. R., van den Berg, L. H., Vatn, M., Verspaget, H., Walters, T., Wijmenga, C., Wilson, D. C., Westra, H. J., Xavier, R. J., Zhao, Z. Z., Ponsioen, C. Y., Andersen, V., Torkvist, L., Gazouli, M., Anagnou, N. P., Karlsen, T. H., Kupcinskis, L.,

- Sventoraityte, J., Mansfield, J. C., Kugathasan, S., Silverberg, M. S., Halfvarson, J., Rotter, J. I., Mathew, C. G., Griffiths, A. M., Geary, R., Ahmad, T., Brant, S. R., Chamaillard, M., Satsangi, J., Cho, J. H., Schreiber, S., Daly, M. J., Barrett, J. C., Parkes, M., Annesse, V., Hakonarson, H., Radford-Smith, G., Duerr, R. H., Vermeire, S., Weersma, R. K. a Rioux, J. D. (2011). "Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47." *Nat Genet* 43(3): 246-252.
10. Anderson, Michele K., Pant, Rashmi, Miracle, Ann L., Sun, Xiao, Luer, Carl A., Walsh, Catherine J., Telfer, Janice C., Litman, Gary W. a Rothenberg, Ellen V. (2004). "Evolutionary Origins of Lymphocytes: Ensembles of T Cell and B Cell Transcriptional Regulators in a Cartilaginous Fish." *The Journal of Immunology* 172(10): 5851-5860.
  11. Asokan, R., Banda, N. K., Szakonyi, G., Chen, X. S. a Holers, V. M. (2013). "Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE)." *Mol Immunol* 53(1-2): 99-110.
  12. Asquith, D. L., Miller, A. M., McInnes, I. B. a Liew, F. Y. (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* 39(8): 2040-2044.
  13. Bajoghli, B., Guo, P., Aghaallaei, N., Hirano, M., Strohmeier, C., McCurley, N., Bockman, D. E., Schorpp, M., Cooper, M. D. a Boehm, T. (2011). "A thymus candidate in lampreys." *Nature* 470(7332): 90-94.
  14. Ballantyne, Coco (2008). "Allergy genes flew the coop, according to evolutionary analysis." *Nat Med* 14(8): 797-797.
  15. Barbera-Guillem, E., Nelson, M. B., Barr, B., Nyhus, J. K., May, K. F., Jr., Feng, L. a Sampsel, J. W. (2000). "B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion." *Cancer Immunol Immunother* 48(10): 541-549.
  16. Barrat, F. S., Lesourd, B. M., Louise, A. S., Boulouis, H-J, Thibault, D. J., Neway, T. a Pilet, C. A. (1999). "Pregnancies modulate B lymphopoiesis and myelopoiesis during murine ageing." *Immunology* 98(4): 604-611.
  17. Bartůňková, Jiřina, Paulík, Milan a al., et (2011). *Vyšetřovací metody v imunologii: 2., přepracované a doplněné vydání.*
  18. Baumgart, D. C. a Carding, S. R. (2007). "Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology." *Lancet* 369(9573): 1627-1640.
  19. Baumgarth, N. (2011). "The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions." *Nat Rev Immunol* 11(1): 34-46.
  20. Benitez, A., Weldon, A. J., Tatosyan, L., Velkuru, V., Lee, S., Milford, T. A., Francis, O. L., Hsu, S., Nazeri, K., Casiano, C. M., Schneider, R., Gonzalez, J., Su, R. J., Baez, I., Colburn, K., Moldovan, I. a Payne, K. J. (2014). "Differences in mouse and human nonmemory B cell pools." *J Immunol* 192(10): 4610-4619.
  21. Berek, C. (2005). "[Do B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?]." *Z Rheumatol* 64(6): 383-388.
  22. Berkowska, Magdalena A., Driessen, Gertjan J. A., Bikos, Vasilis, Grosserichter-Wagener, Christina, Stamatopoulos, Kostas, Cerutti, Andrea, He, Bing, Biermann, Katharina, Lange, Johan F., van der Burg, Mirjam, van Dongen, Jacques J. M. a van Zelm, Menno C. (2011). "Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways." *Blood* 118(8): 2150-2158.

23. Binefa, G., Rodríguez-Moranta, F., Teule, À a Medina-Hayas, M. (2014). "Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine." *World J Gastroenterol* 20(22): 6786-6808.
24. Bircan-Yıldırım, Yasemin, Çek, Şehriban, Başusta, Nuri a Atik, Esin (2011). "Histology and Morphology of The Epigonal Organ with Special Referance to the Lymphomyeloid System in *Rhinobatos rhinobatos*." *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11(3).
25. Boehm, T. a Bleul, C. C. (2007). "The evolutionary history of lymphoid organs." *Nat Immunol* 8(2): 131-135.
26. Boehm, T., McCurley, N., Sutoh, Y., Schorpp, M., Kasahara, M. a Cooper, M. D. (2012). "VLR-based adaptive immunity." *Annu Rev Immunol* 30: 203-220.
27. Boehm, Thomas (2011). "Design principles of adaptive immune systems." *Nat Rev Immunol* 11(5): 307-317.
28. Boehm, Thomas (2012). "Evolution of Vertebrate Immunity." *Current Biology* 22(17): R722-R732.
29. Boehm, Thomas, Hess, Isabell a Swann, Jeremy B. (2012). "Evolution of lymphoid tissues." *Trends in Immunology* 33(6): 315-321.
30. Bonilla, F. A. a Oettgen, H. C. (2010). "Adaptive immunity." *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S33-40.
31. Borst, J., Sluysen, C., De Vries, E., Klein, H., Melief, C. J. a Van Lier, R. A. (1989). "Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation." *Eur J Immunol* 19(2): 357-364.
32. Breban, Maxime, Araujo, Luiza M. a Chiocchia, Gilles (2014). "Editorial: Animal Models of Spondyloarthritis: Do They Faithfully Mirror Human Disease?" *Arthritis & Rheumatology* 66(7): 1689-1692.
33. Bubenik, J. K., Zhou, L. J., Bell, P. D., Frizzell, R. A. a Tedder, T. F. (1993). "Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes." *J Cell Biol* 121(5): 1121-1132.
34. Bugatti, Serena, Vitolo, Barbara, Caporali, Roberto, Montecucco, Carlomaurizio a Manzo, Antonio (2014). "B Cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers." *BioMed Research International* 2014: 14.
35. Butler, J. E. (1998). "Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals." *Rev Sci Tech* 17(1): 43-70.
36. Calame, K. L. (2001). "Plasma cells: finding new light at the end of B cell development." *Nat Immunol* 2(12): 1103-1108.
37. Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J. a Seed, B. (1991). "The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family." *J Immunol* 147(9): 3165-3169.
38. Campbell, T.W. (2015). *Exotic Animal Hematology and Cytology*, Wiley.
39. Carey, J.L., McCoy, J.P. a Keren, D.F. (2007). *Flow Cytometry in Clinical Diagnosis*, ASCP.
40. Cariappa, A., Boboila, C., Moran, S. T., Liu, H., Shi, H. N. a Pillai, S. (2007). "The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations." *J Immunol* 179(4): 2270-2281.
41. Carroll, M. C. (1998). "The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity." *Annu Rev Immunol* 16: 545-568.

