

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Pavla Valatová

**Imunotypové rozdíly v subpopulacích CD27+
B lymfocytů u zdravých kontrol a pacientů
s imunopatologiemi**

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

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Šárky Růžičkové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V České Kamenici, dne 15. 8. 2016

Pavla Valatová

Poděkování

V této části bych chtěla poděkovat celému našemu týmu za skvělou práci, kterou odvedli, dále bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce RNDr. Šárce Růžičkové, Ph.D. za pomoc a cenné rady, které mi poskytla při řešení této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Martinovi Kolářovi za pomoc při statistickém vyhodnocení dat diplomové práce.

Diplomová práce byla zpracována v roce 2014-2016 v laboratoři na katedře antropologie a genetiky člověka. Tímto bych také chtěla poděkovat paní RNDr. Pavlíně Daňkové, Ph.D. za poskytnutí laboratoře pro zpracování této práce.

V neposlední řadě bych poděkovala své rodině za pochopení a veškerou pomoc, kterou mi poskytli při zpracovávání této práce.

ABSTRAKT

Imunitní systém udržuje integritu organismu, rozpoznává škodlivé od neškodlivého a chrání tak organismus před exo- i endogenními škodlivinami a spolu s nervovým a endokrinním systémem patří mezi nejdůležitější regulační systémy organismu.

V současné době přibývají důkazy, že se různé subpopulace B lymfocytů, přímo či nepřímo uplatňují v patogenezi mnoha chorob. Avšak dosud máme jen velmi omezené poznatky o tom, jak jsou jednotlivá diferenciací stádia B lymfocytů zapojena do patologických procesů a jak samotný průběh nemoci nebo samotné léčby ovlivňuje B buněčnou homeostázu.

Tato práce je zaměřena na studium periferních CD27⁺ B lymfocytů (jedné z nejméně prozkoumaných lidských B lymfocytů) u zdravých kontrol a pacientů s různými imunopatologiemi, v tomto případě jsou prezentovány reprezentativní výsledky pacientů s idiopatickými střevními záněty. Pomocí polychromatické průtokové cytometrie jsme vyšetřili z toho 14 kontrol, 7 pacientů s Crohnovou chorobou (CD) a 5 s ulcerózní kolitidou (UC). U 6 pacientů s CD jsme měli možnost námi studované imunofenotypy stanovit také 2 hodiny po intravenózní aplikaci Infliximabu a u jednoho po 14 dnech od podání léku.

Paměťové B lymfocyty charakterizované jako CD19⁺CD27⁺, CD19⁺CD20⁺CD27⁺ a CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ byly u pacientů s CD přítomné vždy ve zvýšených frekvencích oproti kontrolám (20,6±13,58%; 17,61±13,48%; 88,60±20,56% vs. 11,75±26,47%; 11,25±26,50%; 66,82±22,60% respektive), což odpovídá aktivnímu neléčenému stadiu choroby.

Avšak ostatní analyzované CD27⁺ B buněčné subpopulace CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺, CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD24⁺CD21⁺, a CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁻ byly v periferní krvi deprivovány ve srovnání s kontrolami.

Navíc, v CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁻ případě tato redukce její frekvence oproti kontrolám byla dokonce statisticky významná (11,10± 20,62 pro CD vs. 39,40±25,05 pro KO; p=0,0234). Pacienti s UC vždy vykazovaly odlišný imunofenotyp, což by podporovalo

obecně přijímaný fakt, že ulcerativní kolitida i z hlediska klinických parametrů představuje zcela odlišnou jednotku.

Tato práce byla vlastně pilotní studií, která svým zaměřením měla naznačit možné trendy a další směr výzkumu.

Pochopení jednotlivých aspektů chování těchto B lymfocytárních subpopulací může v budoucnu poskytnout vhodné markery dovolující zhodnotit průběh a prognózu daného onemocnění, případně posloužit jako vhodný diagnostický marker pro některé choroby.

Klíčová slova: Imunitní systém, B lymfocyty, protilátky, CD molekuly, imunopatologie, průtoková cytometrie.

ABSTRACT

The immune system will maintain the integrity of the organism from harmful non-malicious recognizes and protects the body against exo- and endogenous toxic substances and together with the nervous and endocrine system are among regulatory systems of the organism.

Recently the evidence has supported the emerging concept of different B cell subpopulations to play a direct or indirect role in a pathogenesis of spectrum of disorders. However, so far the knowledge has been limited mainly in the way of how the specific differentiation stages of B lymphocytes are involved in pathogenesis of diseases and how course of disease, stage, and eventually different treatment can affect B cell homeostasis.

This work is focused on the study of peripheral CD27⁺ B lymphocytes (one of the least explored human B lymphocytes) in healthy controls and patients with various immunopathologies, in this case we present representative results for patients with inflammatory bowel disease. Using polychromatic flow cytometry we examined 31 of peripheral blood samples, including 14 controls, 7 patients with Crohn's disease (CD) and 5 with ulcerative colitis (UC). In 6 patients with CD, we were able to perform immunophenotyping also 2 hours after intravenous administration of infliximab, and in one patient 14 days after drug administration.

Memory B lymphocytes characterized as CD19⁺CD27⁺, CD19⁺CD20⁺CD27⁺ and CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ were in patients with CD present always in increased frequencies as compared to controls (20.6 ± 13.58 , 17.61 ± 13.48 ; 88.60 ± 20.56 vs. 11.75 ± 26.47 11.25 ± 26.50 , 66.82 ± 22.60 , respectively), which well corresponds to the active untreated stadium of the disease.

However, other analyzed CD27⁺ B cell subpopulations, CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺, CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD24⁻CD21⁺ and CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁻IgD⁻ were in peripheral blood of patients with CD deprivated as compared with controls. Interestingly, in the case of CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁻ B lymphocytes this reduction in comparison to controls was even statistically significant (11.10 ± 20.62 vs. CD 39.40 ± 25.05 KO, $p = 0.0234$). Patients with UC displayed different immunophenotypes in comparison to CD, which might support

generally assumed consensus that ulcerative colitis based on clinical features represents independent and distinct clinical unit.

Current work was drafted as a pilot study, which should indicate trends and possible future direction of research. Understanding the different aspects of the behavior of the B lymphocyte subpopulations in the future may provide useful markers allowing to evaluate the course and prognosis of the disease, or serve as a useful diagnostic marker for certain diseases.

Keywords: Immune system, B lymphocytes, antibodies , CD molecules , immunopathology, flow cytometry.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	11
1. ÚVOD	14
2. CÍLE PRÁCE	16
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	18
3.1 IMUNITA A IMUNITNÍ MECHANIZMY	18
3.1.1 PŘIROZENÁ (NESPECIFICKÁ) IMUNITA	19
3.1.2 SPECIFICKÁ (ADAPTIVNÍ) IMUNITA	20
3.2 B LYMFOCTY	23
3.2.1 VÝVOJ B LYMFOCYTŮ	23
3.2.2 CENTRÁLNÍ VÝVOJ	24
3.2.2.1 V(D)J REKOMBINACE IMUNOGLOBULINŮ	25
3.2.2.2 PRE-B LYMFOCYTY	27
3.2.3 PERIFERNÍ VÝVOJ	27
3.2.3.1 TRANZIENTNÍ B LYMFOCYTY	28
3.2.3.2 FOLIKULÁRNÍ B LYMFOCYTY	30
3.2.3.3 B LYMFOCYTY MARGINÁLNÍ ZÓNY	31
3.2.3.4 GERMINÁLNÍ CENTRA	32
3.2.3.5 SOMATICKÁ HYPERMUTACE	33
3.2.3.6 IZOTYPOVÝ PŘESMYK	34
3.2.3.7 PAMĚŤOVÉ B LYMFOCYTY	35
3.2.3.8 PLAZMATICKÉ BUŇKY	36
3.2.4 B LYMFOCYTY VYSKYTUJÍCÍ SE V PERIFERNÍ KRVÍ	37
3.2.4.1 ROZDĚLENÍ B LYMFOCYTŮ PODLE EXPRESE CD27	37
3.3 REGULACE VÝVOJE B LYMFOCYTŮ	38
3.3.1 VÝVOJ B LYMFOCYTŮ POMOCÍ TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ	39
3.3.2 ANTIGENNĚ SPECIFICKÉ RECEPTORY	43
3.3.2.1 IMUNOGLOBULINY	43
3.3.2.2 STRUKTURA IMUNOGLOBULINŮ	44
3.3.2.3 RECEPTOR B LYMFOCYTŮ (BCR)	45
3.3.3 POVRCHOVÉ B BUNĚČNÉ MARKERY	46
3.3.3.1 CD19	46
3.3.3.2 CD20	47

3.3.3.3 CD21	47
3.3.3.4 CD24	48
3.3.3.5 CD27	48
3.3.3.6 CD38	50
3.3.3.7 IgM	51
3.3.3.8 OSTATNÍ TRÍDY IMUNOGLOBULINŮ	52
3.4 VYBRANÉ PATOLOGICKÉ STAVY	52
3.4.1 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ	52
3.4.2 ANKYLOZUJÍCÍ SPONDYLITIDA	53
3.4.3 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA	54
3.4.4 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	55
3.4.5 IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY	57
3.4.5.1 CROHNOVA NEMOC	58
3.4.5.2 ULCERÓZNÍ KOLITIDA	59
3.4.6. APLASTICKÁ ANEMIE	60
3.5 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	61
3.5.1 FLUIDIKA	62
3.5.2 OPTIKA	63
3.5.3 ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU	64
3.5.4 ANALÝZA A GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ	64
4. METODY A MATERIÁLY	66
4.1 ZPRACOVÁNÍ PERIFERNÍ KRVE	66
4.1.1 PŘÍPRAVA BUMĚČNÉ SUSPENZE	66
4.1.2 TEST VIABILITY A URČENÍ MNOŽSTVÍ BUNĚK	68
4.1.3 ZNAČENÍ BUNĚK PRO MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU	69
4.2 MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU	70
4.3 VYHODNOCENÍ DAT NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU	70
4.3.1 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT	71
4.3.2 SLEDOVÁNÍ B BUNĚČNÉ SUBPOPULACE A GATA STRATEGIE	71
4.4 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	72
4.4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	72
4.4.2 POUŽITÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	73
4.4.3 SEZNAM ROZTOKŮ A JEJICH PŘÍPRAVA	73
4.4.4 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ	74
4.4.5 SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU	74
5. VÝSLEDKY	75

6. DISKUSE	88
7. ZÁVĚR	92
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93

SEZNAM ZKRATEK

AA	aplastická anemie
ACPA	autoprotilátky proti citrulinovaným peptidům
AID	aktivací indukovaná deamináza (activation-induced deaminase)
AML	akutní myeloidní leukemie
APC	antigen prezentující buňky (antigen presenting cell)
AS	ankylozující spondylitida
BAFF	B buněčný aktivační faktor (B cell activating factor)
BCR	B buněčný receptor (B cell receptor)
BER	base excision repair
bp	párů bází (base of pair)
C3	C3 komponent fragment (C3 fragment of complement)
C3d	C3d komplementový fragment (C3d fragment of complement)
C3dg	C3dg komplementový fragment (C3dg fragment of complement)
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CLP	společný lymfoidní progenitor (common lymphoid progenitor)
CRC	kolorektální karcinom
CRP	C-reaktivní protein (C-reactive protein)
CSR	izotypový přesmyk (class switching recombination)
DC	dendritické buňky (dendritic cell)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ELP	časný lymfoidní progenitor (early lymphoid progenitor)
FasApo-1	transmembránový protein typu I (CD95, APO-1)
FM	folikulární maturovaný B lymfocyt (follicle mature B lymphocyte)
FMO	kontrola fluorescence minus one (fluorescence minus one)
FSC	kanál sbírající rozptýlené světlo v předním směru (forward scatter channel)
FW	sedimentace erytrocytů dle Fahraeuse a Westegreena (Fahraeus Westegreen)
GC	germinální centra (germinal center)
GC	karcinom žaludku
HC	těžký řetězec imunoglobulinu (heavy chain)
HLA	lidský lymfocytární antigen (human leukocyte antigen)

HSC	hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell)
iC3b	inaktivní fragment C3b (inactive fragment of C3b)
IF κ B	inhibitor faktoru kappa B (inhibitor of factor kappa B)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin (interleukin)
J	genový segment učující J řetězec (joining)
kDa	kilodalton (kilodalton)
KO	kontrola
LC	lehký řetězec imunoglobulinu (light chain of immunoglobulin)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major
MPP	multipotentní progenitorová buňka (multipotent progenitor cell)
MZ	B lymfocyty marginální zóny (marginal zone B lymphocyte)
NF κ B	nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NGFR	nervový růstový faktor(nerve growth factor receptor)
NHEJ	nehomologní spojování konců (non-homologous end joining)
NMBC	nepaměťové B lymfocyty (non memory B cell)
OX40	patří do TNF rodiny, známý jako CD134
p53	gen kódující tumor supresorový protein p53 (tumor supressor gene p53)
PAD	peptidyl argininová deamináza (peptidil arginin deaminase)
PAMP	patogen asociované molekul. vzory (pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	periferní mononukleární buňky (peripheral mononuclear cell)
PC	karcinom slinivky břišní
PK	proteinové kinázy (protein kinase)
pre-B	prekurzorový B lymfocyt (prekursor B cell)
pre-BCR	prekurzorový B buněčný receptor (precursor B cell receptor)
pro-B	progenitorový B lymfocyt (progenitor-B cell)
PRR	receptory rozpoznávající molekulární vzory (pattern recognition receptor)
RA	revmatoidní artritida
RAG1, 2	rekombinaci aktivující gen 1, 2 (recombination-activating gene 1, 2)
RF	revmatoidní faktor (revmatoid factor)
RSS	rekombinační signální sekvence (recombination signal sekvence)
SIVA1	apoptózu indukující factor (apoptosis inducing factor)

SHM	somatická hypermutace (somatic hypermutation)
SNP	jedno nukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphisms)
SSC	kanál sbírající bočně rozptýlené světlo (90° úhel) (side scatter channel)
STK1	kináza kmenových buněk 1 (stem cell kinase 1)
T1, T2 a T3	tranzitorní 1, 2, 3 B-lymfocyty (transistory 1, 2, ,3 B-cell)
TF	transkripční faktor (transcription factor)
TGF- β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
Th	pomocný T lymfocyt (T helper cell)
TLR	Toll like receptor (Toll like receptor)
TNFR	receptor pro tumory nekrotizující faktor (tumor necrosis factor receptor)
TNF- α	tumory nekrotyzující faktor alfa (tumor necrosis factor alfa)
TRAF2	TNF receptor-asociovanýfaktor 2 (TNF receptor-associated factor 2)
TRAF3	TNF receptor-asociovanýfaktor 3 (TNF receptor-associated factor 3)
V	genový segment určující variabilní oblast (variable)
VCAM-1	cévní adhezivní molekula 1 (vascular cell adhesive molecule 1)
WBC	bílé krvinky (white blood cell)
WSB	promývací a barvicí pufr (wash and stain buffer)
β 2M β 2-	mikroglobulin (β 2-mikroglobulin)

1. ÚVOD

Imunitní systém, je spolu s nervovým a endokrinním systémem, je důležitou regulační složkou organismu, která zajišťuje nejen jeho celistvost, ale také udržování vnitřního prostředí (homeostázu) (Bartůňková *et al.*, 2011). B lymfocyty jako producenti protilátek, patří mezi buňky imunitního systému, které hrají důležitou roli v specifické imunitní odpovědi. Vývoj B lymfocytů je vysoce regulovaný proces, který vede nejen k proliferaci a diferenciaci B buněk, ale také k jejich selekci. B lymfocyty exprimují na svém povrchu různé membránově vázané molekuly jako jsou signální komplexy, receptory a CD molekuly, jejichž exprese je charakteristická pro určitá diferenciační stádia, která lze právě pomocí těchto molekul detekovat a definovat.

Autoimunitní onemocnění jsou příčinou nejen komplexních patologických pochodů, ale také spolupůsobením zevních činitelů. Bohužel, i přes vysoké zdravotnické, vědecké, technické i životní standardy, se poruchy ve funkcích imunitního systému objevují stále častěji. A přesto stále existuje jen velmi málo poznatků o mechanismech autoimunitní onemocnění, o jednotlivých stádiích B lymfocytů, které se do patologických procesů zapojují.