42. Carsetti, Rita, Rosado, M. Manuela a Wardmann, Hedda (2004). "Peripheral development of B cells in mouse and man." *Immunological Reviews* 197(1): 179-191.
43. Cerutti, A., Cols, M. a Puga, I. (2013). "Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes." *Nat Rev Immunol* 13(2): 118-132.
44. Colombo, Bruno M., Scalvenzi, Thibault, Benlamara, Sarah a Pollet, Nicolas (2015). "Microbiota and Mucosal Immunity in Amphibians." *Frontiers in Immunology* 6: 111.
45. Cooper, M. D. a Alder, M. N. (2006). "The evolution of adaptive immune systems." *Cell* 124: 815.
46. Cooper, N. R., Moore, M. D. a Nemerow, G. R. (1988). "Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment." *Annu Rev Immunol* 6: 85-113.
47. Cosnes, Jacques, Gower-Rousseau, Corinne, Seksik, Philippe a Cortot, Antoine (2011). "Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases." *Gastroenterology* 140(6): 1785-1794.e1784.
48. Crohn, B. B., Ginzburg, L. a Oppenheimer, G. D. (1932). "Regional ileitis: A pathologic and clinical entity." *Journal of the American Medical Association* 99(16): 1323-1329.
49. Dakwar, E., Reddy, J., Vale, F. L. a Uribe, J. S. (2008). "A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis." *Neurosurg Focus* 24(1): E2.
50. Danese, Silvio a Fiocchi, Claudio (2011). "Ulcerative Colitis." *New England Journal of Medicine* 365(18): 1713-1725.
51. Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A. a Kaiser, P. (2011). *Avian Immunology*, Elsevier Science.
52. de Boer, Mark, Kasran, Ahmad, Kwekkeboom, Jaap, Walter, Hugo, Vandenberghe, Peter a Ceuppens, Jan L. (1993). "Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells." *European Journal of Immunology* 23(12): 3120-3125.
53. De Dombal, F. T. (1968). "Ulcerative colitis: definition, historical background, aetiology, diagnosis, naturel history and local complications." *Postgraduate Medical Journal* 44(515): 684-692.
54. Deaglio, Silvia, Capobianco, Andrea, Bergui, Luciana, Dürig, Jan, Morabito, Fortunato, Dührsen, Ulrich a Malavasi, Fabio (2003). "CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." *Blood* 102(6): 2146-2155.
55. Deaglio, Silvia, Mehta, Kapil a Malavasi, Fabio (2001). "Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors." *Leukemia Research* 25(1): 1-12.
56. Dean, L. E., Jones, G. T., MacDonald, A. G., Downham, C., Sturrock, R. D. a Macfarlane, G. J. (2014). "Global prevalence of ankylosing spondylitis." *Rheumatology (Oxford)* 53(4): 650-657.
57. Demas, G. a Nelson, R. (2012). *Ecoimmunology*, Oxford University Press.
58. Di Sabatino, A., Carsetti, R., Rosado, M. M., Ciccocioppo, R., Cazzola, P., Morera, R., Tinozzi, F. P., Tinozzi, S. a Corazza, G. R. (2004). "Immunoglobulin M memory B cell decrease in inflammatory bowel disease." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 8(5): 199-203.
59. Donnenberg, A. D. a Donnenberg, V. S. (2007). "Rare-event analysis in flow cytometry." *Clin Lab Med* 27(3): 627-652, viii.
60. Dorner, T. a Lipsky, P. E. (2004). "Correlation of circulating CD27high plasma cells and disease activity in systemic lupus erythematosus." *Lupus* 13(5): 283-289.

61. Du Pasquier, L. (1992). "Origin and evolution of the vertebrate immune system." *Apmis* 100(5): 383-392.
62. Du Pasquier, Louis, Robert, Jacques, Courtet, Michèle a Mußmann, Rainer (2000). "B-cell development in the amphibian *Xenopus*." *Immunological Reviews* 175(1): 201-213.
63. Eaden, J. A., Abrams, K. R. a Mayberry, J. F. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." *Gut* 48(4): 526-535.
64. Edholm, E. S., Bengten, E., Stafford, J. L., Sahoo, M., Taylor, E. B., Miller, N. W. a Wilson, M. (2010). "Identification of two IgD+ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*." *J Immunol* 185(7): 4082-4094.
65. Esplin, Brandt L., Welner, Robert S., Zhang, Qingzhao, Borghesi, Lisa A. a Kincade, Paul W. (2009). "A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(14): 5773-5778.
66. Fagarasan, Sidonia a Honjo, Tasuku (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." *Nat Rev Immunol* 3(1): 63-72.
67. Fang, Xianfeng, Zheng, Pan, Tang, Jie a Liu, Yang (2010). "CD24: from A to Z." *Cell Mol Immunol* 7(2): 100-103.
68. Fan, H., Dong, G., Zhao, G., Liu, F., Yao, G., Zhu, Y. a Hou, Y. (2014): Gender differences of B cell signature in healthy subjects underlie disparities in incidence and course of SLE related to estrogen, *Journal of Immunology Research*, Volume 2014, article ID 814589
69. Fearon, D. T. a Carroll, M. C. (2000). "Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex." *Annu Rev Immunol* 18: 393-422.
70. Fekete, A., Soos, L., Szekanecz, Z., Szabo, Z., Szodoray, P., Barath, S. a Lakos, G. (2007). "Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses." *J Autoimmun* 29(2-3): 154-163.
71. Feldmann, M., Brennan, F. M. a Maini, R. N. (1996). "Rheumatoid arthritis." *Cell* 85(3): 307-310.
72. Fend, Falko, Nachbaur, David, Oberwasserlechner, Frieda, Kreczy, Alfons, Huber, Heinz a Müller-Hermelink, Hans Konrad (1991). "Phenotype and topography of human thymic B cells." *Virchows Archiv B* 60(1): 381-388.
73. Funaro, A., Morra, M., Calosso, L., Zini, M. G., Ausiello, C. M. a Malavasi, F. (1997). "Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation." *Tissue Antigens* 49(1): 7-15.
74. Ghia, P., Melchers, F. a Rolink, A. G. (2000). "Age-dependent changes in B lymphocyte development in man and mouse." *Exp Gerontol* 35(2): 159-165.
75. Gibbons, D. L. a Spencer, J. (2011). "Mouse and human intestinal immunity: same ballpark, different players; different rules, same score." *Mucosal Immunol* 4(2): 148-157.
76. Goyal, N., Rana, A., Ahlawat, A., Bijjem, K. R. a Kumar, P. (2014). "Animal models of inflammatory bowel disease: a review." *Inflammopharmacology* 22(4): 219-233.
77. Granato, Alessandra, Chen, Yuezhou a Wesemann, Duane R. (2015). "Primary immunoglobulin repertoire development: time and space matter." *Current opinion in immunology* 33: 126-131.
78. Gray, David a Gray, Mohini (2010). "What are regulatory B cells?" *European Journal of Immunology* 40(10): 2677-2679.

79. Griffin, Daniel O., Holodick, Nichol E. a Rothstein, Thomas L. (2011). "Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20(+)CD27(+)CD43(+)CD70(-)." *The Journal of Experimental Medicine* 208(1): 67-80.
80. Groot, K. (2007). "Nierenmanifestationen bei rheumatischen Erkrankungen." *Der Internist* 48(8): 779-785.
81. Gunderson, Andrew J., Kaneda, Megan M., Tsujikawa, Takahiro, Nguyen, Abraham V., Affara, Nesrine I., Ruffell, Brian, Gorjestani, Sara, Liudahl, Shannon M., Truitt, Morgan, Olson, Peter, Kim, Grace, Hanahan, Douglas, Tempero, Margaret A., Sheppard, Brett, Irving, Bryan, Chang, Betty Y., Varner, Judith A. a Coussens, Lisa M. (2016). "Bcr-1 Tyrosine Kinase-Dependent Immune Cell Cross-talk Drives Pancreas Cancer." *Cancer Discovery* 6(3): 270-285.
82. Hamblin, Terry J. (2003). "CD38: what is it there for?" *Blood* 102(6): 1939-1940.
83. Hammarström, L., Vorechovsky, I. a Webster, D. (2000). "Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID)." *Clinical and Experimental Immunology* 120(2): 225-231.
84. Han, B., Yuan, H., Wang, T., Li, B., Ma, L., Yu, S., Huang, T., Li, Y., Fang, D., Chen, X., Wang, Y., Qiu, S., Guo, Y., Fei, J., Ren, L., Pan-Hammarstrom, Q., Hammarstrom, L., Wang, J., Wang, J., Hou, Y., Pan, Q., Xu, X. a Zhao, Y. (2016). "Multiple IgH Isotypes Including IgD, Subclasses of IgM, and IgY Are Expressed in the Common Ancestors of Modern Birds." *J Immunol* 196(12): 5138-5147.
85. Hardy, R. R. (2006). "B-1 B cell development." *J Immunol* 177(5): 2749-2754.
86. Hardy, Richard R., Li, Yue-Sheng, Allman, David, Asano, Masanao, Gui, Ming a Hayakawa, Kyoko (2000). "B-cell commitment, development and selection." *Immunological Reviews* 175(1): 23-32.
87. Hashimoto, Yoshiko, Montecino-Rodriguez, Encarnacion, Leathers, Hyosuk, Stephan, Robert P. a Dorshkind, Kenneth (2002). "B-cell development in the thymus is limited by inhibitory signals from the thymic microenvironment." *Blood* 100(10): 3504-3511.
88. Herzenberg, L. A., Kantor, A. B. a Herzenberg, L. A. (1992). "Layered evolution in the immune system. A model for the ontogeny and development of multiple lymphocyte lineages." *Ann N Y Acad Sci* 651: 1-9.
89. Hlavsa, Jan, Man, Martin, Kala, Zdeněk, Procházka, Vladimír, Svatoň, Roman, Válek, Vlastimil, Vášová, Ingrid, Novotný, Ivo, Starý, Karel, Kiss, Igor a Prášek, Jiří (2008). "Nádory pankreatu." *Medicína pro praxi* 10(5): 388 - 392.
90. Hofmann, Janin, Greter, Melanie, Du Pasquier, Louis a Becher, Burkhard (2010). "B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution." *Trends in Immunology* 31(4): 144-153.
91. Holtmeier, W. a Kabelitz, D. (2005). "Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses." *Chem Immunol Allergy* 86: 151-183.
92. Honjo, T., Muramatsu, M. a Fagarasan, S. (2004). "AID: how does it aid antibody diversity?" *Immunity* 20(6): 659-668.
93. Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T. a Špišek, R. (2013). *Základy imunologie*, 5. vydání, Triton.
94. Hosomi, S., Oshitani, N., Kamata, N., Sogawa, M., Okazaki, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Maeda, K., Hirakawa, K. a Arakawa, T. (2011). "Increased numbers of immature plasma cells in peripheral blood specifically

- overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 in patients with ulcerative colitis." *Clinical and Experimental Immunology* 163(2): 215-224.
95. Hough, M. R., Rosten, P. M., Sexton, T. L., Kay, R. a Humphries, R. K. (1994). "Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci." *Genomics* 22(1): 154-161.
  96. Hrdá, P. a Šterzl, I. (2003). "Vyšetření autoprotilátek – současné možnosti." *Interní medicína pro praxi* 5(8): 410-413.
  97. Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. a Thomas, G. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* 411(6837): 599-603.
  98. Chan, A. T. a Giovannucci, E. L. (2010). "Primary Prevention of Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 138(6): 2029-2043.e2010.
  99. Chang WL, Gonzalez DF, Kieu HT, Castillo LD, Messaoudi I, Shen X, Tomaras GD, Shacklett BL, Barry PA, Sparger EE. (2017): Changes in Circulating B Cell Subsets Associated with Aging and Acute SIV Infection in Rhesus Macaques. *PLoS One*. Jan 17;12(1):e0170154
  100. Chen, K. a Cerutti, A. (2011). "The function and regulation of immunoglobulin D." *Curr Opin Immunol* 23(3): 345-352.
  101. Chung, James B., Silverman, Michael a Monroe, John G. (2003). "Transitional B cells: step by step towards immune competence." *Trends in Immunology* 24(6): 342-348.
  102. Janeway, C. (2001). *Immunobiology Five*, Garland Pub.
  103. Jelínek, R., Dostál, M., Likovský, Z., Halašková, M., Maňáková, E., Peterka, M., Peterková, R., Titlbach, M., Velický, J. a Zemanová, Z. (2002). *Histologie, embryologie, CBO - Oddělení histologie a embryologie, Centrum biomedicínských oborů 3*. LF UK.
  104. Jinno, Y., Ohtani, H., Nakamura, S., Oki, M., Maeda, K., Fukushima, K., Nagura, H., Oshitani, N., Matsumoto, T. a Arakawa, T. (2006). "Infiltration of CD19+ plasma cells with frequent labeling of Ki-67 in corticosteroid-resistant active ulcerative colitis." *Virchows Arch* 448(4): 412-421.
  105. Johansson, S. G. (2011). "The History of IgE: From discovery to 2010." *Curr Allergy Asthma Rep* 11(2): 173-177.
  106. Johansson, S. G. (2016). "The discovery of IgE." *J Allergy Clin Immunol* 137(6): 1671-1673.
  107. Kala, Zdeněk (2008). "Kolorektální karcinom." *Onkologické péče* 3: 3-10.
  108. Kaminski, Denise A., Wei, Chungwen, Qian, Yu, Rosenberg, Alexander F. a Sanz, Ignacio (2012). "Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling." *Frontiers in Immunology* 3: 302.
  109. Kantor, A. B. a Herzenberg, L. A. (1993). "Origin of Murine B Cell Lineages." *Annual Review of Immunology* 11(1): 501-538.
  110. Kapitonov, V. V. a Jurka, J. (2003). "Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6569-6574.
  111. Kapitonov, Vladimir V. a Koonin, Eugene V. (2015). "Evolution of the RAG1-RAG2 locus: both proteins came from the same transposon." *Biology Direct* 10: 20.
  112. Kasamatsu, Jun, Sutoh, Yoichi, Fugo, Kazunori, Otsuka, Noriyuki, Iwabuchi, Kazuya, Kasahara, Masanori a Cooper, Max D. (2010). "Identification of a third variable lymphocyte receptor in the lamprey." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(32): 14304-14308.