Tato diplomová práce si klade za cíl přispět k poznatkům o B buněčných subpopulacích, o jejich vývojových stádiích jak u pacientů s imunopatologiemi, tak u zdravých kontrol. Za tímto účelem jsme využili metodu polychromatické průtokové cytometrie, kde hlavním předmětem našeho zájmu byly dosud málo studované populace B lymfocytů, které na svém povrchu exprimují molekulu CD27, tj.:

paměťové/memory (CD19⁺CD20⁺CD27⁺) a

plazmatické buňky (CD19⁺CD20⁻CD27^{high})

a u těchto populací byla sledována koexprese znaků **CD21, CD24 a CD38** také **IgD, IgM, IgG a IgA**.

Tato práce navazuje na předchozí studie týmu zabývající se touto problematikou, přičemž CD27⁺ B lymfocyty u lidí takto detailně dosud nebyly sledovány.

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce je zjistit,

- 1) variabilitu v distribuci frekvencí subpopulací CD27⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s vybranými patologiemi
- 2) imunotypové rozdíly v subpopulacích CD27⁺ B lymfocytů u zdravých kontrol a pacientů s imunopatologiemi.
- 3) zda existují subpopulace typické nebo specifické pro určitou formu nebo typ nemoci,

Dílčí cíle této práce jsou:

- Vytvoření database zahrnující cytometrická data a klinická data od každého studovaného subjektu a její udržování.
- Navržení dalšího postupu zpracování dat ve smyslu:

a) jednoduchého grafického znázornění takového imunofenotypu, které bude jednoduše prezentovatelné lékařům v klinické praxi a použitelné jako diagnosticko-predikční marker.

b) vytvoření schémat na bázi tzv. “heat” mapy, pomocí nichž bude možné seskupit jedince s podobnými imunofenotypy do skupin a s podobnými distribucemi jednotlivých B buněčných stádií (podobně jako u expresních profilů na cDNA čípech).

Na základě dosavadních poznatků lze B lymfocyty periferní krve na základě přítomnosti nebo absence povrchových CD znaků charakterizovat jako různé subpopulace buněk, s různými funkcemi a s různým podílem nebo dopadem na patogenezi mnoha různých chorob.

Existuje však málo poznatků o tom, která konkrétní diferenciacní stádia B lymfocytů jsou do patologických procesů zapojena. Situace je u **CD27⁺ paměťových B lymfocytů** navíc komplikována tím, že u myši není takto vůbec definována a myší paměťové buňky nejsou přítomností této molekuly vůbec charakteristické.

Důležitým zlomem byl v tomto ohledu právě vývoj citlivých průtokových cytometrů a stabilnějších typů fluorochromů, které spolu s rozšířenou kolekcí monoklonálních protilátek specifických pro další CD molekuly umožnil pomocí polychromatické průtokové cytometrie detekovat další minoritní B buněčná stádia jako např. transientní B lymfocyty atd. a tím prohloubit poznatky v oblasti B buněčné biologie a fyziologie. Periferní B lymfocyty jako takové jsou velmi heterogenní buněčnou populací složenou z málo četných nebo velmi řídkých subpopulací (s frekvencí 1% až 1‰) a jejich role za různých (pato)fyziologických stavů vůbec nejsou známe. Proto jsme se rozhodli za použití 8/11 barevné průtokové cytometrie a využití maturačně-aktivačních znaků detailněji prozkoumat periferní CD27+ B buněčnou populaci.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 IMUNITA A IMUNITNÍ MECHANIZMY

Imunita je schopnost organismu bránit se proti antigenům. Tyto antigeny mohou pocházet jak z vnějšího, tak z vnitřního prostředí. Imunitní odpověď se vyznačuje nejen člověk, ale do jisté míry i ostatní živočichové či rostliny, ale u živočichů je nejrozvinutější a řídí ji tzv. imunitní systém, který spolu s nervovým a endokrinním systémem patří mezi regulační systémy. Na imunitní systém působí, často negativně, nejrůznější civilizační vlivy: od životního stylu (složení stravy, stres atd.) až po nejrůznější formy znečištění prostředí (chemické látky, radioaktivní, rentgenové záření atd.). Kromě zvýšeného výskytu alergií, ekzému a rakoviny může být takovým oslabením zvýšeno i riziko mnoha dalších onemocnění (*Mourek et al., 2012*).

Hlavním úkolem imunitního systému je obrana organismu proti antigenům, patogenům, nebezpečným cizorodým látkám či pozměněným buňkám vlastního těla, jako jsou nádorové buňky (*Mal et al., 2006*). Tyto imunitní procesy jsou zajišťovány orgány, buňkami a molekulami imunitního systému, které mezi sebou kooperují a jsou pro život člověka nepostradatelné (*Janeway.,2005*). Tyto interakce mohou probíhat dvěma způsoby: 1. kontaktem mezi dvěma buňkami, kde dochází k vzájemnému přenosu informací během interakce membránových molekul anebo 2. produkcí a sekrecí signálních molekul tzv. cytokinů (z řeckého *cyto* (buňka) a *kinos* (pohyb)). Cytokiny jsou proteiny, glykoproteiny nebo případně peptidy, které ovlivňují buněčný růst, pohyb, chování, diferenciaci a v neposlední řadě také přežívání buněk. Jejich hlavní funkce spočívá v tom, že jsou schopné se navázat na specifické buněčné receptory a indukují tak změny v genových expresích a signálních drahách v cílové buňce. V mnoha ohledech tak cytokiny nám mohou připomínat hormony. (*Stříž et al., 2015*).

Absence imunitní odpovědi nebo její defekty činí organismus zranitelnějším. V širším slova smyslu, každý orgán má nějakou ochrannou funkci, ale musíme si uvědomit, že pro správnou funkci imunitního systému je zapotřebí celkově zdravého organismu, především endokrinní aparát a gastrointestinální trakt (GIT). V užším slova smyslu, pak zde máme

orgány, jejichž hlavní úloha spočívá jak ve vytváření, tak posilování obranyschopnosti organismu (např. lymfatické orgány a brzlík) (Mourek et al., 2012).

Funkce imunitního systému je zajišťována vzájemnou provázaností mechanismů imunity **přirozené (nespecifické)** a **adaptivní (specifické)** (obr.1). Do nespecifické imunity patří polymorfonukleární leukocyty, makrofágy, monocyty a také dendritické buňky, proteiny akutní fáze a další nejrůznější součásti plazmy (tab.1). Adaptivní (specifická) imunita zahrnuje lymfocyty T i B, které se dále diferencují do plazmatických buněk a tak jsou schopny produkovat protilátky (Bartůňková et al., 2011).

Tab. 1 Struktura imunitního systému (Bartůňková et al., 2011).

Přirozená imunita (nespecifická, vrozená)	buněčná	fagocyty
		makrofágy
		NK-buňky
	humorální	komplement
		interferony (IFN)
Specifická imunita	buněčná	T-lymfocyty
(získaná, adaptivní)	humorální	B-lymfocyty → protilátky

Všechny složky imunity se navzájem ovlivňují a hlavně spolu kooperují buď jako přímé interakce molekul v membránách, nebo prostřednictvím secernovaných molekul, kam patří:

- **cytokiny – proteinové molekuly**
- **deriváty kyseliny arachidonové, prostaglandiny, leukotrieny, tromboxany**
- **NO**

3.1.1 PŘIROZENÁ (NESPECIFICKÁ) IMUNITA

Tento typ imunity je evolučně starší a vyskytuje se v nejrůznějších formách v celé živočišné říši. Jedná se o imunitu vrozenou, neadaptivní a její mechanismy mohou být v případě infekce použity ihned. Patří sem různé mechanické zábrany (pokožka, řasinky v nose), zvyšování tělesné teploty (pyrogeny), imunita sliznic (hlen, přítomnost

symbiotických bakterií), přítomnost baktericidních látek v některých tělních tekutinách (slzy, sliny, žaludeční šťávy) a aktivace komplementu (skupina proteinů z krevního séra) (Murphy et al., 2007). Vlastním nástrojem nespecifické imunity je především fagocytóza (pohlcování cizorodých částic) a funkce přirozených zabíječů (NK-natural killer cells). Nespecifická imunita zahrnuje buňky a molekuly, které rozeznávají určité funkční a molekulární struktury tzv. PAMP (pathogen associated molecular patterns) mikroorganismů pomocí různých povrchových receptorů tzv. PPR (pathogen pattern receptors) (Male et al., 2006).

Základní rysy nespecifické imunity jsou:

- Není specifická- buňky, které se podílejí na této imunitě zasahují stejným způsobem proti jakékoli cizorodé částici.
- Je vrozená- tyto imunitní mechanismy má organismus od narození, bez ohledu na to, zda se s příslušnými antigeny již setkal nebo ne.
- Bez imunologické paměti- i po opakovaném kontaktu s konkrétním antigenem zasahuje nespecifická imunita vždy stejnou silou a rychlostí.

3.1.2 SPECIFICKÁ (ADAPTIVNÍ) IMUNITA

Je evolučně vyspělejším typem imunity, která nefunguje samostatně, ale vždy spolupracuje s přirozenou imunitou. Specifická imunita se fyziologicky rozvíjí až po narození. V genomu jedince jsou obsaženy pouze její základy a v průběhu vývoje dochází ke změnám genomu jednotlivých buněk, ty se pak odráží na fenotypu (Hořejší et al., 2013).

K jejím základním znakům patří:

- Je specifická – každá buňka specifické imunity je geneticky naprogramována k rozpoznání jediného typu antigenu.
- Není vrozená-je získána až během života, zpravidla až po setkání s příslušným antigenem.
- Má imunologickou paměť-po odeznění akutního stádia infekce, většina efektorových buněk umírá, ale menší část je zachována a diferencuje se v paměťové buňky (Hořejší et al., 2013).

Tato část imunitního systému je zajišťována lymfocyty, které dělíme na dvě skupiny, B lymfocyty a T lymfocyty. Lymfocyty se na specifické imunitní reakci podílejí různě: B lymfocyty zajišťují tzv. **humorální imunitu**, která spočívá v tom, že se lymfocyty transformují v plazmatické buňky, které vypouští specifické protilátky. Tyto protilátky kolují v krvi a lymfě. T lymfocyty se naopak přeměňují v cytotoxické T-buňky, které se vážou přímo cizorodé buňky v těle a následně je likvidují. Této imunitě se říká **buněčná**. Pro tyto mechanismy je charakteristické, že se spouštějí až po setkání s daným antigenem a pro jejich iniciaci je nezbytná aktivita složek neadaptivní, vrozené imunitní odpovědi. Pro úplný rozvoj specifické (adaptivní) imunitní reakce je zapotřebí několika dnů až týdnů.

Humorální složku imunity je zajišťován B lymfocyty. B lymfocyty přeměněné na plazmatické buňky začnou produkovat specifické protilátky. Protilátky jsou bílkovinné molekuly a na likvidaci antigenu se podílí různými způsoby:

- Aktivace komplementu: cílem je likvidace cizorodé látky (dojde ke spuštění kaskády enzymů, které mají za úkol rozklad buněk).
- Neutralizací: pouhé navázání protilátky na antigen znemožní jeho patogenní působení v organismu.
- Oponizací: jedná se o proces urychlující fagocytózu cizorodých látek. Toto vlastnost mají některé IgG protilátky (Ferenčík et al., 2005).

Rozeznáváme 5 tříd protilátek (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE). Protilátky jsou nenahraditelným diagnostickým nástrojem v mnoha medicínských oborech. Jedná se o využití reakce antigen-protilátka. Někdy se hledají jen protilátky, což znamená, že se osoba setkala v minulosti s daným antigenem, který vyvolal specifickou protilátkovou odpověď. Jde o důkaz nepřímý, který neprokáže přítomnost mikroorganismu v těle.

Buněčná složka

Buněčná imunita je zajištěna pomocí T lymfocytů. Přibližně polovina lymfocytů v průběhu vývoje migruje do thymu a zde dozrává (od toho název T lymfocyty). Na rozdíl od B lymfocytů, které působí na antigeny protilátkami, potřebují T lymfocyty ke své imunitní funkci přímý kontakt s infikovanou nebo jinak poškozenou buňkou. Rozeznáváme tyto typy T lymfocytů:

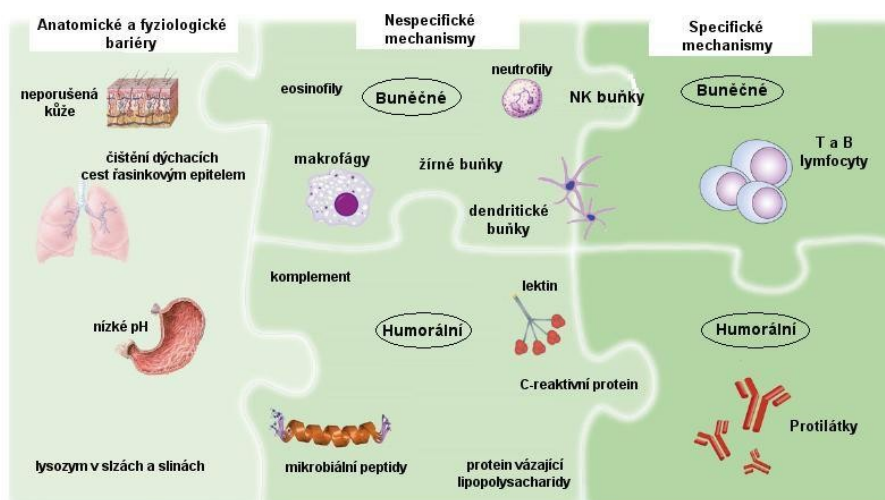
- Pomocné (Th): $CD4^+$, produkují mnohé cytokiny. Reagují na antigeny předkládané na APCs v souvislosti s HLA II. třídy. Zahajují specifickou imunitní odpověď. Podle cytokinů které produkují, rozlišujeme:

T1: podporují cytotoxickou a buněčnou část imunity (makrofágy, T_{Cyt-Ly}).

T2: podporují protilátkovou odpověď (B-lymfocyty, tvorba protilátek).

- Cytotoxické (Tc): místo $CD4$ mají receptor $CD8^+$ a jsou schopné donutit buňku k apoptóze nebo ji přímo zničí za pomoci cytotoxických mechanismů. Reagují na HLA I. třídy. Kontrolují stav buněk v organismu (protinádorová imunita).
- Supresorové (Tsup): nejednotná skupina T-lymfocytů, v průběhu zánětu se pravděpodobně vyvíjejí z helper T-lymfocytů, proto jsou někdy označovány jako $T_H3(r)$ subset. Nemají typický CD znak, některé jsou $CD-4^+$ a $CD-8^+$, jiné nesou jen jeden, nebo ani jeden z těchto znaků. Jejich hlavním úkolem je moderovat průběh imunitní reakce a k tomu používají interleukiny IL-10 a částečně i IL-4. Reparaci tkáně a stimulaci fibroblastů pak urychlují pomocí $TGF-\beta$ (transformační růstový faktor).

Fyziologická imunitní odpověď je vždy výsledkem souhry nespecifických a antigenně specifických mechanismů (obr. 1). Aktivita nespecifických mechanismů je velmi důležitá pro iniciaci a následné adaptivní specifické odpovědi. Proti některým antigenům se uplatňuje více nespecifická imunita, proti jiným zase specifická imunita, ať už buněčná, nebo humorální (Hořejší et al., 2013).



Obrázek 1. Imunitní mechanismy (Turvey a Broide., 2010).

3.2 B LYMFOCYTY

B lymfocyty jsou základními buňkami specifické humorální imunity a své jméno získaly podle označení lymfoidního orgánu *burza Fabriciova*, který se nachází v dorzální části u ptáků a kde vlastně byl i vývoj B buněk poprvé zaznamenán a prokázán (*Cooper et al., 1965*). Hlavní funkce B lymfocytů je spojována s produkcí protilátek (imunoglobulinů), které jsou zaměřeny proti mikroorganismům nebo jejich toxinům působících v tělních tekutinách či dutinách, ale také mohou prezentovat antigen nebo vykonávat imunoregulační funkce. Molekula Ig je glykoprotein, který je tvořen dvěma těžkými a dvěma lehkými polypeptidovými řetězci, kde těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky a ke každému z nich je cysteinovým můstkem připojen jeden lehký řetězec (*Hašek et al., 1988*).

Víme, že hlavní funkcí B lymfocytů je tvorba protilátek, ale B lymfocyty se mohou uplatňovat v imunitních reakcích i jinými způsoby. Například jako složka adaptivní imunity mají rovněž velký význam pro imunitní paměť, čehož se mj. využívá i při očkování. Dále zde můžeme uvést schopnost B lymfocytů existovat jako buňky prezentující antigen a nebo dále produkovat imunoregulační molekuly a řadu cytokinů (*Hamze et al., 2013*).