113. Kehry, M., Ewald, S., Douglas, R., Sibley, C., Raschke, W., Fambrough, D. a Hood, L. (1980). "The immunoglobulin mu chains of membrane-bound and secreted IgM molecules differ in their C-terminal segments." *Cell* 21(2): 393-406.
114. Kincade, P. W., Medina, K. L. a Smithson, G. (1994). "Sex hormones as negative regulators of lymphopoiesis." *Immunol Rev* 137: 119-134.
115. Klein, U. a Dalla-Favera, R. (2008). "Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy." *Nat Rev Immunol* 8(1): 22-33.
116. Klein, U., Rajewsky, K. a Kuppers, R. (1998). "Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells." *J Exp Med* 188(9): 1679-1689.
117. Klener, P. (2011). *Vnitřní lékařství, Galén a Univerzita Karlova. Praha*
118. Kneissl, S., Zhou, Q., Schwenkert, M., Cosset, F. L., Verhoeyen, E. a Buchholz, C. J. (2013). "CD19 and CD20 targeted vectors induce minimal activation of resting B lymphocytes." *PLoS One* 8(11): e79047.
119. Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B. a Busslinger, M. (1992). "The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP." *Mol Cell Biol* 12(6): 2662-2672.
120. Kreslavsky, Taras, Gleimer, Michael a von Boehmer, Harald (2010). "αβ versus γδ lineage choice at the first TCR-controlled checkpoint." *Current Opinion in Immunology* 22(2): 185-192.
121. Kuijpers, Taco W., Bende, Richard J., Baars, Paul A., Grummels, Annette, Derks, Ingrid A. M., Dolman, Koert M., Beaumont, Tim, Tedder, Thomas F., van Noesel, Carel J. M., Eldering, Eric a van Lier, René A. W. (2010). "CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses." *The Journal of Clinical Investigation* 120(1): 214-222.
122. Kurosaki, Tomohiro, Kometani, Kohei a Ise, Wataru (2015). "Memory B cells." *Nat Rev Immunol* 15(3): 149-159.
123. Kvell, K., Cooper, E. L., Engelmann, P., Bovari, J. a Nemeth, P. (2007). "Blurring borders: innate immunity with adaptive features." *Clin. Dev. Immunol.* 2007: 83671.
124. Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. a Dumortier, H. (2009). "CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases." *Ann N Y Acad Sci* 1173: 310-317.
125. Lanning, Dennis K., Rhee, Ki-Jong a Knight, Katherine L. (2005). "Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire." *Trends in Immunology* 26(8): 419-425.
126. LeBien, T. W. a Tedder, T. F. (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." *Blood* 112(5): 1570-1580.
127. LeBien, Tucker W. (2000). "Fates of human B-cell precursors." *Blood* 96(1): 9-23.
128. Leffler (2002). "Terapie nádorů slinivky břišní." *Lékařské listy* 20.
129. Leffler, Jan (2005). "Karcinom pankreatu 2005: Současný stav problematiky, diagnostiky a léčby." *Interní medicína pro praxi* 7-8.
130. Li, J., Barreda, D. R., Zhang, Y. A., Boshra, H., Gelman, A. E., Lapatra, S., Tort, L. a Sunyer, J. O. (2006). "B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities." *Nat Immunol* 7(10): 1116-1124.
131. Li, R., Dooley, H., Wang, T., Secombes, C. J. a Bird, S. (2012). "Characterisation and expression analysis of B-cell activating factor (BAFF) in spiny dogfish (*Squalus acanthias*):

- cartilaginous fish BAFF has a unique extra exon that may impact receptor binding." *Dev Comp Immunol* 36(4): 707-717.
132. Li, Z., Vermeire, S., Bullens, D., Ferrante, M., Van Steen, K., Noman, M., Bossuyt, X., Rutgeerts, P., Ceuppens, J. L. a Van Assche, G. (2015). "Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Restores Peripheral Blood B-cell Subsets and CD40 Expression in Inflammatory Bowel Diseases." *Inflamm Bowel Dis* 21(12): 2787-2796.
  133. LifeMap, Discovery (2016). Hematopoietic Bone Marrow. <http://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/blood/hematopoietic-bone-marrow>, Embryonic development and Stem cell compendium.
  134. Lin, Q., Gu, J. R., Li, T. W., Zhang, F. C., Lin, Z. M., Liao, Z. T., Wei, Q. J., Cao, S. Y. a Li, L. (2009). "Value of the peripheral blood B-cells subsets in patients with ankylosing spondylitis." *Chin Med J (Engl)* 122(15): 1784-1789.
  135. Litman, G. W., Cannon, J. P. a Dishaw, L. J. (2005). "Reconstructing immune phylogeny: new perspectives." *Nat Rev Immunol* 5(11): 866-879.
  136. Litzman, J., Vlková, M., Pikulová, Z., Štikarovská, D. a Lokaj, J. (2007). "T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency." *Clinical & Experimental Immunology* 147(2): 249-254.
  137. Liu, Zhanju, Colpaert, Stefaan, D'Haens, Geert R., Kasran, Ahmad, Boer, Mark de, Rutgeerts, Paul, Geboes, Karel a Ceuppens, Jan L. (1999). "Hyperexpression of CD40 Ligand (CD154) in Inflammatory Bowel Disease and Its Contribution to Pathogenic Cytokine Production." *The Journal of Immunology* 163(7): 4049-4057.
  138. Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. a Carsetti, R. (1999). "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals." *J Exp Med* 190(1): 75-89.
  139. Lories, R. J. (2006). "Animal models of spondyloarthritis." *Curr Opin Rheumatol* 18(4): 342-346.
  140. Messaoudi, I., Estep, R., Robinson, B. a Wong, S. W. (2011). "Nonhuman Primate Models of Human Immunology." *Antioxid Redox Signal* 14(2): 261-273.
  141. Lougaris, V., Badolato, R., Ferrari, S. a Plebani, A. (2005). "Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular, and immunological features." *Immunol Rev* 203: 48-66.
  142. Lukáš, Karel (2011). "Idiopatické střevní záněty--predikce průběhu a včasná léčba.
  143. Luning Prak, Eline T., Monestier, Marc a Eisenberg, Robert A. (2011). "B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1217: 96-121.
  144. Lykken, J. M., Candando, K. M. a Tedder, T. F. (2015). "Regulatory B10 cell development and function." *Int Immunol* 27(10): 471-477.
  145. Lykken, Jacquelyn M., DiLillo, David J., Weimer, Eric T., Roser-Page, Susanne, Heise, Mark T., Grayson, Jason M., Weitzmann, M. Neale a Tedder, Thomas F. (2014). "Acute and Chronic B Cell Depletion Disrupts CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Homeostasis and Expansion during Acute Viral Infection in Mice." *The Journal of Immunology* 193(2): 746-756.
  146. Manjarrez-Orduno, N., Quach, T. D. a Sanz, I. (2009). "B cells and immunological tolerance." *J Invest Dermatol* 129(2): 278-288.

147. Martin, Flavius a Kearney, John F. (2001). "B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets." *Current Opinion in Immunology* 13(2): 195-201.
148. Martin, Flavius a Kearney, John F. (2002). "Marginal-zone B cells." *Nat Rev Immunol* 2(5): 323-335.
149. Mashoof, Sara a Criscitiello, Michael (2016). "Fish Immunoglobulins." *Biology* 5(4): 45.
150. Matsumoto, A. K., Martin, D. R., Carter, R. H., Klickstein, L. B., Ahearn, J. M. a Fearon, D. T. (1993). "Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes." *J Exp Med* 178(4): 1407-1417.
151. Mayumi, M., Kuritani, T., Kubagawa, H. a Cooper, M. D. (1983). "IgG subclass expression by human B lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help." *J Immunol* 130(2): 671-677.
152. McIntosh, Alistair (2015) "B Cells: Regulatory (Bregs)." *Bite-Sized Immunology*, 2.
153. Medina, K. L. a Kincade, P. W. (1994). "Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(12): 5382-5386.
154. Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. a Rolink, A. (1993). "The surrogate light chain in B-cell development." *Immunol Today* 14(2): 60-68.
155. Melchers, Fritz (2015). "Checkpoints that control B cell development." *The Journal of Clinical Investigation* 125(6): 2203-2210.
156. Minges Wols, Heather A. (2001). *Plasma Cells. eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.
157. Mizoguchi, A. a Bhan, A. K. (2006). "A case for regulatory B cells." *J Immunol* 176(2): 705-710.
158. Molodecky, Natalie A., Soon, Ing Shian, Rabi, Doreen M., Ghali, William A., Ferris, Mollie, Chernoff, Greg, Benchimol, Eric I., Panaccione, Remo, Ghosh, Subrata, Barkema, Herman W. a Kaplan, Gilaad G. (2012). "Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review." *Gastroenterology* 142(1): 46-54.e42.
159. Montecino-Rodriguez, E. a Dorshkind, K. (2012). "B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult." *Immunity* 36(1): 13-21.
160. Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G. a Girschick, H. J. (2010). "Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood." *Clinical and Experimental Immunology* 162(2): 271-279.
161. Muller, W. E., Blumbach, B. a Muller, I. M. (1999). "Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates." *Transplantation* 68(9): 1215-1227.
162. Nakatsuji, T. (2003). "High levels of serum soluble CD27 correlated with renal dysfunction." *Clin Exp Med* 2(4): 192-196.
163. Naradikian, Martin S., Scholz, Jean L., Oropallo, Michael A. a Cancro, Michael P. (2014). *Understanding B Cell Biology. Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases*. X. Bosch, M. Ramos-Casals and A. M. Khamashta. Basel, Springer Basel: 11-35.
164. Neely, Harold R. a Flajnik, Martin F. (2016). "Emergence and Evolution of Secondary Lymphoid Organs." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32(1): 693-711.

165. Neil, G. A., Summers, R. W., Cheyne, B. A., Carpenter, C., Huang, W. L., Kansas, G. S. a Waldschmidt, T. J. (1992). "CD5+ B cells are decreased in peripheral blood of patients with Crohn's disease." *Dig Dis Sci* 37(9): 1390-1395.
166. Nelson, Brad H. (2010). "CD20+ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 185(9): 4977-4982.
167. Nescakova, Z. a Bystricky, S. (2011). "B cells - ontogenesis and immune memory development." *Gen Physiol Biophys* 30(1): 1-10.
168. Netea, M. G., Quintin, J. a van der Meer, J. W. (2011). "Trained immunity: a memory for innate host defense." *Cell Host Microbe* 9(5): 355-361.
169. Niu, X. Y., Zhang, H. Y., Liu, Y. J., Zhao, D., Shan, Y. X. a Jiang, Y. F. (2013). "Peripheral B-cell activation and exhaustion markers in patients with ankylosing spondylitis." *Life Sci* 93(18-19): 687-692.
170. Noli, C., Foster, A.P. a Rosenkrantz, W. (2013). *Veterinary Allergy*, Wiley.
171. Oracki, Sarah A., Walker, Jennifer A., Hibbs, Margaret L., Corcoran, Lynn M. a Tarlinton, David M. (2010). "Plasma cell development and survival." *Immunological Reviews* 237(1): 140-159.
172. Page, D. M., Wittamer, V., Bertrand, J. Y., Lewis, K. L., Pratt, D. N., Delgado, N., Schale, S. E., McGue, C., Jacobsen, B. H., Doty, A., Pao, Y., Yang, H., Chi, N. C., Magor, B. G. a Traver, D. (2013). "An evolutionarily conserved program of B-cell development and activation in zebrafish." *Blood* 122(8): e1-11.
173. Palanichamy, Arumugam, Barnard, Jennifer, Zheng, Bo, Owen, Teresa, Quach, Tam, Wei, Chungwen, Looney, R. John, Sanz, Iñaki a Anolik, Jennifer H. (2009). "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(10): 5982-5993.
174. Pancer, Z. a Cooper, M.D. (2006). "The evolution of adaptive immunity." *Annu. Rev. Immunol.* 24: 497.
175. Parra, D., Rieger, A. M., Li, J., Zhang, Y. A., Randall, L. M., Hunter, C. A., Barreda, D. R. a Sunyer, J. O. (2012). "Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells." *J Leukoc Biol* 91(4): 525-536.
176. Parra, D., Takizawa, F. a Sunyer, J. O. (2013). "Evolution of B cell immunity." *Annu Rev Anim Biosci* 1(1): 65-97.
177. Parrish, Yasmin Khan, Baez, Ineavely, Milford, Terry-Ann, Benitez, Abigail, Galloway, Nicholas, Rogerio, Jaqueline Willeman, Sahakian, Eva, Kagoda, Mercy, Huang, Grace, Hao, Qian-Lin, Sevilla, Yazmar, Barsky, Lora W., Zielinska, Ewa, Price, Mary A., Wall, Nathan R., Dovat, Sinisa a Payne, Kimberly J. (2009). "IL-7 Dependence in Human B Lymphopoiesis Increases During Progression of Ontogeny from Cord Blood to Bone Marrow." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(7): 4255-4266.
178. Paul, W.E. (2008). *Fundamental Immunology*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
179. Paulík, M. (2005). *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada.
180. Pavelka, K. a Rovenský, J. (2003). *Klinická revmatologie*, Galén.
181. Perera, Jason a Huang, Haochu (2015). "The development and function of thymic B cells." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72(14): 2657-2663.

182. Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Jr., Marti, G. E., Rawstron, A. C., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J., Johnsen, H. E., Klein, B. a Orfao, A. (2010). "Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic." *Cytometry B Clin Cytom* 78 Suppl 1: S47-60.
183. Pešková, Marie a Šváb, Jan (2003). "Karcinom pankreatu." *Lékařské listy* 20.
184. Pettinello, R. a Dooley, H. (2014). "The immunoglobulins of cold-blooded vertebrates." *Biomolecules* 4(4): 1045-1069.
185. Philpott, Dana J., Sorbara, Matthew T., Robertson, Susan J., Croitoru, Kenneth a Girardin, Stephen E. (2014). "NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease." *Nat Rev Immunol* 14(1): 9-23.
186. Pieper, Kathrin, Grimbacher, Bodo a Eibel, Hermann (2013). "B-cell biology and development." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4): 959-971.
187. Pilarski, Linda M., Baigorri, Eva, Mant, Michael J., Pilarski, Patrick M., Adamson, Penelope, Zola, Heddy a Belch, Andrew R. (2008). "Multiple Myeloma Includes Phenotypically Defined Subsets of Clonotypic CD20+ B Cells that Persist During Treatment with Rituximab." *Clinical Medicine. Oncology* 2: 275-287.
188. Pillai, S. a Cariappa, A. (2009). "The bone marrow perisinusoidal niche for recirculating B cells and the positive selection of bone marrow-derived B lymphocytes." *Immunol Cell Biol* 87(1): 16-19.
189. Pillai, Shiv a Cariappa, Annaiah (2009). "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." *Nat Rev Immunol* 9(11): 767-777.
190. Podolsky, Daniel K. (2002). "Inflammatory Bowel Disease." *New England Journal of Medicine* 347(6): 417-429.
191. Prodinger, W. M. (1999). "Complement receptor type two (CR2,CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping." *Immunol Res* 20(3): 187-194.
192. Pulvertaft, R. J. V. (1964). "CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA)." *The Lancet* 283(7327): 238-240.
193. Pylayeva-Gupta, Yuliya, Das, Shipra, Handler, Jesse S., Hajdu, Cristina H., Coffre, Maryaline, Koralov, Sergei B. a Bar-Sagi, Dafna (2016). "IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia." *Cancer Discovery* 6(3): 247-255.
194. Rawstron, A. C. (2011). "Occult B-cell lymphoproliferative disorders." *Histopathology* 58(1): 81-89.
195. Rawstron, Andy C. (2001). *Immunophenotyping of Plasma Cells. Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc.
196. Ribatti, D., Crivellato, E. a Vacca, A. (2006). "The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage." *Clinical & Experimental Immunology* 145(1): 1-4.
197. Robert, J. a Ohta, Y. (2009). "Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*." *Dev Dyn* 238(6): 1249-1270.
198. Rombout, J. H. W. M., Huttenhuis, H. B. T., Picchiatti, S. a Scapigliati, G. (2005). "Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes." *Fish & Shellfish Immunology* 19(5): 441-455.

199. Rossi, M. I., Yokota, T., Medina, K. L., Garrett, K. P., Comp, P. C., Schipul, A. H., Jr. a Kincade, P. W. (2003). "B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes." *Blood* 101(2): 576-584.
200. Roth, B. (2015). *Modern Concepts of Flow Cytometry*, Callisto Reference.
201. Round, June L. a Mazmanian, Sarkis K. (2009). "The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease." *Nature reviews. Immunology* 9(5): 313-323.
202. Rowe, David S. a Fahey, John L. (1965). "A NEW CLASS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS : I. A UNIQUE MYELOMA PROTEIN." *The Journal of Experimental Medicine* 121(1): 171-184.
203. Rowe, David S. a Fahey, John L. (1965). "A NEW CLASS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS : II. NORMAL SERUM IGD." *The Journal of Experimental Medicine* 121(1): 185-199.
204. Rumfelt, L. L., McKinney, E. C., Taylor, E. a Flajnik, M. F. (2002). "The Development of Primary and Secondary Lymphoid Tissues in the Nurse Shark *Ginglymostoma cirratum*: B-Cell Zones Precede Dendritic Cell Immigration and T-Cell Zone Formation During Ontogeny of the Spleen." *Scandinavian Journal of Immunology* 56(2): 130-148.
205. Sahraneshin Samani, Fazel, Moore, Jodene K., Khosravani, Pardis a Ebrahimi, Marzieh (2014). "Features of free software packages in flow cytometry: a comparison between four non-commercial software sources." *Cytotechnology* 66(4): 555-559.
206. Salinas, I., Zhang, Y. A. a Sunyer, J. O. (2011). "Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish." *Dev Comp Immunol* 35(12): 1346-1365.
207. Sanchez, S., Tafforeau, P. a Ahlberg, P. E. (2014). "The humerus of *Eusthenopteron*: a puzzling organization presaging the establishment of tetrapod limb bone marrow." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1782).
208. Sanz, I., Wei, C., Lee, F. E. a Anolik, J. (2008). "Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells." *Semin Immunol* 20(1): 67-82.
209. Sarrias, M. R., Franchini, S., Canziani, G., Argyropoulos, E., Moore, W. T., Sahu, A. a Lambris, J. D. (2001). "Kinetic analysis of the interactions of complement receptor 2 (CR2, CD21) with its ligands C3d, iC3b, and the EBV glycoprotein gp350/220." *J Immunol* 167(3): 1490-1499.
210. Scott, David L., Wolfe, Frederick a Huizinga, Tom W. J. (2010). "Rheumatoid arthritis." *The Lancet* 376(9746): 1094-1108.
211. Sellam, J., Rouanet, S., Hendel-Chavez, H., Abbed, K., Sibilila, J., Tebib, J., Le Loet, X., Combe, B., Dougados, M., Mariette, X. a Taoufik, Y. (2011). "Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 63(12): 3692-3701.
212. Shapiro, H.M. (2005). *Practical Flow Cytometry*, Wiley.
213. Shi, Yuhui, Agematsu, Kazunaga, Ochs, Hans D. a Sugane, Kazuo (2003). "Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM." *Clinical Immunology* 108(2): 128-137.
214. Shimabukuro-Vornhagen, A., Schlosser, H. A., Gryschock, L., Malcher, J., Wennhold, K., Garcia-Marquez, M., Herbold, T., Neuhaus, L. S., Becker, H. J., Fiedler, A., Scherwitz, P., Koslowsky, T., Hake, R., Stippel, D. L., Holscher, A. H., Eidt, S., Hallek, M., Theurich, S. a von Bergwelt-Baildon, M. S. (2014). "Characterization of tumor-associated B-cell subsets in patients with colorectal cancer." *Oncotarget* 5(13): 4651-4664.