Vedle kladné role, kterou hrají B lymfocyty v imunitních reakcích, je třeba zmínit i jejich negativní roli, jako je negativní regulace funkce imunitního systému. Populace regulačních B lymfocytů mají schopnost inhibovat zánětlivé reakce, transplantační i autoimunitní reakce (*Mauri et al., 2012*). Jako mechanismus inhibičního působení této populace B buněk je tvorba inhibičního cytokinu IL-10 a podle toho se B lymfocyty označují jako B10 lymfocyty a jsou dále ovlivňovány dalšími cytokiny (*Stríž et al., 2015*).

3.2.1 VÝVOJ B LYMFOCYTŮ

Vývoj B lymfocytů je vysoce regulovaný proces zahrnující kroky vedoucí k proliferaci, diferenciaci a selekci B buněk. Fenotypové změny, které probíhají během vývoje B buněk, jsou regulovány pomocí různých transkripčních faktorů např. Elk-1. Vývoj lze rozdělit na dvě vývojová stádia, na centrální (primární) a periferní (sekundární). Centrální (primární) období vývoje je zcela nezávislé na přítomnosti antigenu (*Li et al., 1993*) Schopnost reagovat s antigenem získávají B lymfocyty po složitých přestavbách segmentů. 1 z genů

VK je spojen s 1 z genů JK a dochází k deleci DNA, která je uložena mezi vybranými geny. Takto přestavěné geny jsou transkribovány do mRNA včetně sekvencí mezi kombinací VK – JK a segmentem CK. Pro periferní (sekundární) období a je charakteristické, že se naivní B lymfocyty musí setkat s antigenem. Jednotlivá vývojová stádia od multipotentního lymfoidního progenitoru až po zralý B lymfocyt lze blíže definovat na základě povrchových markerů a exprese specifického uspořádání imunoglobulinových genů (*Seshi et al., 2000*).

3.2.2 CENTRÁLNÍ VÝVOJ

Prekurzory B lymfocytů jsou během fetálního vývoje detekovány ve fetálních játrech a později se tento vývoj během ontogeneze nachází v kostní dřeni, kde také probíhá hlavní vývoj B lymfocytů. K optimálnímu vývoji B lymfocytů (ale i ostatních buněk) jsou důležité stromální buňky kostní dřene, které expresí adhezivních (např. VCAM-1) a rozpustných molekul (např. IL-7) vytváří vhodné mikroprostředí (*Murphy et al., 2007*). B lymfocyty se vyvíjejí ze společné hematopoetické kmenové buňky (HSC-hematopoietic stem cell), jako T lymfocyty, makrofágy, krevní destičky a granulocyty. Tato hematopoetická kmenová buňka, dává vzniknout všem krvetvorným buňkám a dále diferencuje do multipotentní progenitorové buňky (MPPs-multipotent progenitor cells). Tato multipotentní progenitorové buňka dává vzniknout myeloidní a lymfoidní vývojové linii. Na svém povrchu nese kinázu kmenových buněk (STK1, stem cell kinase 1) vázající se na ligand stromálních buňkách. Tato signalizace vede k diferenciaci do dalšího vývojového stádia označovaného jako společný lymfoidní progenitor (CLP, z anglického common lymphoid progenitor). Dále následují časná vývojová stádia B lymfocytů: pro-B lymfocyt, pre-B lymfocyt a nezralý B lymfocyt (*Murphy et al., 2007*).

B lymfocyty jsou schopny reagovat proti širokému spektru antigenů. Využívají k tomu vysoce diverzifikované receptorové molekuly, buď ve formě rozpustných imunoglobulinů nebo membránově vázaného imunoglobulinu, označovaného jako B-buněčný receptor (BCR, B-cell receptor).

V průběhu vývoje B lymfocytů dochází k přestavbě genů pro imunoglobuliny, nejdříve k DJ rekombinaci a poté k vytváření VDJ segmentu V (variable), D (diversity) a J (joining) a který vede ke vzniku širokého spektra těžkých a lehkých imunoglobulinových řetězců.

Zpočátku buňky vytvářejí IgM, který může být zajištěn nejdříve v cytoplasmě a teprve později jako povrchový imunoglobulin. Tyto pre B buňky, které mají IgM v cytoplasmě, ale zatím jim chybí na svém povrchu, mohou být detekovány u lidských plodů už kolem 5.-7. týdne gestace. Pre-B lymfocyty již v 10. (někdy až 12.) týdnu prenatalního vývoje plodu exprimují povrchový IgM receptor a během následujícího týdne též receptor IgD. Fetální imunitní systém má jen omezenou schopnost protilátkové odpovědi na cizorodé antigeny. Během desátého týdne se tvoří IgM a IgD imunoglobuliny (*van Furth et al., 1965*). Nárůst sérového IgG je detekovatelný během 5. až 20. Týdne a potom se postupně jeho hladina snižuje. Jedná se o IgG maternálního původu, který prochází placentou do krevního oběhu dítěte (*Eichhorn et al., 1987*). Ve fetálních játrech dochází k syntéze IgE od 11. týdne a ve slezině až od 21. týdne (*Weil et al., 1983*).

Jakmile má B buňka na svém povrchu exprimovaný IgM, stává se reaktivní na antigen. Po úspěšně prošlém vývoji, opouští B lymfocyt kostí dřev a s následným setkáním s antigenem, se vyvíjí v plazmatickou buňku, která je schopna produkovat specifické protilátky a v konečné fázi sekrece protilátek je B lymfocytu umožněn vývoj do stádia paměťové B buňky.

3.2.2.1 V(D)J REKOMBINACE IMUNOGLOBULINŮ

Receptor B lymfocytů (imunoglobulin), se skládá ze dvou těžkých (IgH) a dvou lehkých (IgL) řetězců, které jsou vzájemně propojené pomocí cysteinových můstků. Na molekule můžeme rozlišit dvě oblasti: variabilní, která specificky váže vlastní antigen na principu zámku a klíče, a oblast konstantní (*Hořejší et al., 2013*). Oba řetězce jsou kódovány genovými komplexy, které leží na různých chromozomech: IgH pro těžký řetězec na lidském chromozomu 14, Ig κ a Ig λ pro lehký řetězec na chromozomech 2 a 22. Geny kódující těžké a lehké řetězce imunoglobulinů se skládají z několika segmentů odpovídajících příslušným oblastem molekuly receptoru: V (variable), D (diversity), která u lehkých řetězců chybí, J (joining) a C (constant). Segment C těžkého řetězce nám určuje izotyp imunoglobulinu – IgG, IgA, IgM, IgD, IgE a nemá vliv na strukturu vazebného místa pro antigen (*Togenawa et al., 1983*).

V(D)J rekombinace probíhá již od časných vývojových stádií B lymfocytů, a to již od stádia pro-B lymfocytu (*Scoot et al., 2010*). Takzvaná V(D)J rekombinace (přeskupení, či rearrangement) odpovídá změnám na somatické úrovni, kdy zůstává pouze jeden V

segment, D segment a J segment (k vystřížení mezi V(D)J dochází na úrovni DNA, úsek mezi J a C je vystřížen na úrovni mRNA).

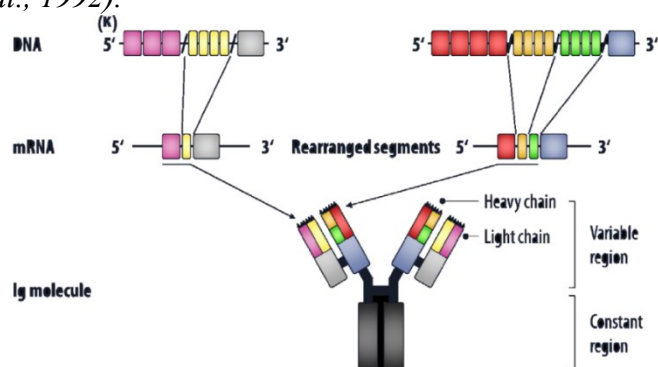
Přeskupení se dá popsat jako rekombinační proces, kdy fyziologicky dochází k nehomologním zlomům dsDNA (*Lieber et al., 2006*). Proces je zahájen na úrovni těžkého řetězce přeskupením **DH-JH** genů, kdy dochází k náhodnému spojení jednoho z 23 DH a jednoho 21 z 6 JH segmentů. Při rekombinaci dochází k expresi rekombinázy RAG (recombination-activating genes), která je složená z komplexu proteinů RAG1 a RAG2, indukujících dvouřetězcové zlomy v místech, kde dojde k rozpoznání tzv. rekombinační signální sekvence (RSS, recombination signal sequence), která je lokalizována mezi jednotlivými genovými segmenty (Schatz et al, 1989). Z DNA vlákna se vytvoří smyčka, která se spojuje v kruhový útvar, a genové segmenty ležící na ní jsou z chromozomu nenávratně vyštěpeny. Na podobném principu jako přeskupení mezi D-J genovými segmenty je založeno přeskupení V-D genových segmentů. D-J přeskupení probíhá současně na obou chromozomech, dokud nevznikne funkční VDJ produkt, který může být transkripcí převeden do mRNA kódující kompletní těžký řetězec imunoglobulinu. Jakmile vznikne na jednom chromozomu funkční VDJ produkt, je na druhém chromozomu přeskupování jednotlivých genových segmentů zastaveno díky alelické exkluzi. Ta zabraňuje vzniku dvou těžkých imunoglobulinových řetězců. Následně dochází k sestříhu, který odstraní z mRNA pro těžký řetězec imunoglobulinu introny. Z důvodu umístění C μ segmentu v blízkosti V(D)J segmentu nejdříve vznikají těžké řetězce μ , které po spárování s vhodným lehkým řetězcem dávají vzniknout IgM. B lymfocyty, které prošly úspěšným procesem přeskupení genů pro těžký řetězec se nazývají pre-B-lymfocyty (*Hořejší et al., 2013*).

Podobnou cestou, jako je rekombinace u těžkého řetězce, dochází k rekombinaci i u lehkých řetězců, jde pouze o VJ rekombinaci (nejsou zde diverzifikační úseky). Imunoglobulin má buď oba lehké řetězce kappa (genový komplex na 2q) nebo oba lambda řetězce (genový komplex na 22q). Není možné, aby měl imunoglobulin jeden kappa a druhý lambda řetězec.

3.2.2.2 PRE-B LYMFOCYTY

Pre-B (prekursorový lymfocyt) je stádium ve vývoji B buněčné linie, kdy pre-B buňka na svém povrchu exprimuje IgM molekulu, ale ještě nemá přeskupené geny lehkého řetězce (Ehlich *et al.*, 1993). Z tohoto důvodu má pre-B buňka na svém povrchu tzv. pre-B receptor (pre-BCR). Pre-BCR je proteinový komplex sestávající ze třech proteinů: těžkého řetězce μ (μ HC, μ heavy chain), náhradního lehkého řetězce ψ (ψ LC, ψ light chain) a signálního heterodimeru $I\gamma\alpha/I\gamma\beta$ (CD79 α a CD79 β) (Lassoued *et al.*, 1993; Benchop a Cambier, 1999). Tento náhradní řetězec je homologní ke λ a κ lehkému řetězci, ale je typický jenom pro toto vývojové stádium (Nishimoto *et al.*, 1991).

Pomocí tohoto signalizačního komplexu pre-BCR, buňka přijímá signály k zahájení přeskupení genů lehkého řetězce a další pre-B buněčnou maturaci tím, že dochází k opětovné reaktivaci genů pro RAG-1/RAG-2, a následné iniciaci přestavby lehkého řetězce (Kitamura *et al.*, 1992).

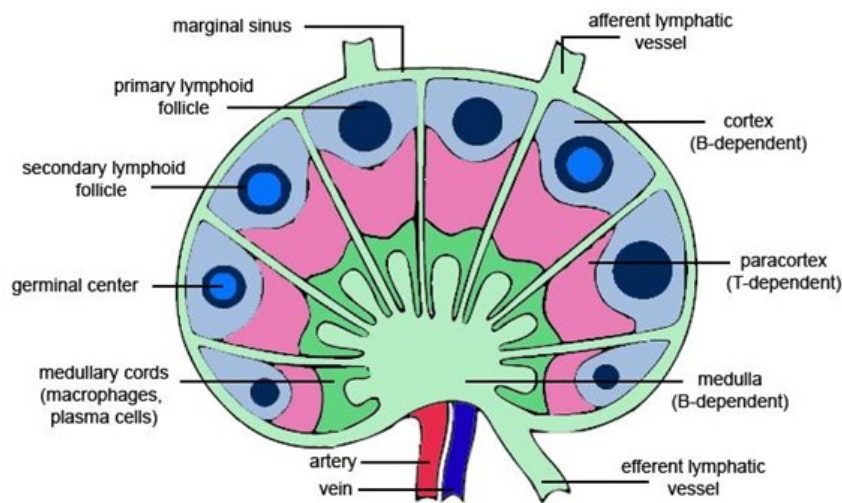


Obrázek 2. Znáznornění procesu V(D)J rekombinace během centrálního vývoje (Růžičková, 2014 – nepublikovaná data).

3.2.3 PERIFERNÍ VÝVOJ

Nezralý B lymfocyt putuje z kostní dřeně jako transientní buňka do sekundárních lymfatických orgánů (do sleziny nebo lymfatických uzlin), kde podstupuje procesy vedoucí k diverzifikaci jejich efektorových funkcí jako je (somatická hypermutace, izotypový přesmyk). Z tranzientních B lymfocytů následně v sekundárních orgánech vznikají fenotypově i funkčně odlišné folikulární (FM) nebo B lymfocyty marginální zóny (MZ) (Carsetti *et al.*, 2004). V uzlinách a podobně ve slezině dochází k anatomicky optimálně

organizovanému styku T a B lymfocytů s různými druhy APC, k aktivaci, proliferaci, diferenciaci a konečnému vzniku efektorových lymfocytů. Obrázek 3 ukazuje průřez lymfatickou uzlinou.



Obrázek 3. Průřez lymfatickou uzlinou (Hořejší et al., 2013).

3.2.3.1 TRANZIENTNÍ B LYMFOCYTY

Transientní B lymfocyty jsou nezralé B lymfocyty, reprezentující rozhodující vývojovou fázi v selekci, diferenciaci a dozrávání B buněčného kompartmentu. Tyto buňky představují prvotní vývojovou fázi vyžívání B lymfocytů, kterou můžeme sledovat v periferní krvi. Jedná se o buňky, které z kostní dřeně odcházejí do sleziny, ve které dochází k postupnému vyžívání do naivních folikulárních B lymfocytů a B lymfocytů marginální zóny. Na základě tranzitu (migrace) dostaly svoje označení (*Allman et al., 1992*). Počet transientních buněk můžeme zjistit podle exprese znaků $CD24^{++}CD38^{++}$ na naivních $IgM^{+}CD27^{-}$ B lymfocytech. Zastoupení transientních B lymfocytů se mění s věkem. Nejvyšší počet nacházíme v pupečníkové krvi a se stoupajícím věkem dítěte pak postupně klesá (*Carsetti et al., 1995*).

Podle funkce a fenotypu lze buňky rozdělit do dvou hlavních populací: T1, T2 a alternativní populace T3 (*Allman et al., 2001*).

$T1(CD21^{low}CD23^{low}CD24^{high}IgM^{high}IgD^{low})$ buňky putují krevním řečištěm do sleziny do periarteriální lymfoidní oblasti.

Během vstupu do sleziny zůstávají T1 B lymfocyty v jejím vnějším periarteriolárním lymfoidním plášti, kde jsou autoantigeny z krve koncentrovány a uplatňují se v procesech další negativní selekce. T1 B lymfocyty, které projdou touto selekcí úspěšně, vstupují do primárního folikulu a stávají se z nich T2 B lymfocyty. T1 diferencují do stádia T2, které jsou charakterizovány jako (CD21^{low}CD24^{high}IgM^{high}IgD^{high}) a sídlí ve folikulech sleziny (Loder et al., 1999). T2 stádium je ve vývoji B buněk důležité, protože aktivace T2 buňky přes BCR signalizaci vede k diferenciaci do dalšího vývojového stádia zralé folikulární B buňky. Pokud dojde ke stimulaci T2 buňky lipopolysacharidovými antigeny přes TLR2 (Toll-like receptor) nebo TLR4, vyvine se z T2 zralá B buňka marginální zóny (Su et al., 2002).