215. Schneiderman, R. D., Hanly, W. C. a Knight, K. L. (1989). "Expression of 12 rabbit IgA C alpha genes as chimeric rabbit-mouse IgA antibodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(19): 7561-7565.
216. Silverman, G. J. a Carson, D. A. (2003). "Roles of B cells in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 5(Suppl 4): S1-6.
217. Singh, Karmtej, Chang, Christopher a Gershwin, M. Eric (2014). "IgA deficiency and autoimmunity." *Autoimmunity Reviews* 13(2): 163-177.
218. Slavik, J. M., Hutchcroft, J. E. a Bierer, B. E. (1999). "CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function." *Immunol Res* 19(1): 1-24.
219. Smith, Lauren E., Crouch, Kathryn, Cao, Wei, Müller, Mischa R., Wu, Leeyng, Steven, John, Lee, Michael, Liang, Musen, Flajnik, Martin F., Shih, Heather H., Barelle, Caroline J., Paulsen, Janet, Gill, Davinder S. a Dooley, Helen (2012). "Characterization of the immunoglobulin repertoire of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*)." *Developmental & Comparative Immunology* 36(4): 665-679.
220. Smith, S.L., Sim, R.B. a Flajnik, M.F. (2014). *Immunobiology of the Shark*, CRC Press.
221. Smithson, G, Beamer, W G, Shultz, K L, Christianson, S W, Shultz, L D a Kincade, P W (1994). "Increased B lymphopoiesis in genetically sex steroid-deficient hypogonadal (hpg) mice." *The Journal of Experimental Medicine* 180(2): 717-720.
222. Snoeck, Veerle, Peters, Iain R. a Cox, Eric (2006). "The IgA system: a comparison of structure and function in different species." *Vet. Res.* 37(3): 455-467.
223. Spits, Hergen a Cupedo, Tom (2012). "Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function." *Annual Review of Immunology* 30(1): 647-675.
224. Suchá, Renata (2016). Změny v distribuci subpopulací B lymfocytů u pacientů s Crohnovou chorobou před a po biologické léčbě. magisterská diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze.
225. Sunyer, J. Oriol (2012). "Evolutionary and Functional Relationships of B Cells from Fish and Mammals: Insights into their Novel Roles in Phagocytosis and Presentation of Particulate Antigen." *Infectious disorders drug targets* 12(3): 200-212.
226. Suponitskaia, E. V., Aleksankin, A. P., Aleksandrova, E. N., Avdeeva, A. S., Panafidina, T. A., Verijnikova, J. G. a Nasonov, E. L. (2015). "[THE IDENTIFICATION OF SUB-POPULATIONS OF B-LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD USING TECHNIQUE OF FLOW CYTOFLUOROMETRY IN HEALTHY INDIVIDUALS AND PATIENTS WITH RHEUMATOID DISEASES]." *Klin Lab Diagn* 60(6): 30-33.
227. Suzuki, T., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Sekino, T., Katagiri, Y. U. a Fujimoto, J. (2001). "CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system." *J Immunol* 166(9): 5567-5577.
228. Szekanecz, Z., Soos, L., Szabo, Z., Fekete, A., Kapitany, A., Vegvari, A., Sipka, S., Szucs, G., Szanto, S. a Lakos, G. (2008). "Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets?" *Clin Rev Allergy Immunol* 34(1): 26-31.
229. Tarlinton, David (2006). "B-cell memory: are subsets necessary?" *Nat Rev Immunol* 6(10): 785-790.
230. Tedder, Thomas F. (2015). "B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset." *The Journal of Immunology* 194(4): 1395-1401.

231. Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., Hauser, A., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Grun, J. R., Grutzkau, A., Engels, N., Wienands, J., Yanagisawa, Y., Ohnishi, K. a Melchers, F. (2014). "Environments of B cell development." *Immunol Lett* 157(1-2): 60-63.
232. Tung, J. W., Mrazek, M. D., Yang, Y., Herzenberg, L. A. a Herzenberg, L. A. (2006). "Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6293-6298.
233. Udroi, Ion (2007). "Evolution of sinusal and non-sinusal spleens of Mammals." 2007 17(2).
234. Uribe, C, Folch, H, Enriquez, R a Moran, G (2011). "Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review." *Veterinarni Medicina* 56(10): 486-503.
235. Vacek, Z. (2006). Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka, Grada.
236. van der Linden, Sjef a van der Heijde, Désirée (1998). "ANKYLOSING SPONDYLITIS: Clinical Features." *Rheumatic Disease Clinics of North America* 24(4): 663-676.
237. van Montfrans, J. M., Hoepelman, A. I., Otto, S., van Gijn, M., van de Corput, L., de Weger, R. A., Monaco-Shawver, L., Banerjee, P. P., Sanders, E. A., Jol-van der Zijde, C. M., Betts, M. R., Orange, J. S., Bloem, A. C. a Tesselaar, K. (2012). "CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia." *J Allergy Clin Immunol* 129(3): 787-793.e786.
238. van Zelm, M. C., Reisli, I., van der Burg, M., Castano, D., van Noesel, C. J., van Tol, M. J., Woellner, C., Grimbacher, B., Patino, P. J., van Dongen, J. J. a Franco, J. L. (2006). "An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene." *N Engl J Med* 354(18): 1901-1912.
239. Veneri, D., Ortolani, R., Franchini, M., Tridente, G., Pizzolo, G. a Vella, A. (2009). "Expression of CD27 and CD23 on peripheral blood B lymphocytes in humans of different ages." *Blood Transfus* 7(1): 29-34.
240. Vitale, Laura A., He, Li-Zhen, Thomas, Lawrence J., Widger, Jennifer, Weidlick, Jeffrey, Crocker, Andrea, O'Neill, Thomas, Storey, James, Glennie, Martin J., Grote, Deanna M., Ansell, Stephen M., Marsh, Henry a Keler, Tibor (2012). "Development of a Human Monoclonal Antibody for Potential Therapy of CD27-Expressing Lymphoma and Leukemia." *Clinical Cancer Research* 18(14): 3812-3821.
241. Vladutiu, Adrian O. (2000). "Immunoglobulin D: Properties, Measurement, and Clinical Relevance." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7(2): 131-140.
242. Vlkova, M., Fronkova, E., Kanderova, V., Janda, A., Ruzickova, S., Litzman, J., Sediva, A. a Kalina, T. (2010). "Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cells marked by CD24 expression." *J Immunol* 185(11): 6431-6438.
243. Vobecký, J. a Záhlava, V. (2005). *Elektronika: Součástky a obvody, principy a příklady*, Grada.
244. Walker, Jennifer A., Barlow, Jillian L. a McKenzie, Andrew N. J. (2013). "Innate lymphoid cells [mdash] how did we miss them?" *Nat Rev Immunol* 13(2): 75-87.
245. Walker, Jennifer A., Barlow, Jillian L. a McKenzie, Andrew N. J. (2013). "Innate lymphoid cells [mdash] how did we miss them?" *Nat Rev Immunol* 13(2): 75-87.
246. Wang, C.Y., Good, R.A., Ammirati, P., Dymbort, G. a Evans, R.L. (1980). "Identification of a p69,71 complex expressed on human T cells sharing determinants with B-type chronic lymphatic leukemic cells." *The Journal of Experimental Medicine* 151(6): 1539-1544.