Pro veškeré B lymfocyty, které se vyskytují ve slezině, je důležitá signalizace prostřednictvím BCR, jinak během krátké době hynou. Signalizace přes BCR aktivuje anti-apoptotické geny (Bcl-6, Bfl1/A1) a Akt signální kaskádu, vedoucí k zesílení signálů přežití a k proliferaci u T2 B-lymfocytů (zde dochází i k diferenciaci) a lymfocytů marginální zóny (Su et al., 2002). Naopak v případě T1 B lymfocytů nedochází k aktivaci žádných anti-apoptotických signálů a signálů k diferenciaci, které aktivací pomocí BCR buňky hynou apoptózou (Lam et al., 1997).

Signály spuštěné vazbou antigenu na BCR mohou být výrazně zesíleny spoluprací BCR s jinými povrchovými receptory B lymfocytů, komplementovým receptorem CR2 (CD21), který váže degradační produkt C3dg. Propojení BCR a CR2 antigenními částicemi ozonizovanými fragmenty C3dg zřejmě lépe aktivuje kinázy spojené s oběma receptory (Hořejší et al., 2013).

T3 (CD23⁺IgM^{low}) buňky se liší od ostatních transienčních buněk nižší expresí IgM molekuly. Z populace T3 buněk nevznikají zralé B lymfocyty a ani nereagují na stimulaci přes BCR (Allman et al., 2001). T3 buňky byly nalezeny v periferní krvi a lymfatických uzlinách. Tato populace není normálním vývojovým stádiem B buněk a je podobná autoreaktivním buňkám ve stavu anergie (Merrell et al., 2006). T3 buňky tedy mohou hrát důležitou roli ve vzniku poruchy imunity u některých autoimunitních onemocnění (Teague et al., 2007).

3.2.3.2 FOLIKULÁRNÍ B LYMFOCYTY

Jako folikulární B lymfocyty (FO) označujeme zralé naivní B lymfocyty, které představují subpopulaci B lymfocytů určenou k produkci specifických protilátek. Folikulární B buňky (FO) IgM+IgD+CD19+CD21+CD38+CD24+CD23+ představují subpopulaci zralých naivních B lymfocytů. Hlavně se nachází ve folikulech bílé pulpy sleziny, ale také aktivně migrují mezi jednotlivými sekundárními lymfatickými orgány do doby, než jsou schopny rozeznat antigen pomocí svého BCR (*Wardemann et al., 2002*). FO B buňky jsou schopné antigenní odpovědi. Ve folikulech vytváří germinální centrum za pomoci CD4⁺ Th a folikulárních dendritických buněk. V germinálním centru FO B buňky proliferují, prochází somatickou hypermutací, afinitní maturací a izotypovým přesmykem. Aktivované FO B buňky mohou též prezentovat antigeny a tím stimulovat T lymfocyty. FO B buňky diferencují do stádia buněk plazmatických produkujících specifické protilátky nebo dlouze žijících buněk paměťových (*Martin et al., 2001*). Ve světlé zóně jsou přítomny folikulární dendritické buňky, exprimující antigen, který vyvolal primární reakci. Na něj se vážou centrocyty svými mutovanými Ig. Centrocyty nesoucí Ig s nízkou afinitou k antigenu umírají apoptózou, naopak u centrocytů s vysokou afinitou Ig k antigenu dochází za pomoci aktivovaných T lymfocytů (vazba CD40-CD40L) k izotypovému přesmyku, tj. záměně konstantní části produkovaných Ig. Místo původních IgM se začnou tvořit jiné izotypy. Izotyp nově vzniklých imunoglobulinů je určován cytokiny. Za přítomnosti IL-4 se tvoří hlavně IgG a IgE, TGF- β a IL-10 podporuje vznik IgA a IFN γ vznik IgG_{2b} a IgG₃ (*Krejsek et al., 2004; Hořejší et al., 1998; Manser et al., 2004; McHeyzer-Williams et al., 2006*).

Další diferenciaci izotypově přepnutých lymfocytů se může ubírat dvěma směry: část B lymfocytů se diferencuje do stádia plazmoblastů, které se dále dělí a produkují protilátky. Nakonec však přestávají proliferovat a přesouvají se do kostní dřeně. Tyto buňky nazýváme plazmatickými buňkami. V kostní dřeni jsou podporovány stromálními buňkami a mohou přežívat různě dlouhou dobu. Druhá cesta vede ke vzniku paměťových B lymfocytů, schopných rychlé stimulace a produkce specifických imunoglobulinů při sekundární infekci. O tom, kterou cestou se diferenciaci izotypově přepnutých B lymfocytů bude ubírat, zřejmě rozhoduje afinita imunoglobulinů k antigenu. Vysoce afinitní buňky se vyvíjejí v plazmatické buňky, středně afinitní v paměťové a nízké afinitní umírají apoptózou (*Smith et al., 2000*).

3.2.3.3 B LYMFOCYTY MARGINÁLNÍ ZÓNY

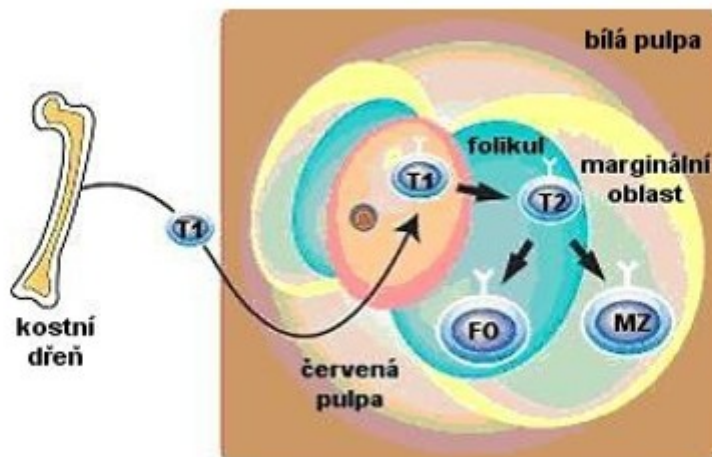
Marginální zóna je unikátní částí sleziny, která se nenachází v žádných jiných primárních či sekundárních lymfatických orgánech. B buňky marginální zóny (MZ) pochází ze sleziny z oblasti na rozhraní červené a bílé pulpy tzv. marginální oblasti (obr. 4). V marginální zóně se kromě marginálních buněk vyskytují i buňky myeloidní, dendritické a stromální (*Tierens et al., 1999*). Marginální zóna je, co se týče její funkce, specializovaná na odpověď proti krevním patogenům jako jsou bakterie a viry a zejména proti T-independentním antigenům (*Martin et al., 2001; Attanavanich a Kearney, 2004*).

B-lymfocyty marginální zóny (MZ) jsou na základě svých povrchových znaků charakterizovány imunofenotypem $IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD1d^{high}CD23^{-}$ (*Pillai et al., 2009*).

Pro MZ B je charakteristická vysoká densita exprese IgM a povrchového receptoru CD21 (komplementový receptor pro C3d složku komplementu). Ten umožňuje zesílení aktivační kaskády B lymfocytů. Pokud je antigen, na němž je navázán fragment C3d, rozpoznáván pomocí BcR, dochází i k provázání na molekulu CD21 a k výraznému zesílení efektivity přenosu signálu, a to o 3 až 4 řády (*Timens et al., 1989*). Vysoká koncentrace CD21 na povrchu MZ B lymfocytů je nutným předpokladem pro vazbu polysacharidových antigenů, které jsou nejčastěji opsonizovány C3d složkou komplementu. Tato vazba spojená s pomalým průtokem krve v marginálním sinu nahrazuje potřebu přítomnosti vysoce afinitních B lymfocytů. (*Weller et al., 2004*).

Mimo jejich role ve vrozené imunitě jsou MZ B lymfocyty schopny transportovat různé velké antigeny nebo dokonce i celé viry do folikulů a tím také zahájit adaptivní odpověď na daný antigen a zvýšit tak repertoár prezentovaných antigenů v GC. Také přenáší komplexy antigenů s IgM, což opět vede ke stimulaci T-dependentní odpovědi. Poté, co dopraví antigen FDC v GC, jsou schopny se opětovně vrátit do marginální zóny (*Cinamon et al., 2008; Ferguson et al., 2004*).

Ke stimulaci marginální zóny B lymfocytů nedochází stejně jako v případě folikulárních buněk přes BCR komplex, ale pomocí TLR a ostatních PRR.



Obrázek 4 rozhraní červené a bílé pulpy (Su et al., 2004) –modifikováno.

3.2.3.4 GERMINÁLNÍ CENTRA

Germinální centrum (germinal centres, GC) je mikroanatomická oblast, která se nachází v sekundárních lymfatických orgánech. Tato oblast byla poprvé popsána v roce 1885 Walthrem Flemmingem na lymfatických uzlinách králíka a býka, na Peyerových plátech králíka a lidských podjazykových tonzilách (Flemming, 1885). Teprve později, v 90. letech 20. století byla objasněna skutečná podstata dějů v GC, zjistilo se, že zde dochází k somatickým hypermutacím a izotypovému přesmyku (Jacob et al., 1991).

Primární funkce germinálního centra je tvorba paměťových a plazmatických buněk produkujících vysoce afinitní protilátky. Po antigenní stimulaci naivních B lymfocytů dochází po několika dnech k akumulaci B buněk a formaci germinálního centra (Coffey et al., 2009). Germinální centrum představuje specifickou oblast, kde dochází k reakci mezi aktivovanými naivními B lymfocyty, folikulárními dendritickými buňkami a Th lymfocyty (TH). Interakce buněk imunitního systému v GC je důležitou součástí adaptivní T-dependentní imunitní odpovědi (Küppers et al., 1993).

Histologicky lze oblast GC rozdělit na tmavou a světlou zónu. V tmavé zóně se nachází buňky tzv. centroblasty. Tyto buňky zde proliferují, prochází procesem somatické hypermutace genů ve variabilní oblasti imunoglobulinů a selekcí (tzv. afinitní maturací).

Jsou selektovány pouze B lymfocyty s vysokou afinitou k antigenu. Ve světlé zóně se nachází centrocyty, které jsou schopné vázat antigeny, které B lymfocytům prezentují folikulární dendritické buňky. Aby byly B buňky schopné diferenciaci do dalšího vývojového stádia – paměťového B lymfocytu nebo plazmatické buňky, jsou nutné kostimulační signály od TFH (T follicular helper) lymfocytů (*de Vinuesa et al., 2000*).

Pod vlivem mikroprostředí germinálních center vznikají paměťové B lymfocyty a efektorové plazmatické buňky, které produkují vysoce afinitní protilátky, které jsou důležité např. v boji proti patogenním mikroorganismům (*MacLennan, 1994*).

Germinální centra jsou formována proliferujícími B lymfocytů ve folikulech periferních lymfoidních tkání během T-dependentní protilátkou odpovědi. Mezi periferní lymfatické tkáně řadíme: lymfatické uzliny, tonzily, slezinu a Peyeroovy plaky. Naivní B lymfocyty migrují v periferních lymfoidních orgánech do oblasti, která je nazývána jako T buněčná zóna. Migrace je zprostředkována pomocí chemokinových receptorů, které lymfocyty exprimují na svém povrchu v důsledku kontaktu s APC (antigen presenting cell, antigen prezentující buňka). K plné aktivaci B lymfocytu dochází v T buněčné zóně, kde dochází ke kontaktu s CD4+ T lymfocytů a APC. Další důležitým prvkem v aktivaci reakce GC je interakce kostimulačních receptorů, které se vyskytují na povrchu B lymfocytů, s ligandy, které na svém povrchu nesou T lymfocyty nebo APC (*Allen et al., 2004*).

3.2.3.5 SOMATICKÁ HYPERMUTACE

Somatická hypermutace (SHM) patří spolu s klonální selekcí mezi dva související kroky afinitní maturace, které se odehrávají v germinálních centrech sekundárních lymfatických orgánů. Afinitní maturace je imunologický proces, který umožňuje B lymfocytům vyvinout protilátky s lepší afinitou k antigenu. Pokud se imunitní systém setká s tímto antigenem (například nějakým mikroorganismem) opakovaně, je schopen vytvořit protilátky, které se na něj lépe vážou.

SHM je mutace ve variabilních CDR sekvencích imunoglobulinových genů, které jsou zodpovědné za vazbu antigenů. Mutační rychlost je zde asi milionkrát vyšší, než v buňkách, které nespádají pod lymfatický systém. Přesný princip somatické hypermutace ještě není jasně prozkoumán, nicméně zahrnuje zřejmě enzym cytidindeaminázu (AICD). Vlivem této zvýšené mutační rychlosti dochází asi k 1-2 mutacím v každé CDR oblasti v každé buněčné

generaci. Tyto mutace náhodně mění vazebnou specifitu a afinitu protilátek (*Teng et al., 2007*).

V tmavé zóně germinálního centra dochází k aktivaci rekombinačních procesů a k vytvoření nového antigenně specifického receptoru zralých B lymfocytů pomocí přeskupení genových segmentů kódujících variabilní oblast imunoglobulinu. Zavádění somatické hypermutace je dvouступňový proces. Mechanismus je zahájen enzymem aktivací indukovanou cytidindeaminázou (AID), která deaminuje cytidinové zbytky ve V(D)J oblasti imunoglobulinu a nahradí je uridinem (*Muramatsu et al., 2000*). Mutační rychlost této substituce je přibližně 10⁻³ na jedno buněčné dělení. Změna aminoskupiny vede k náhradě páru nukleotidů C/G za T/A. Díky tomuto procesu tzv. somatické hypermutace (SHM) a nepřesných DNA opravných mechanismů dochází k nárůstu genetické variability imunoglobulinů (*Arakawa et al., 2002*).

3.2.3.6 IZOTYPOVÝ PŘESMYK

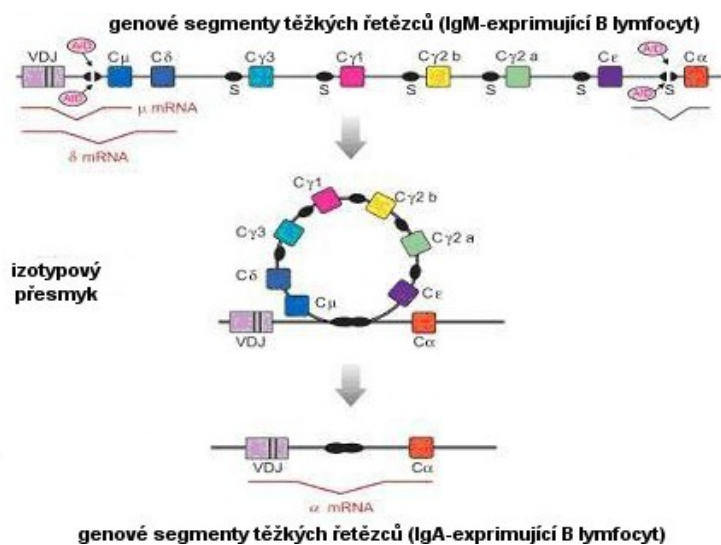
Dalším důležitým jevem souvisejícím s diferenciací B lymfocytů a přeskupením Ig-genů je izotypový přesmyk (class switch). K izotypovému přesmyku dochází uvnitř nebo mimo germinální centrum po antigenní stimulaci B lymfocytů. Tento proces, během kterého se mění se třída (izotypu) protilátek, je důležitý pro změnu efektorové funkce protilátek beze změny variabilní oblasti BCR.

B lymfocyty, které prošly V(D)J rekombinací genů pro těžký, respektive lehký řetězec v kostní dřeni exprimují na svém povrchu IgM (obr.5). Dále migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde po setkání s antigeny dochází k dalším genetickým změnám na úrovni genů pro těžký a lehký řetězec imunoglobulinů.

Izotypový přesmyk je zahájen rekombinázami, které rozeznávají specifické tzv. přepínací S (switch) sekvence (*Bransteitter et al., 2006*). Tyto sekvence se nachází v intronu mezi JH a C μ segmentem a dále před každým C-genovým konstantním segmentem konkrétního izotypu kromě C μ a C δ (obr.5). Každý CH genový segment je uspořádán za nekódující oblast (I exon) a S oblast. S oblast je dlouhá 1-12 kb a obsahuje GC repetitivní sekvence, ve kterých vznikají dsDNA zlomy. V ssDNA vláknu enzym AID opět zahajuje deaminaci cytosinu na uridin. Přesný mechanismus a regulace AID během izotypového přesmyku je předmětem výzkumu (*Dickerson et al., 2003*). Mutace, DNA zlomy a U/G nukleotidové

záměny během přesmyku aktivují DNA reparační mechanismy. Do mRNA je přepsán pouze konstantní genový segment, který je nejbližší 3' VDJ segmentu. Po sestřihu a translaci vzniká izotyp, který je odlišný od původního imunoglobulinu s konstantní oblastí C γ (Pinaud *et al.*, 2001).

Izotypové přesmyky mohou probíhat sekvenčně, dokud je co eliminovat. To k jakému konkrétnímu přesmyku dojde a jaký izotyp bude buňka produkovat, je do značné míry regulováno rozpustnými působky- cytokiny (např. IL-4) stimuluje produkce Ig E IgG1 a inhibuje produkci Igg2 (Hořejší *et al.*, 2013).



Obrázek 5. Mechanismus izotypového přesmyku. (Stavnezer a Schrader, 2006) volně převzato.

3.2.3.7 PAMĚŤOVÉ B LYMFOCYTY

Paměťové (memory) B lymfocyty jsou lymfocyty, které vznikají v závislosti na reakcích proti T-independentním (sacharidové antigeny) a T-dependentním antigenům (proteinové antigeny). Tyto buňky zprostředkovávají imunologickou paměť, která zajišťuje, že při opakovaném setkání s antigenem (např. bakterií) dochází ke kvalitativně a kvantitativně účinnější reakci, než při první expozici danému antigenu (Lanzavechia *et al.*, 2002).

Imunologická paměť vzniká jako odpověď na antigenní stimulaci. Paměťové B lymfocyty se při setkání s antigenem rychle aktivují, rozmnoží (klonální expanze) a diferencují v plazmatické buňky, které sekretují protilátky (Ahmed a Gray, 1996). Část

paměťových B lymfocytů cirkuluje mezi sekundárními lymfatickými orgány a kostní dření (*Paramithiotis et al., 1997*). Hlavním znakem těchto buněk je exprese povrchové molekuly CD27 a přítomnost somatických mutací v genech ve variabilní oblasti imunoglobulinů více v odstavci 3.2.4.1. T-dependentní paměťové B-lymfocyty se generují z buněk, které prošly dějí v GC. V germinálním centru dochází k izotypovému přesmyku a paměťové B buňky mají fenotyp $\text{IgM}^{-}\text{IgD}^{-}\text{CD19}^{+}\text{CD21}^{\text{high}}\text{CD24}^{\text{high}}\text{CD38}^{+}\text{CD27}^{+}$ (*Agematsu et al., 1997; Klein et al., 1998; Seifert a Küppers, 2009*). Znamená to, že procesy v GC dávají vzniknout izotypově přepnutým paměťovým buňkám, které osídlují sekundární lymfatické orgány nebo migrují do kostní dřeně (*Revy et al., 2000*).

3.2.3.8 PLAZMATICKÉ BUŇKY

Plazmatická buňka je bílá krvinka specializovaná na produkci protilátek (imunoglobulinů). Plazmatické buňky mají poměrně krátkou dobu životnosti a na svém povrchu mají minimální množství protilátek, ale zato do svého okolí vylučují velké množství bílkovin (cca 2000 molekul/s) (*Virella et al., 2001*).

Plazmatické buňky produkují a sekretují protilátky, které jsou důležitou součástí imunitní obrany před patogeny. Tyto buňky se také účastní mnoha patologických procesů (autoimunitní choroby, mnohočetný myelom). Plazmatické buňky jsou konečným diferenciacním stádiem vývoje B lymfocytů, které vznikají z folikulárních buněk, buněk marginální zóny a také z dlouhodobě žijících paměťových buněk (*Ahmed a Gray, 1996*).

B lymfocyty marginální zóny jako první diferencují do plazmatických buněk po setkání s cizím antigenem (*Pillai et al., 2005; Lopes-Carvalho a Kearney, 2004*). Je to dáno tím, že MZ B lymfocyty mají nižší aktivační práh než FM B lymfocyty. Přesný molekulární mechanismus tohoto procesu není stále zcela jasně objasněn a popsán. Aktivací B lymfocytů marginální zóny navázáním antigenu na TLR nebo BCR, dochází k přímé diferenciaci B buněk do stádia plazmatické buňky. Tyto plazmatické buňky žijí jen krátce a produkují nízkoafinitní IgM protilátky. V primárních folikulech periferních lymfatických orgánů v germinálním centru dochází k T-dependentní aktivaci B lymfocytů a vytváří se plazmatické buňky, které sekretují vysokoafinitní protilátky (*Marinova et al., 2007*). V GC se diferencují plazmatické buňky z dlouze žijících paměťových buněk, které se sekundárně setkaly s antigeny.

Nově vzniklé buňky mohou dále migrovat do kostní dřeně a dozrávat zde v plazmatické buňky. V prostředí kostní dřeně mohou zůstat od několik měsíců až roky a produkovat zde protilátky i bez přítomnosti antigenů, proto se nazývají dlouze žijící plazmatické buňky (*Manz a Radbruch, 2002*). U autoimunitních onemocnění mohou mít tyto buňky patologickou roli, protože produkují autoprottilátky (*Hoyer et al., 2004*).

3.2.4 B LYMCOTY VYSKYTYJÍCÍ SE V PERIFERNÍ KRVI

V periferní krvi jsou přítomna nejrůznější vývojová stadia B lymfocytů, která lze detekovat pomocí základních specifických povrchových molekul CD (cluster of differentiation) a imunoglobulinových molekul (Ig). *Klein et al.* (1998) dělí populaci periferních B lymfocytů podle povrchové exprese CD27 na pět hlavních populací: *IgM+IgD+CD5+CD27-*, *IgM+IgD+CD5-CD27-*, *IgM+IgD+CD27+*, *IgA+* nebo *IgG+CD27+*, *IgM+CD27+(IgM-only)* a *IgD+ CD27+(IgD-only)*.

Kromě dělení periferních B lymfocytů na základě povrchové exprese molekuly CD27, je lze blíže charakterizovat na molekulární úrovni za pomoci rozložení somatických mutací genů variabilní oblasti (IgV) těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu (*Klein et al., 1997*).

3.2.4.1 ROZDĚLENÍ B LYMFOCYTŮ PODLE EXPRESE CD27

Klein et al. dělí B lymfocyty v periferní krvi na základě exprese CD27 molekuly. Tato molekula slouží jako marker pro B lymfocyty, nesoucí somatické mutace v genech pro variabilní části imunoglobulinových řetězců, tzn. prošly reakcemi v GC. V periferní krvi se nachází 60 % naivních B lymfocytů bez somatických mutací, které jsou CD27- a 40 % paměťových buněk nesoucí somatické hypermutace, které jsou CD27+ (*Klein et al., 1998*).

Podle strategie (gate) dle *Benitez et al.*, můžeme dobře zhodnotit populaci „non-memory (NMBC)“naivních (CD27 B lymfocytů), které cirkulují v periferní krvi. Mezi naivní B lymfocyty jsou řazeny T1 a T2 B lymfocyty, FM B lymfocyty a B lymfocyty MZ (velmi minoritní subpopulace), které se nesetkaly s antigenem, který by byl schopný je aktivovat. Nejvíce zastoupenou subpopulací NMBC B lymfocytů jsou FM B lymfocyty, které tvoří více než polovinu celé této skupiny (*Benitez et al., 2014*).

Charakteristickým znakem paměťových buněk je povrchová exprese molekuly CD27 (Klein et al., 1997). Mezi paměťové B buňky lze zařadit tzv. klasické IgM+IgD+CD27+ lymfocyty, které představují 15 % ze všech 60 % paměťových B populací v periferní krvi. Ve stejném zastoupení jako předchozí populace jsou paměťové B buňky izotypově přepnuté a exprimují jiný izotyp imunoglobulinu než je IgM a IgD, přičemž nejčastější je IgA nebo IgG. IgM+CD27+ jsou méně časté populace (IgM only; 10 % z 60 %) s chybějící expresí IgD molekuly. Nejmenší populací paměťových B je IgD+CD27+ (IgD only; 1% z 60 %; obr. 10) (Klein et al., 1998). IgD+CD27+ buňky představují populaci, která se vyskytuje hlavně v tonzilách. Během izotopového přesmyku dochází u těchto buněk ke ztrátě Cμ genu, proto nedochází k expresi IgM molekuly. Populace je charakteristická svou účastí ve specifických imunitních dějích, které vyžadují přesnou regulaci somatické hypermutace genů variabilní oblasti imunoglobulinu (Seifert a Küppers, 2009).

Mezi ostatní populace B lymfocytů, které můžeme detekovat v periferní krvi patří dvě stádia transientních B lymfocytů (T1 a T2), které pochází z kostní dřeně. T2 B lymfocyty mají vysokou expresi povrchových molekul CD24 a CD21 se vyvíjejí a diferencují ve slezině (Yeramilli a Knight, 2011). Jako další periferní populaci zmíním folikulární B buňky (FO), které jako nezralé B lymfocyty, které jsou CD23+ a CD21+, aktivně migrují mezi sekundárními lymfatickými uzlinami (Odendahl et al., 2000).

Jako minoritní populaci vyskytující se v periferní krvi v malém množství můžeme zmínit prekurzory plazmatických buněk (plazmablasty), které se vyznačují vysokou expresí povrchových molekul CD38 a CD27 (Horst et al., 2002).

3.3 REGULACE VÝVOJE B LYMFOCYTŮ

Centrální a periferní vývoj B lymfocytů je mnohostupňový proces, uskutečňující se od hematopoetické kmenové buňky až do stádia plazmatické buňky produkující protilátky a je řízen vzájemnou souhrou mnoha různých transkripčních faktorů a regulačních sítí signalizačních kaskád (Mansson et al., 2007). Transkripční faktory (TF) jsou proteiny, které se spolupodílejí na iniciaci transkripce (přepisu dědičné informace z genu (z DNA) na RNA). Vážou se na jednotlivé elementy promotoru, čímž usnadňují vazbu příslušné RNA-polymerázy. Prokaryotická RNA-polymeráza ke své činnosti TF nevyžaduje, transkripce u eukaryot je na přítomnosti TF závislá. Rozlišujeme TF obecné, vyskytují se ve

všech typech buněk a TF speciální, vyskytují se pouze v určitých buňkách. Bazální TF jsou faktory nutné pro navození bazální transkripce. Některé TF musí být nejdříve aktivovány např. fosforylací nebo odstraněním inhibitoru (*Alberts, 1998*).

3.3.1 VÝVOJ B LYMFOCYTŮ POMOCÍ TRANSKRIPČNÍCH FAKTORŮ

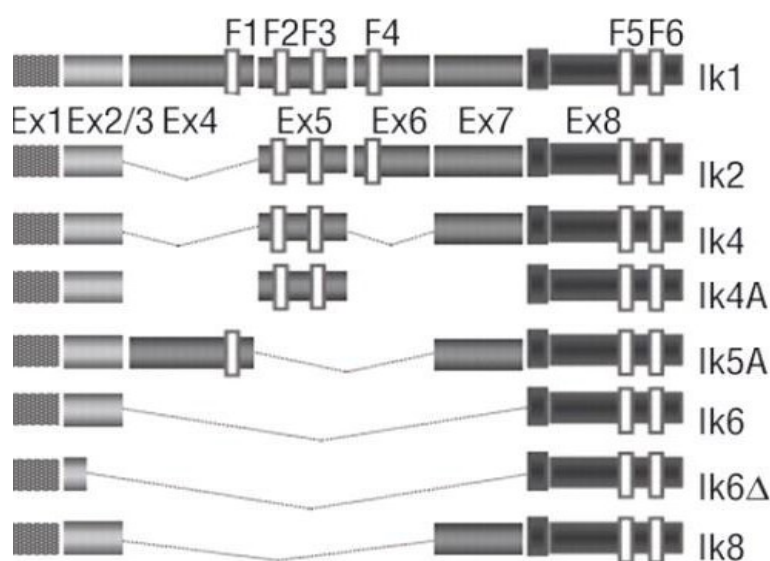
Při vývoji B lymfocytů se uplatňuje řada TF, které svoji vzájemnou kooperací ovlivňují procesy vývoje B lymfocytů od stádia HSC, přes stádia časného a periferního vývoje až k terminálnímu stádiu plazmatické buňky (*Mansson et al., 2007*). Některé TF jsou produkovány jen ve specifických diferenciacích stádiích B lymfocytárního vývoje.

Činnost transkripční regulační sítě, která vede k diferenciaci a samotnému vývoji B lymfocytární linie z CLP, je zahájena aktivací transkripčních faktorů **EBF1**, **Pax5** a **PU.1**. Aktivace EBF1 je iniciována E2A a Stat5 transkripčními proteiny (*Nutt a Kee, 2007*). EBF1 spolupracuje s E2A a Pax5 a pravděpodobně i jinými TF jako Sox4 a Bcl11a. Pax5 je nejdůležitějším faktorem ve vývoji B buněčné identity (*Nutt et al., 1998; Roessler et al., 2007*). Pro vývoj B lymfocytů je důležitý TF PU.1 (Spi-B), který patří do Ets rodiny TF a je exprimován od multipotentního progenitoru až do stádia paměťového B lymfocytu. Jeho interakce s GATA-1 proteinem vede k blokádě vývoje multipotentního progenitoru v erytrocytární linii buněk. Ve vývoji T lymfocytů nesmí být exprimován (*Scott et al., 1994*).

V procesu diferenciaci B lymfocytů je dále zapojen TF označovaný jako **Ikaros**, interagující během vývoje s TF Helios a Aiolos. K expresi TF Ikaros dochází hlavně ve stádiích pro-B lymfocytů a pre-B lymfocytů. Ikaros (IKZF1), kódovaný genem IKZF1 na 7. chromozómu, je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli ve vývoji lymfoidní linie od stádia nejčasnějších prekurzorů v kostní dřeni a působí také jako tumor supresor (*Tonnelle et al., 2009*). Alternativní sestřih spolu s delekcemi a insercemi na dvou místech genu dává vznik řadě izoform IKZF1, z nichž pouze izoformy s alespoň třemi zinkovými prsty (z celkových čtyř) v DNA-vazebné doméně mohou plnit fyziologické funkce IKZF1. Naopak tzv. krátké izoformy IKZF1 s chybějící nebo nefunkční N-terminální doménou se nemohou vázat na DNA, ale mají intaktní C-terminální doménu, která slouží k interakci s dalšími transkripčními faktory i s funkčními izoformami IKZF1; způsobují tedy dominantně-negativní efekt a fungují jako inhibitory funkce IKZF1 a dalších transkripčních faktorů

(Payne *et al.*, 2011). V rámci vývoje krevních řad hraje protein Ikaros klíčovou roli v nastartování lymfoidního transkripčního programu a supresi myeloidních znaků (Molnar *et al.*, 1994).

Pozdější interakce faktoru Ikaros s TF Aiolos je důležitá pro kontrolu procesů B-lymfocytární maturace, proliferace a vzniku GC (Morgan *et al.*, 1997). Samotný Aiolos během periferního vývoje B lymfocytů reguluje signalizaci vedenou prostřednictvím BCR a také vývoj do folikulárních B lymfocytů, nebo B lymfocytů marginální zóny (Cariappa *et al.*, 2001).



Obrázek 6. Isoformy genu IKZF1 (Iacobucci, Haematologica 2008). Mezi krátké isoformy patří Ik4, Ik4A, Ik4del (Ik5A), Ik6, Ik6 delta a Ik8.

Diferenciace z CLP do stádia pro-B je závislá na třech TF - **E2A**, **EBF** a **Pax5**. Transkripční faktor *EBF* (early B cell factor) má DNA vazebnou doménu. EBF je zapojen do reaktivace genů pro tvorbu pre-BCR (promotor genu CD79a, VpreB, λ5, CD19) během diferenciace pro-B lymfocytu. Delece *ebf* genu vede k zastavení B buněčného vývoje. EBF je přímo regulován TF Pax5 a přímo spolupracuje s TF E2A (O’Riordan a Grosschedl, 1999).

TF E2A, je tzv. E-protein, ovlivňující proces D-J přeskupení genových segmentů pro těžký řetězec imunoglobulinu. Spolu s Early B-cell factor 1 (EBF-1) regulují expresi pseudo-

lehkého imunoglobulinového řetězce proteinů RAG1 a RAG2. *E2A* patří mezi E proteiny, které jsou pro B buněčný vývoj nepostradatelné (*Kwon et al., 2008*).

Během stádií pro-B lymfocytů a pre-B lymfocytů je exprimován TF Lef-1. Lef-1 je členem Wnt dráhy a podílí se na proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. Pokud z jakéhokoli důvodu není tento TF exprimován během pro-B lymfocytárního stádia, dochází k apoptotické smrti (*Reya et al., 2000*).