247. Wang, Shuo, Xia, Pengyan, Chen, Yi, Huang, Guanling, Xiong, Zhen, Liu, Jing, Li, Chong, Ye, Buqing, Du, Ying a Fan, Zusen (2016). "Natural Killer-like B Cells Prime Innate Lymphocytes against Microbial Infection." *Immunity* 45(1): 131-144.
248. Wang, X., Jiang, Y., Zhu, Y., Zhang, M., Li, M., Wang, H. a Gao, P. (2016). "Circulating memory B cells and plasmablasts are associated with the levels of serum immunoglobulin in patients with ulcerative colitis." *J Cell Mol Med* 20(5): 804-814.
249. Warnatz, K., Denz, A., Drager, R., Braun, M., Groth, C., Wolff-Vorbeck, G., Eibel, H., Schlesier, M. a Peter, H. H. (2002). "Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)*IgM*(-)*IgD*(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease." *Blood* 99(5): 1544-1551.
250. Watson, A. J. M. a Collins, P. D. (2011). "Colon Cancer: A Civilization Disorder." *Digestive Diseases* 29(2): 222-228.
251. Wei, C., Jenks, S. a Sanz, I. (2015). "Polychromatic flow cytometry in evaluating rheumatic disease patients." *Arthritis Res Ther* 17: 46.
252. Weill, Jean-Claude, Weller, Sandra a Reynaud, Claude-Agnès (2004). "A bird's eye view on human B cells." *Seminars in Immunology* 16(4): 277-281.
253. Weis, J. J., Fearon, D. T., Klickstein, L. B., Wong, W. W., Richards, S. A., de Bruyn Kops, A., Smith, J. A. a Weis, J. H. (1986). "Identification of a partial cDNA clone for the C3d/Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes: homology with the receptor for fragments C3b and C4b of the third and fourth components of complement." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(15): 5639-5643.
254. Wesemann, Duane R., Shrestha, Akritee, Magee, Jennifer, Chen, Yuezhou, Silver, Jared a Granato, Alessandra (2014). "Role of Microbes in B-Cell Lymphopoiesis and Early Ig Repertoire Development." *Blood* 124(21): SCI-47-SCI-47.
255. Wilhelmson, Anna S., Stubelius, Alexandra, Börjesson, Anna E., Wu, Jianyao, Stern, Anna, Malin, Stephen, Mårtensson, Inga-Lill, Ohlsson, Claes, Carlsten, Hans a Tivesten, Åsa (2015). "Androgens Regulate Bone Marrow B Lymphopoiesis in Male Mice by Targeting Osteoblast-Lineage Cells." *Endocrinology* 156(4): 1228-1236.
256. Wood, J. C. a Hoffman, R. A. (1998). "Evaluating fluorescence sensitivity on flow cytometers: an overview." *Cytometry* 33(2): 256-259.
257. Woof, J. M. a Kerr, M. A. (2004). "IgA function – variations on a theme." *Immunology* 113(2): 175-177.
258. Xu, F., Li, D., Zhang, Q., Fu, Z., Yuan, W., Pang, D. a Li, D. (2012). "Association of CD27 and CD70 gene polymorphisms with risk of sporadic breast cancer in Chinese women in Heilongjiang Province." *Breast Cancer Res Treat* 133(3): 1105-1113.
259. Yacyshyn, B. R. a Pilarski, L. M. (1993). "Expression of CD45RO on circulating CD19+ B-cells in Crohn's disease." *Gut* 34(12): 1698-1704.
260. Yang, Min, Rui, Ke, Wang, Shengjun a Lu, Liwei (2013). "Regulatory B cells in autoimmune diseases." *Cell Mol Immunol* 10(2): 122-132.
261. Yarchoan, R, Barrow, L A, Kurman, C, Strober, W a Nelson, D L (1985). "Human peripheral blood mononuclear cells produce IgA anti-influenza virus antibody in a secondary in vitro antibody response." *The Journal of Immunology* 135(2): 1033-1039.
262. Yoshimoto, Momoko, Montecino-Rodriguez, Encarnacion, Ferkowicz, Michael J., Porayette, Prashanth, Shelley, W. Christopher, Conway, Simon J., Dorshkind, Kenneth a Yoder, Mervin C. (2011). "Embryonic day 9 yolk sac and intra-embryonic hemogenic endothelium

independently generate a B-1 and marginal zone progenitor lacking B-2 potential." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(4): 1468-1473.

263. Zhang, Yong-An, Salinas, Irene, Li, Jun, Parra, David, Bjork, Sarah, Xu, Zhen, LaPatra, Scott E., Bartholomew, Jerri a Sunyer, J. Oriol (2010). "IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity." *Nature immunology* 11(9): 827-835.
264. Zhou, L. J., Ord, D. C., Hughes, A. L. a Tedder, T. F. (1991). "Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain." *J Immunol* 147(4): 1424-1432.
265. Zhu, Q., Zhang, M., Shi, M., Liu, Y., Zhao, Q., Wang, W., Zhang, G., Yang, L., Zhi, J., Zhang, L., Hu, G., Chen, P., Yang, Y., Dai, W., Liu, T., He, Y., Feng, G. a Zhao, G. (2016). "Human B cells have an active phagocytic capability and undergo immune activation upon phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*." *Immunobiology* 221(4): 558-567.
266. Zouali, Moncef a Richard, Yolande (2011). "Marginal Zone B-Cells, a Gatekeeper of Innate Immunity." *Frontiers in Immunology* 2: 63. Ballantyne, Coco (2008). "Allergy genes flew the coop, according to evolutionary analysis." *Nat Med* 14(8): 797-797.