Pax5. (BSAP, B-cell-specific activating protein) patří mezi nejdůležitější TF B lymfocytů a je exprimován ve všech vývojových stádiích B buněk kromě plazmatických buněk (*Zwollo et al., 1999*). je proein, který u lidí je kódován genem PAX5 a tento gen je umístěn na chromozomu 9p13. Podílí se na regulaci rekombinace VH-DH-JH a expresi genů těžkého řetězce (*Nutt et al., 1998; Schebesta et al., 2002*). Další funkcí TF Pax5 je regulace genů kódujících regulační a strukturní proteiny zapojené do B buněčné adheze, migrace, prezentace antigenů a schopnosti formace GC. PAX5 reguluje např. transkripci genů *Bst1*, *CD44*, *Sdc4*, *Tnfrsf19*, *CD97* a *CD55*, které kódují adhezivní receptory. K migraci B lymfocytů dochází díky kontrolované remodelaci aktinového cytoskeletu. Integrinem VLA-5 iniciovaná autofosforylace FAK kinázy (focal adhesion kinase) vede ke kontrolovanému pohybu B buňky. B lymfocyty prezentující antigenní peptidy jsou regulovány PAX5 TF, který je zapojen do transkripce genů *H2-Ob*, *Ifi30* a *CIITA* (*Schebesta et al., 2007*).

Dalším faktorem, který je exprimován během stádií pro-B lymfocytu a pre-B lymfocytu, je **Foxp-1**. Patří do velké FOX rodiny transkripčních faktorů a u savců je důležitý pro správný vývoj mozku, srdce a je důležitým regulátorem morfogeneze plicních dýchacích cest. Podílí se na expresi *EBF1* a *Pax5* a patrně reguluje expresi RAG rekombináz, které se uplatňují během V(D)J rekombinačních procesů (*Katoh., 2005*).

TF NFκB se podílí na stimulaci B lymfocytů, prostřednictvím signalizace vedené přes pre-BCR BCR. Dále se podílí na imunitní reakcích, růstu, diferenciaci a apoptóze B lymfocytů. Je součástí rodiny NFκB/Rel fungující jako regulační TF, jejíž aktivita je dána v závislosti na podjednotkovém složení (fungují jako dimery), lokalizaci na úrovni buňky a interakci s inhibitorovými proteiny IκB (*Saijo et al., 2003; Kaisho et al., 2001*). NFκB signální dráhu je možné aktivovat pomocí dvou drah – klasické a alternativní. Obě dvě tyto dráhy jsou důležité pro aktivaci proliferace naivních B lymfocytů na základě signalizace vedené přes BCR, CD40 nebo přes TLR4, TLR9 (*Ramakrishnan et al., 2004*).

TF **Bcl-6**, **OBF-1**, **Oct-1**, **Oct-2** a **IRF8** se podílejí na vzniku germinálního centra. Bcl-6 funguje jako protoonkogen transkripční represor. Reguluje aktivaci molekul CD69, STAT1 a CD81 a dále se podílí na inhibici diferenciaci do paměťových B-lymfocytů a plazmatických buněk (Kuo et al., 2007). Porucha Bcl-6 vede k neschopnosti formace GC během T-dependentní imunitní odpovědi (Fukuda et al., 1997). **OBF-1**, **Oct-1** a **Oct-2** jsou TF, které se vážou na promotor variabilní oblasti imunoglobulinu, který obsahuje specifickou oktamerovou oblast (5' ATGCAAAT 3') lokalizovanou na 5' konci od TATA-box (Strubin et al., 1995). **OBF-1** je specifický transkripční koaktivátor, který se váže na POU-doménu Oct-1 a Oct-2. OBF-1 má důležitou úlohu v rekombinaci genů lehkého řetězce (Casellas et al., 2002). **Oct-2** je důležitým TF pro B buněčnou proliferaci po stimulaci LPS antigeny a vývoj CD5+ B buněk (Corcoran a Karvelas, 1994).

IRF8 patří do rodiny IRF (interferon regulatory factors). IRF8 má DNA-vazebnou doménu a s ostatními TF vytváří heterodimery (Lee et al., 2006). IRF8 je důležitý pro vývoj folikulárních a B buněk marginální zóny v germinálním centru (Klein et al., 2006). IRF8 reguluje expresi Bcl-6, Aicda (aktivací-indukovanou cytidin deaminázu) a Mdm2, který reguluje protein p53 (Zhou et al., 2009). Bcl6 blokuje expresi p53 a PDCD2 gen programované buněčné smrti (Baron et al., 2002).

Stat5 je transkripční faktor, který reguluje izotypový přesmyk genů pro konstantní řetězec imunoglobulinu za pomoci interleukinu IL-5. STAT5 lze rozdělit na dva subtypy – STAT5a a STAT5b, v obou případech je exprimován v centrocytech v CG, kde se podílí na izotypovém přesmyku u IgM na IgG1 (Horikawa et al., 2001).

TF **BAFF** funguje jako negativní regulátor AP1/ATF transkripční rodiny, také je zapojen do regulace AID a stejně jako STAT5 do procesu izotypového přesmyku (Ise et al., 2011).

Pro přežití a proliferaci **paměťových B buněk** je důležitá negativní regulace TF **Bcl-6** (Kuo et al., 2007). **STAT5** a **IRF4** přímo potlačuje funkci Bcl-6 a umožňuje dělení a diferenciaci paměťových B buněk (Scheeren et al., 2000). Paměťové B lymfocyty lze rozdělit na CD27+ a FcRL4+ (Fc receptor like) nebo FcRL-, protože každá skupina je regulována jinými TF. FcRL4 je inhibitor, člen rodiny transmembránových proteinů s imunomodulačním mechanismem. Jeho intracelulární doména obsahuje tyrozinový receptor. FcRL4 negativně reguluje BCR signalizaci (Ehrhardt et al., 2003). FcRL4+ B buňky lze nalézt v kostní dřeni, slezině, periferní krvi, intestinální tkáni a tonzilách, kde jsou

regulovány pomocí TF Pax5, PU.1 a RUNX-2 TF. RUNX-2 TF je především hlavním regulátorem osteogeneze (Komori et al., 2005). U FcRL- paměťových B lymfocytů se uplatňují TF PAX5, PU.1 a RUNX-1, který redukuje počet lymfocytů a podílí se na negativní regulaci lymfopoézy (Ehrhardt et al., 2005).

Pro vývoj plazmatických buněk jsou podstatné TF **Blimp-1**, **IRF-4** a **XBP-1** (Turner et al., 1994). Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein) přímo negativně reguluje transkripci Bcl-6 a všechny TF, které jsou zapojeny do BCR signalizace (Vasanwala et al., 2002). Pro vývoj **plazmatických buněk** je důležitá negativní regulace Bcl6 a Pax5 TF.

3.3.2 ANTIGENNĚ SPECIFICKÉ RECEPTORY

Antigenně specifickými receptory jednotlivých klonů B lymfocytů jsou povrchové imunoglobuliny (B-cell receptor, BCR). BCR rozeznává antigen v nativní formě na rozdíl od TCR u T lymfocytů, kde se většinou rozeznávají jen komplexy MHC proteinů.

3.3.2.1 IMUNOGLOBULINY

Skupina funkčně i strukturně příbuzných proteinů, které hrají klíčovou roli v imunitním systému. Mezi imunoglobuliny řadíme protilátky, specifické receptory T lymfocytů a B lymfocytů, molekuly HLA, adhesní molekuly a receptory pro růstové faktory. Jsou exprimovány především na leukocytech, ale některé nacházíme i u jiných buněk (např. HLA I. třídy na všech jaderných buňkách). Vyskytují se jako volné molekuly nebo jsou zabudovány do buněčné membrány (Brody et al., 1967). Specificky se váže na antigen. Vzniklá vazba má charakter nekovalentních interakcí. V průběhu specifické imunitní odpovědi humorálního typu jsou tyto látky tvořeny B lymfocyty a plazmatickými buňkami, jež z B lymfocytů v rámci terminální diferenciace vznikají. Imunoglobuliny najdeme u obratlovců v krevním séru, tělních tekutinách a také na povrchu B lymfocytů. Protilátky mají krátké biologické poločasy od 2 do 23 dní. Hrají zásadní roli v obraně organismu.

Existuje jich 5 základních typů, do kterých se rozdělují podle svého těžkého řetězce. Základní stavba - dva lehké řetězce a dva těžké řetězce spojené disulfidickými (S-S) můstky je však u všech typů stejná. Těžké řetězce mohou být typu alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ) nebo mí (μ). Lehké řetězce mohou být dvou typů - kappa (κ) a lambda (λ). Podle

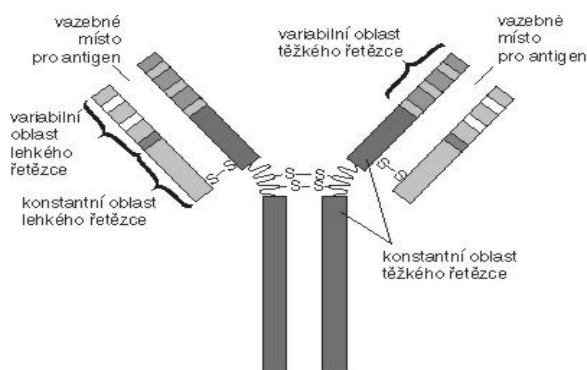
těžkého řetězce tedy rozlišujeme IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Každá molekula imunoglobulinu má oba těžké i oba lehké řetězce vždy stejné (Tarte et al., 2003).

3.3.2.2 STRUKTURA IMUNOGLOBULINŮ

Imunoglobuliny jsou glykoproteiny, které se skládají z více řetězců – ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých řetězců (L) (obr.7). Přibližná molekulová hmotnost lehkého (L) řetězce je 25kDa a u těžkého řetězce (H) 50-75 kDa. u řetězce jsou navzájem spojeny disulfidickými (cystinovými) můstky, a tím vytváří strukturu písmene Y, která zajišťuje schopnost protilátek vázat se na antigeny (Abbas, 2009). Těžkého řetězce se skládají ze čtyř (u některých i z pěti tříd) strukturně podobných domén. Každá z těchto domén je tvořena sekvencí 110-120 aminokyselin (obr.7) (Furukawa et al., 1999). Jednotlivé domény jsou spojeny spojovacími úseky polypeptidového řetězce. Lehký řetězec se skládá z dvou imunoglobulinových domén.

N-koncové části (NH₂) těžkých a lehkých řetězců imunoglobulinů obsahují variabilní úsek (VH a VL oblast), který je důležitý pro samotnou interakci s antigenem (Abbas, 2009). Zbylé domény jsou konstantní a označují se C_L u lehkého řetězce a C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, popř. C_{H4}.

Molekulu imunoglobulinu můžeme za vhodných podmínek proteolyticky rozštěpit na fragmenty, za použití enzymu papainu lze tak získat dva zcela identické fragmenty tzv. Fab fragmenty (ty obsahují jedno vazebné místo pro antigen) a Fc fragment.



Obrázek 7 Struktura imunoglobulinu. Dva lehké a dva těžké řetězce spojené disulfidickými můstky. Jednotlivé řetězce tvoří konstantní oblast s neměnným aminokyselinovým složením a oblast variabilní, v níž se jednotlivé protilátky různých klonů B-lymfocytů liší (Hořejší et al., 2013).

3.3.2.3 RECEPTOR B LMYFOCYTŮ (BCR)

BCR je důležitý receptor na povrchu B lymfocytů. Jedná se o komplex tří proteinů. Prvním je imunoglobulin, další dva proteiny jsou nekovalentně navázány a označují se jako Ig α (někdy také mb-1 nebo CD79a) a Ig β (B29 či také CD79b). Imunoglobulinová část receptoru má stejné vlastnosti, jako protilátky v krvi. Každý BCR má tedy specifické vazebné vlastnosti, které jsou způsobené především V(D)J rekombinací příslušných genů.

Membránově vázaná forma imunoglobulinu se nazývá B buněčný receptor (BCR) a je specifickým receptorem pro antigeny (*Venkitaraman et al., 1991*). Receptor B lymfocytů je komplex složený z dvou těžkých a dvou lehkých řetězců a dvou transmembránových signalizačních molekul CD79 α a CD79 β (Ig α a Ig β) (*Sanchez et al., 1993*). BCR signalizace dokáže v buňce indukovat pozitivní i negativní odpověď (*Healy et al., 1997*). Při infekci nebo imunizaci vysílá receptor s navázaným antigenem signály k proliferaci a diferenciaci lymfocytu v plazmatickou buňku pomocí vyplavení velkého množství Ca²⁺ kationtů a aktivaci NF- κ B, N-FAT, ERK a JNK. Naopak po navázání tělu vlastního antigenu se vyplaví jen malé množství Ca²⁺ kationtů, což vede k aktivaci N-FAT a ERK, ne však k aktivaci NF- κ B a JNK. Funkční BCR je nepostradatelný pro další vývoj a diferenciaci B lymfocytů (*Loder et al., 1999*). Bylo zjištěno, že signalizace z BCR je nutná k přežití zralé B. B buňka bez exprimovaných BCR nebo s inaktivovanými BCR směřuje k apoptóze.

Pochopení BCR signalizace bylo důležitým krokem k léčbě některých B buněčných malignit. Podstatný terapeutický zlom nastal, když v roce 1975 Georges Köhler a César Milstein vynalezli výrobu syntetických protilátek. Velké uplatnění našel rituximab, chimerická monoklonální protilátka proti proteinu CD20, který je exprimován na površích B buněk (*Anderson et al., 1984*).

Dnes se v medicíně využívá inhibitorů BCR signalizace k léčbě nejrůznějších B buněčných malignit (chronická lymfatický leukémie, folikulární lymfom, difúzní velkobuněčný B lymfom, Burkittův lymfom, MALT lymfom, Hodgkinův lymfom ...).

3.3.3 POVRCHOVÉ B BUNĚČNÉ MARKERY

Všechna vývojová stádia a jednotlivé populace B lymfocytů lze charakterizovat na základě přítomnosti různých membránově vázaných molekul, které označujeme jako **CD-markery (tzv. cluster of differentiation)**. CD je označení pro skupinu molekul na buňkách, které mají na povrchu stejnou antigenní determinantu (epitop). Tyto epitopy (a tím i celé buňky) lze identifikovat stejnou monoklonální protilátkou.

Názvosloví CD bylo poprvé navrženo na konferenci *1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA)* roku 1982, která se konala v Paříži. Tento systém byl určen pro klasifikaci mnoha monoklonálních protilátek vyráběných mnoha laboratořemi po celém světě proti různým povrchovým molekulám (antigenům) na leukocytech. Později se systém rozšířil na další typy buněk a nyní rozlišujeme více než 250 CD skupin a podskupin (*Stříž et al., 2015*).

V našem panelu pro průtokovou cytometrii využíváme sedm monoklonálních protilátek proti jednotlivým povrchovým molekulám, jedná se o monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38 a IgM (nespadá pod CD-klasifikaci). Povrchových molekul jednotlivých B lymfocytárních subpopulací je značně více (např. CD22, CD23, CD40, CD72). Níže je uvedena charakteristika pouze aktuálně využívaných povrchových molekul (*Vlková et al., 2010*).

3.3.3.1 CD19

B lymfocytární antigen CD19, také známý jako CD19 (Cluster of Differentiation 19), je protein složený z 240 aminokyselin, který je u lidí kódován genem CD19. Jedná se o glykoprotein o hmotnosti 95 kDa, nesoucí dvě extracelulární Ig-like domény. Představuje jednu z prvních molekul produkovaných B lymfocytární linií, jejíž exprese začíná již od časného vývoje, ovšem diferenciací do plazmatické buňky se její exprese postupně ztrácí (*Zhou et al., 1995*).

Působí především jako koreceptor B buněk ve spojení s CD21 a CD81. CD19 molekula vytváří komplex s CD21 molekulou, která je schopna reagovat s BCR, na nějž je navázán

antigen, obsahující např. C3d složku komplementu. Dochází tak k zesílení aktivace prostřednictvím komplexu BCR-CD19/CD21 (*Carter, Barrington, 2004*).

S tímto CD19-komplexem interaguje mnoho proteinkináz (PK), např. Src (Lyn, Fyn), Ras, Abl, Btk, adaptérové molekuly (Vav, Grb2) a PI3K (*van Zelm et al., 2006*).

Mutace v CD19 jsou spojeny s vážnými imunodeficienčními syndromy charakterizované sníženou produkcí protilátek.

Vzhledem k tomu, že CD19 je charakteristickým znakem B lymfocytů, je tento protein používán pro diagnostiku B buněčných malignit (*Maloney et al., 1997*).

3.3.3.2 CD20

Molekula CD20 je neglykosylovaný povrchový fosfoprotein o hmotnosti 33 – 37 kDa, je exprimován na povrchu všech B buněk začínající v fázi pro-B (CD45R +, CD117 +) a jeho koncentrace se zvyšuje až do dospělosti. U lidí CD20 je kódován MS4A1 genem. Protein nemá žádný přírodní ligand a jeho funkcí je umožnit optimální B buněčnou imunitní odpověď, konkrétně proti T-nezávislých antigenů (*Tedder et al., 1988*).

Imunohistochemické vyšetření mohou být použity k určení přítomnosti CD20 na buňky v histologických řezech tkání. Vzhledem k tomu, že je CD20 přítomen na buňkách většiny B buněčných nádorů, může být velmi užitečné při diagnostice stavů, jako B buněčných lymfomů a leukemií.

Proti molekule CD20 byla vyvinuta chiméřní protilátka, anti-CD20, nazvaná rituximab. Kromě rituximabu se využívají další monoklonální protilátky (obinutuzumab, Ibritumomab tiuxetan, a tositumomab), které jsou všechny aktivně využívány v léčbě B buněčných lymfomů a leukemií. Princip účinku spočívá v redukci B lymfocytární populace na základě navázání protilátky na molekulu CD20 a následnou cytotoxickou reakci mediovanouFc částí anti-CD20 protilátky (*Franke et al., 2011*).

3.3.3.3 CD21

Komplementovaný receptor (CR2), také známý jako komplementovaný C3d receptor a receptor CD21, je protein, který je u člověka kódován genem CR2. Jde o membránový

glykoprotein, sloužící jako multifunkční receptor exprimovaný na B lymfocytech a FDC a také na periferních a thymických T lymfocytech. CR2 / CD21 gen vyrábí dva typy receptoru komplementu (CR1, cca 200 kDa, CR2, asi 145 kDa) pomocí alternativního sestřihu mRNA (*Asokan et al, 2013*).

CR2 je zapojena do systému komplementu. Váže se na iC3b (neaktivní derivát C3b), C3dg, nebo C3d. B buňky mají receptory CR2 na jejich povrchu, Exprese CR2 se poprvé objevuje u zralých B lymfocytů na úrovni tranzientních B lymfocytů následně hladina exprese vzrůstá až do stádia plazmatických buněk, kde ustává (*Fearon et al., 2000*).

3.3.3.4 CD24

CD24 také známý jako HSA (heat stable antigen CD24) je protein, který je u lidí kódován genem CD24.

Molekula CD24 je molekula buněčné adheze, je to glykosylfosfatidylinositolový (GPI) membránově vázaný protein s molekulovou hmotností 30 – 70 kDa (*Henniker et al., 2001*). Zralá molekula je složena pouze z 27 – 30 aminokyselin. Molekula CD24 je exprimována na mnoha typech buněk – neuronální buňky, epitel renálních tubulů, keratinocyty, neutrofilů a B lymfocyty a slouží jako adhezivní molekula pro P-selektin a dále se podílí na přenosu signálů, ovlivňující aktivační signály, které B lymfocyt získává přes jiné receptory (*Aigner et al., 1997; Kay et al., 1991*).

Molekula CD24 je exprimována na povrchu B lymfocytů již od časných vývojových stádií a zůstává také na klidových zralých B lymfocytech (zahrnujících většinu cirkulujících B lymfocytů, B lymfocytů marginální zóny). Její exprese je výrazně snížena v GC a vytrácí se, jakmile dojde k aktivaci B lymfocytů do dalších vývojových stádií (např. plazmatických buněk) (*Klein et al., 1998; Jung et al., 2000*).

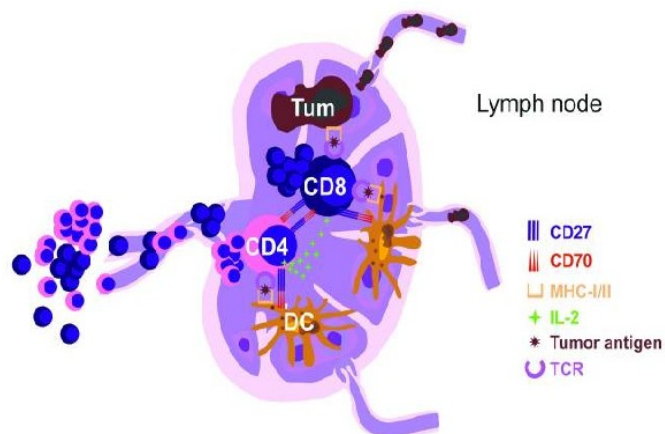
3.3.3.5 CD27

Molekula CD27 je glykosylovaný transmembránový protein o hmotnosti 55 kDa existující jako homodimer, tyto dvě dimerní molekuly mohou být vázány pomocí

disulfidických můstků. U CD27 bylo prokázáno, že interagují s SIVA1, TRAF2 a TRAF3. CD27 je členem TNF superrodiny genů (*tzv. tumor necrosis factor*), která zahrnuje typy TNFR I a II, (CD120a a -b), nervový růstový faktor, receptor (NGFR), CD30 (spojené s Hodgkinova lymfomu), FasyApo – 1 (CD95), CD40 , 4-1BB a OX40 . Tyto receptory jsou známy tím, že hrají velmi významnou úlohu při humorální imunitní odpovědi, růstu, diferenciaci buněk nebo programované buněčné smrti (*Borst et al., 2005*).

CD27 lidský gen detekujeme na chromozomu 12p13. V současné době je předmětem zájmu imunologie jako kostimulační imunitní kontrolní bod molekuly (*Camerini et al., 1991; Gravestein et al., 1993*). Tento receptor je nutný pro výrobu a dlouhodobé udržování T buněčné imunity. Váže se na ligandu CD70 a hraje klíčovou roli v regulaci aktivace B buněk a syntézy imunoglobulinů, také kromě kostimulačních signálů pro T i B buňky a dále také hraje roli v indukci apoptózy.

CD27 signalizace zvyšuje produkci T buněk růstového faktoru IL- 2 . CD27 signalizace buď vede ke zlepšení funkce T buněk nebo dysfunkci T buněk , pravděpodobně v závislosti na množství , trvání a načasování exprese ligandu CD70. V důsledku toho je exprese CD70 přísně regulována (*Claus et al., 2012*). Současné výzkumy lidských autoimunitních onemocnění na zvířecích modelech naznačují, že dráhy CD27-CD70 přispívají k patofyziologii autoimunity. U zdravých jedinců dochází k omezení exprese CD70, konstitutivní exprese CD70 byla dokumentována u rakoviny a chronických virových onemocnění. U některých lidských nádorů , jako jsou rakovina mozku, karcinomy renálních buněk a některých druhů lymfomů, bylo prokázáno, že exprimují CD70 . Exprese CD70 na nádorové buňky se zdá být negativním prognostickým faktorem. Přestože řada zásadních otázek stále zůstává otevřená , současná zjištění naznačují, že zaměření na komponenty této dráhy by mohly poskytnout užitečné a nové terapeutické možnosti léčby. Experimentálně bylo bloádou *CD27 - CD70* dráhy prokázáno zlepšení projevů nemocí u zvířecích modelů (myší kolagen indukované artritidy a experimentální kolitidy)(*Han et al., 2016*) .



Obrázek 8 CD27 signalizace. Pro zánětlivé prostředí sekundárních lymfatických orgánů, CD27 signalizace podporuje tvorbu efektorových T-buněk (Riether et al., 2012).

Molekula CD27 není exprimována na naivních B lymfocytech, ale objevuje se na B lymfocytech, které prošly GC (germinálním centrem). Jedná se o základní marker pro paměťové B lymfocyty. B lymfocyty v GC slabě exprimují molekulu CD27, s diferenciací do stádia plazmatických buněk (po indukci IL-10) se míra exprese zvyšuje. Spolu s molekulou CD38 (viz. níže) je možné použít vysokou expresi molekuly CD27 jako marker k identifikaci plazmatických buněk (Klein et al., 1998; Jung et al., 2000).

Po stimulaci in vitro, B buňky exprimující CD27 (CD27⁺, ale ne (-)) vylučují velké množství jak IgM a IgG. Byly pozorovány tři funkčně různé podskupiny B buněk, které představují různé fáze diferenciacie: CD27⁻ IgD⁺ B buňky nevylučují znatelné Ig; CD27⁺ IgD⁺ B buňky vylučují výlučně IgM; CD27⁺ IgD⁻ B buňky produkují IgG. CD27 byl identifikován jako marker pro paměťové B buňky (Agematsu et al., 1999)

CD27⁺ jsou výrazně větší a bohatší na cytoplazmu, než CD27⁻ B buňky. Kromě toho, CD27⁺ B buňky produkují IgM, IgA a IgG SAC + IL-2, a IgE IL-4, CD27⁻ tyto imunoglobulinové třídy neprodukují. Na základě těchto zjištění jsou CD27⁺ B buňky označovány jako paměťové a CD27⁻ B buňky jako naivní.

3.3.3.6 CD38

CD38 (cluster of differentiation 38), je glykoprotein o molekulové hmotnosti 45 kDa, která tvoří dimer nebo multimer. Nachází se na povrchu mnoha imunitních buněk (bílých

krvinek), včetně CD4 +, CD8 +, B lymfocytů a NK buněk. CD38 také funguje v buněčné adhezi, přenosu signálu a signalizaci vápníku. U lidí, je protein CD38 kódován genem CD38, který se nachází na chromozomu 4 (*Alessio et al., 1990*).

Ztráta funkce CD38 je spojena se sníženou imunitní odpovědí, metabolickými poruchami a modifikací chování (pravděpodobně souvisí s autismem). Molekula CD38 byla původně objevena u T lymfocytů, ale též je exprimována u B lymfocytů. U B lymfocytů je exprimována během jejich časně diferenciaci, u některých buněk v GC a pak v případě plazmatických buněk nebo tzv. plazmablastů. Signalizace přes CD38 u B lymfocytárních prekurzorů vede k inhibici proliferace a tyto buňky hynou apoptotickou smrtí. Pokud dochází k signalizaci přes CD38 u CD38+ B lymfocytů v GC, dochází naopak k zabránění apoptózy (*Medina et al., 2002; Shubinsky a Schlesinger, 1997*).

3.3.3.7 IgM

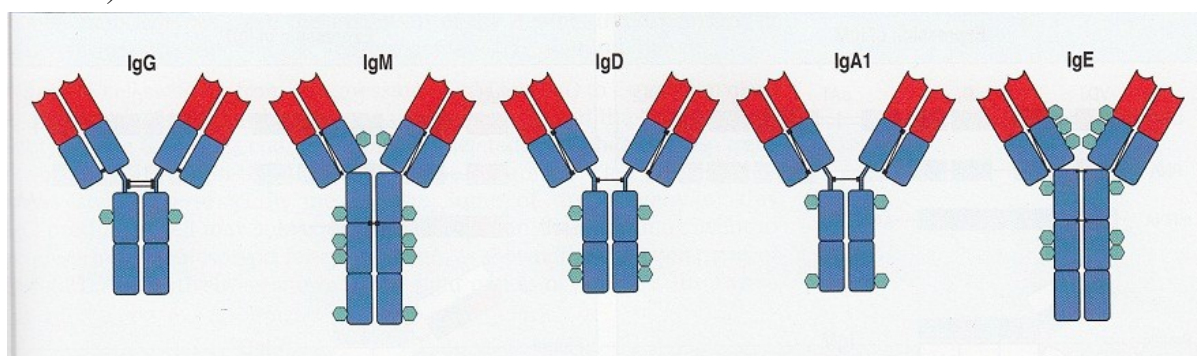
Protilátky třídy **IgM** tvoří 10 % všech protilátek v séru, přičemž jejich koncentrace je 1–1,5 g/l. Monomer IgM je integrální součástí membrány B lymfocytů (BCR). IgM mají krátký poločas, na rozdíl od IgG přežívají v plasmě jen krátkou dobu po zlikvidování antigenu.

Molekula IgM se může vyskytovat ve dvou formách – sekretovaná a membránově vázaná. Membránová molekula IgM je stejně jako sekretovaná molekula IgM složena ze dvou těžkých a ze dvou lehkých řetězců. Membránově vázaná molekula IgM se liší pouze tím, že v transmembránové části má úsek 20 hydrofobních aminokyselin.

Celek protilátek IgM tvoří pentamer, jednotlivé podjednotky jsou spojeny do kruhu cystinovými můstky a jedním J řetězcem. Díky této struktuře nepronikají do tkání, zůstávají v cévním řečišti. Teoreticky se tímto uspořádáním vytvoří 10 vazebných míst pro antigen, prakticky je použitelných pět, ostatní jsou prostorově blokována. Podjednotky mají obdobnou strukturu jako IgE protilátky, jejich těžký řetězec je tvořen 1 variabilní a 4 konstantními imunoglobulinovými doménami (*Hořejší et al., 2013*).

3.3.3.8 OSTATNÍ TRÍDY IMUNOGLOBULINŮ

Existuje pět tříd (izotypů) protilátek - **IgM**, **IgD**, **IgG** (dále dělených na **IgG1- IgG4**), **IgA** (se subtypy **IgA1 a IgA2**) a **IgE**, které se liší strukturou, místem výskytu, mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti a funkční aktivitu (obr.9). Každý izotyp je geneticky podmíněn separátním genem pro příslušnou konstantní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu. Genové oblasti kódující konstantní části jednotlivých izotypů jsou seřazeny za sebou na úseku 14. chromozomu a to v pořadí $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma 3$, $C\gamma 1$, $C\alpha 1$, $C\gamma 2$, $C\gamma 4$, $C\epsilon$ a $C\alpha 2$ (Cook *et al.*, 1994). Těžké řetězce se nazývají μ , δ , γ , ϵ a α . Řetězec γ má ještě čtyři odlišné subtypy ($\gamma 1$ - $\gamma 4$). Řetězec α má pouze dva subtypy ($\alpha 1$ a $\alpha 2$) (Male, 2006).



Obrázek 9. Izotypy imunoglobulinů. Janeway, 2005 (modifikováno).

3.4 VYBRANÉ PATOLOGICKÉ STAVY

3.4.1 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Při autoimunitních onemocněních dochází k defektu autotolerančních fyziologických mechanismů imunitního systému během rozeznávání vlastních buněk a tkání. Porucha může vzniknout na centrální úrovni v thymu anebo v kostní dřeni. Příčiny vzniku těchto nemocí nejsou většinou zcela jasné. Určitou roli zde může hrát genetická predispozice. Kromě toho je tu také nějaký vyvolávající faktor, který patologickou reakci spustí. Většinou je neznámý, často se ovšem podezřívá nějaká banální viróza (zejména infekce horních cest dýchacích).

Infekce je imunitním systémem potlačena, ale blíže neurčitým způsobem ho vyprovokuje k napadení některých buněk našeho těla (*Sinha et al., 1990*).

Autoimunitní onemocnění lze rozdělit dle průběhu a výskytu onemocnění na **systémová a orgánově specifická**. Systémová autoimunitní onemocnění (např. Revmatoidní artritida, Sjogrenův syndrom, Reiterův syndrom, systémový lupus erythematosus) se projevují patologickou imunitní reakcí proti strukturám jaderných, buněčných a orgánově nespecifických antigenů (*Lyons et al., 2005*).

Na poškození tkání u orgánově specifických autoimunitních chorob (např. autoimunitní hemolytická anémie (proti erytrocytům), trombocytopenie (proti krevním destičkám), agranulocytóza (proti granulocytům), diabetes mellitus I. typu (proti B buňkám Langerhansových ostrůvků), chronická gastritis typu A (proti parietálním buňkám žaludeční sliznice a vnitřnímu faktoru), Goodpasturov syndrom Hashimotova tyroiditida) se podílí autoprotilátky nebo autoreaktivní T lymfocyty poškozující určité orgán (slinivku, štítnou žlázu). Řada onemocnění má zcela odlišný průběh choroby a často je nelze jednoznačně zařadit do některé kategorie (*Mačák et al., 2012*).

3.4.2 ANKYLOZUJÍCÍ SPONDYLITIDA

Ankylozující spondylitida (AS) známá také jako (Bechtěrevova nemoc pojmenovaná podle ruského neurologa Vladimira Bechtěreva), je chronické zánětlivé onemocnění postihující sakroiliakální klouby a intervertebrální klouby páteře s přílehlými měkkými tkáněmi a v některých případech i periferní klouby. Jedná se o progredující onemocnění, v jehož důsledku dochází k postupné fúzi páteře. onemocnění je asociováno s přítomností HLA B27 (více než 90%), častý je familiární výskyt (*Mačák et al., 2012*).

Bechtěrevova nemoc je klasická autoimunitní nemoc a její vznik je v principu podobný cukrovce 1. typu, roztroušené skleróze, myasthenii gravis, lupénce a mnoha dalším. Podstatou je problém, že imunitní systém začne špatně reagovat proti některým strukturám vlastního těla. Tento patologický proces je zřejmě zapříčiněn genetickým předpokladem, který se zkombinuje s nějakou banální virovou infekcí. U některých jedinců dojde k tomu, že se po této úspěšně zvládnuté infekci náš imunitní systém „přenastaví“ a napadne naše vlastní tělo. U projevů daného autoimunitního onemocnění pak jde o to, jaký konkrétní

orgán nebo tkáň je napadená. U Bechtěrevovy choroby jsou cílem pro náš imunitní systém vazy podél obratlů, které zabezpečují stabilitu a pohyblivost páteře. Kromě toho bývají postiženy klouby mezi jednotlivými obratli a pak také skloubení mezi kostí křížovou a zbytkem pánve.

Od prvních příznaků nemoci (obvykle pacienty neřešených) do diagnózy uplyne 8,5- 11,4 let (*Jiménez-Balderas a Mintz, 1993*). Přesná příčina AS není stále jasná, avšak známa asociace mezi výskytem nemoci a přítomností antigenu HLA-B27. Asi 90 % pacientů s AS je pozitivní na HLA-B27 a u osob s tímto antigenem je pravděpodobnost onemocnění až 300krát vyšší oproti osobám, které jsou HLA- B27 negativní (*Feldtkeller et al., 2003*). Dlouhotrvající zánět postupně vede k dráždění a poškození výše uvedených vazů a kloubů. Dlouhodobé dráždění vede k postupnému ukládání vápníku, vazy zkostnatí a pevně ztuhnou. Pohyblivost páteře začne klesat.

U menší části pacientů s Bechtěrevovou chorobou se mohou vyskytnout i jiná autoimunitní onemocnění jako například Crohnova nemoc (*Lukáš et al., 2007*).

3.4.3 REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

Revmatoidní artritida (odborně *arthritis rheumatica*) je systémové zánětlivé autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k proliferaci kloubní synovie, jež destruuje kloubní chrupavku a kost pod chrupavkou. Kromě kloubů mohou být postiženy i jiné orgány, např. kůže, cévy, svaly, srdce). Výskyt onemocnění je poměrně častý, postihuje asi 1 % populace, často se projevuje již v mladém věku od 20-40 roků. Na vzniku a rozvoji onemocnění se podílejí imunopatogenní mechanismy (*Arnett et al., 1988; Wiles et al., 1999*).

Začátek může být plíživý nebo akutní. V počátku bývá postižen jeden kloub nebo i více kloubů současně. Patogeneze onemocnění není zcela objasněna. Zdá se, že zánět postihuje geneticky predisponované jedince a probíhá na imunitním podkladě. Zatím ne z zcela jasných příčin, dochází k aktivaci pomocných T lymfocytů (CD4+). Pomocné T lymfocyty tvoří cytokiny, aktivují makrofágy a B buňky. Ty pak produkují protilátky proti vlastním tkáním. Kloubní synovie je výrazně zduřelá, vaskularizovaná, infiltrovaná lymfocyty a makrofágy. Na ireverzibilním poškození tkáně v místě kloubního spojení kostí se podílí hlavně makrofágy, které produkují **prozánětlivé cytokiny** např. IL-6, IL-1, TNF α (*Buchan et al., 1988; Hirano et al., 1988*). Chrupavka je tak izolovaná od vyživující kloubní tekutiny a

dochází k pomalému zanikání chondrocytů. Postupně pak dochází k erozi nekrotické chrupavky a následně pak i kostní tkáně (*Mačák et al., 2012*).

Podobně jako u jiných autoimunitních nemocí je prevence prakticky nemožná. Neznáme vyvolávající moment, a proto nelze zatím zabránit vzniku choroby.

Diagnostika: Existují přesná diagnostická kritéria. Řekněme jednoduše, že se hodnotí přítomnost výše zmíněných (a některých dalších) klinických projevů. Z krevních náběrů zjišťujeme zvýšené CRP, které poukazuje na přítomnost zánětlivého procesu v těle. V krvi se nachází i některé autoprolitáky, mezi ně patří revmatoidní faktor a pro diagnózu ještě cennější anticitrulinové protilátky (anti-CCP).

Léčba: K léčbě revmatoidní artritidy se používá celá řada skupin léků tlumících imunitu, které mimo jiné potlačují i zánětlivý proces při revmatoidní artritidě. Klasickým lékem jsou kortikoidy, které však mají celou řadu vedlejších účinků. Novým způsobem terapie je tzv. biologická léčba, kdy se podávají léky tlumící imunitní systém jen tam, kde je to potřeba. Kromě nich však máme k dispozici také postupy rehabilitace, fyzikální léčby, revmatochirurgie a protetiky. (*Mačák et al., 2012*).

3.4.4 KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Kolorektální karcinom (CRC) je maligní nádorové onemocnění, které zaujímá třetí příčku mezi celosvětově nejčastěji se vyskytujícími malignitami. V ČR incidence CRC rok od roku stoupá. Vedle vysoké a neustále stoupající incidence má toto onemocnění i vysokou mortalitu způsobenou zejména převládající diagnostikou onemocnění až v pokročilých stádiích, kdy jsou léčebné postupy omezené (*Siegel et al., 2011*). Počet nemocných, kteří v důsledku tohoto onemocnění zemřou stále přesahuje šokující hranici 50%.

Výskyt kolorektálního karcinomu je geograficky odlišný, nejvíce jsou postiženy populace v průmyslových zemích euroamerické oblasti, v Austrálii a dále pak na Novém Zélandu. Mezi oblastí s nejnižším výskytem kolorektálního karcinomu patří oblasti v subsaharské Africe a Indii. Jako hlavní příčina těchto rozdílů jsou považovány stravovací návyky.

Naprostou většinu nádorů tlustého střeva tvoří adenokarcinomy, což jsou nádory vznikající z žlaznatých buněk střevní sliznice. V tlustém střevu se mohou vzácně vyskytovat i jiné zhoubné nádory, např. lymfom nebo karcinoid. Tyto nádory se léčí jiným způsobem než adenokarcinomy, často mají také jiné příznaky (Mačák *et al.*, 2012).

Klinický obraz CRC závisí na jeho lokalizaci v tlustém střevě a způsobu růstu, může být tedy velmi různorodý. Nejvýraznějším projevem je obturace střeva, pokud nádorová masa vyplní celé střevní lumen – klinicky pak pacient přichází s ileem. Časnějšími a ne tak klinicky výraznými projevy obturace střeva mohou být nadměrná plynatost, změna defekačního stereotypu, kolikovitě bolesti. Ne zřídka se ale stává, že je nádor objeven až při větších komplikacích. Dalším klinicky výrazným projevem je krvácení z nádoru do GIT, buď mikroskopické nebo makroskopické. Mikroskopického krvácení si pacient ani nemusí všimnout, proto využíváme jako screeningové vyšetření test okultního krvácení do stolice (TOKS), který zjistí i malé množství krve ve stolici. Pokud je krvácení masivnější nebo probíhá dlouhodobě, může mít pacient příznaky anémie. Specifickým příznakem KR-CA vyskytující se v oblasti konečníku jsou tenesmy (nucení na stolici) (Lukáš *et al.*, 2007).

Diagnostika:

Pro odhalení kolorektálního karcinomu se využívá moderních technologií jako je CT, MRI a PET CT, kolonoskopie, ale i drobné fyziologické změny, kterých si můžeme všimnout sami:

- viditelná čerstvá krev ve stolici
- anemizace – poměrně častý jev, vzniká důsledkem chronického krvácení nevelkého rozsahu z nádoru, typické především pro nádory céka a pravé poloviny kolon, kde má střevo větší průsvit, a proto má nádor dostatek času pro svůj růst než začne způsobovat potíže typu poruchy pasáže
- změny frekvence vyprazdňování – může se jednat jak o obstipaci (zácpa), tak průjmy
- hubnutí – nespecifický příznak, ale častý u řady onkologických onemocnění (nejen GIT)
- celková slabost (Schreiber *et al.*, 1997).

Koloskopie

Koloskopie neboli kolonoskopie je metoda vyšetření tlustého střeva, případně tenkého střeva, endoskopem (optický přístroj k vyšetřování tělních dutin a dutých orgánů). Provádí

se při podezření na zánětlivé a nádorové onemocnění tlustého střeva a hemoroidy. Lékař může tímto způsobem diagnostikovat jakékoli známky zánětu, polypy, nebo nádory, ale i odebrat vzorky tkání pro histologické vyšetření nebo provádět menší léčebné zákroky (*Lukáš et al., 1999*).

Dvojkontrastní irrigografie

Jedná se o RTG vyšetření břicha s dvojitým kontrastem (baryová suspenze a vzduch), provádí se ve chvílích, kdy z důvodu obturace lumen nebo špatných anatomických poměrů není možné provést kolonoskopii. Nevýhodou oproti kolonoskopii je zejména fakt, že nelze odebrat biotické vzorky ani odstranit případné polypy (*Lukáš et al., 1999*).

CT

Počítačová tomografie (Computed Tomography, CT) je zobrazovací metoda, která umožňuje za použití rentgenového záření zobrazit celé tělo v sérii řezů. Výsledný obraz vzniká matematickou rekonstrukcí z řady rentgenových projekcí získaných postupně z různých úhlů. Tomografie zobrazuje měkké tkáně, např. slezinu, pankreas, ledviny, mozek, svalstvo. CT lze zjistit jen takové patologické procesy, které se při prostém vyšetření nebo po podání kontrastní látky liší svou denzitou od okolí (*Petterson et al., 1995*).

MRI

Magnetická rezonance dominuje u karcinomu rekta. Zde je nezbytně důležité zjistit míru infiltrace orgánů malé pánve (močový měchýř, ureter, vagina, ale i os sacrum), udělat staging a rozhodnout o typu resekce (*Lukáš et al., 1999*).

3.4.5 IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY

Jedná se o chronická, při dnešních léčebných postupech i celoživotní zánětlivá střevní onemocnění, která začínají v dětství a během dospívání. Etiologie onemocnění je stále nejasná a podílí se na ní celá řada faktorů. Předpokládá se, že onemocnění má genetický podklad a jeho vznik je ovlivněn vlivy zevního prostředí, které spouští mechanismus zánětu. Ze zevních vlivů se podílí zejména stravovací návyky, antibiotické léčby, kouření a hormonální antikoncepce, zvyšující se hygienické návyky a mezi hlavní příčinu se popisuje porucha komunikace mezi imunitním systémem a mikrobiálním obsahem střeva (*Lukáš et al., 1999*).

Mezi idiopatické střevní záněty je řazena ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc a neurčitá kolitida, to znamená zánětlivá onemocnění trávicí trubice, jichž příčina není zatím zcela jasná, na rozdíl od zánětů specifických, kde je příčina známa (*Mamula et al., 2013*). I když zatím neumíme definitivně tyto střevní choroby vyléčit, u značného množství pacientů je současná a nově zaváděná léčba velmi účinná a drtivá většina z nich žije „normální život“ bez větších omezení. Všechna tato onemocnění mají určité společné rysy, ale rozlišujeme je podle hloubky postižení střevní sliznice a výskytem a rozsahem postižení (*Mačák a kol., 2012*).

3.4.5.1 CROHNOVA NEMOC

Crohnova nemoc (*ileitis terminalis*), jedná se o chronický nespecifický zánět, který se může vyskytovat v celé trávicí trubici od dutiny ústní až po anus, ale nejčastěji bývá postižena oblast tenkého střeva (*terminální ileum*) a začátek tlustého střeva (*cékum*). Pro Crohnovu chorobu je typické to, že postihuje celou tloušťku střevní stěny, kde zánětlivé změny jsou segmentární (postihující určitý segment) nebo plurisegmentární (postihuje více segmentů) a následně se mohou tvořit stenózy střeva, abscesy a píštěle (*Lukáš a kol., 1999*). Vzhledem k tomu, že zánět prochází celou střevní stěnou a po léčbě má sklon k jizvení, dochází často k zúžení průsvitu střeva a následné možnosti vzniku střevní neprůchodnosti nebo ke spojení střevních kliček, čímž vznikají srůsty mezi jednotlivými střevními úseky.

Onemocnění se vyskytuje častěji v průmyslově vyspělých zemích severní polokoule, v ČR se objevuje v počtu 20 nových nemocných na 100 000 obyvatel za rok. Nemoc se objevuje ve větší míře u mladých lidí ve věku mezi 20 až 30 lety (25–30 % pacientů je diagnostikováno před 20. rokem života) (*Loftus et al., 1998*).

Crohnova nemoc je klasifikována podle anatomické lokalizace na:

- ileitida, jejunoileitida
- ileokolitida
- kolitida
- anorektální onemocnění
- postižení orální a ezofagogastroduodenální
- postižení apendixu

Přestože příčina Crohnovy nemoci není přesně známa, všeobecně je považována za nemoc autoimunního charakteru. Náchylnost k onemocnění je dána geneticky a jako spouštěcím faktorem u citlivých osob mohou být různé faktory např. infekční a následně imunologické. Mnozí pacienti mají příznaky řadu let před stanovením diagnózy. CN je často doprovázena dalšími komplikujícími chorobami: artritida, osteoporóza, Bechtěrevova nemoc, konjunktivitida (zánět spojivek), anémie, cirhóza, cholelitiáza a další (*Mařatka et al., 1990*).

Nemocí, která má velmi podobné příznaky jako Crohnova nemoc, je ulcerózní kolitida. Stanovit, o kterou z těchto nemocí se jedná, je poměrně složité, ale velmi důležité vzhledem k odlišnému způsobu léčby každé z nich (*Kohout et al., 2006*).

3.4.5.2 ULCERÓZNÍ KOLITIDA

Ulcerózní kolitida (*proctocolitis idiopathica*), je charakterizována hemoragicko-hnisavým až ulcerózním zánětem sliznice konečníku, přilehlé nebo celé části tračníku (*colon-proctocolitis*), jen málokdy bývá zánětem poškozena i konečná část tenkého střeva (*terminální ileum*). Existence této nemoci je známa od počátku dvacátého století, ale její příčina není zatím známa. Předpokládá se, že na jeho vzniku se spolupodílejí vlivy genetické i prostředí (*Lukáš et al., 1999*).

Může se objevovat v kterékoliv věkové kategorii, ale nejčastěji se vykytuje během 15-25. roku života a postihuje 1,5 x častěji ženy než muže. Na rozdíl od Crohnovy choroby nedochází k poškození hlubších vrstev stěny, ale zasažena je v tomto případě pouze sliznice střeva. Při těžkém průběhu onemocnění může dojít ke zkrácení střeva (*jizvením*) a poruše jeho funkce. Onemocnění probíhá nejčastěji jako tzv. lehký tvar s poškozením konečníku a esovitě kličky, středně těžký tvar s poškozením asi poloviny tlustého střeva a těžký tvar (pankolitida) s poškozením celého tlustého střeva (*Mařatka et al., 1990*).

Průběh onemocnění je chronický, kdy se střídají období aktivního zánětu s různě dlouhými obdobími klidu. Klinické obtíže, mohou být u každého pacienta rozdílné, ale u ulcerózní kolitidy na rozdíl od Crohnovy nemoci jsou velmi stereotypní. Mezi prvotními známkami onemocnění a stanovením správné diagnózy uplyne více jak jeden rok. Hlavním

problémem je pravděpodobně velké množství příznaků, které onemocnění doprovázejí a také velmi záleží na tom, zda se vyskytují akutní příznaky zánětu nebo chronické střevní a mimostřevní příznaky. To je hlavní důvod delšího stanovení diagnózy, nehledě na to, že nemoc není tak častá a praktičtí lékaři se s ní setkávají jen málo kdy. U UC bývá nejčastějším projevem hlavně průjem, který je téměř vždy doprovázen příměsí krve ve stolici. Průjem sice patří mezi častější příznaky onemocnění, ale v některých případech u starších lidí trpící ulcerózní kolitidou se vyskytuje naopak stolice, která bývá tvarovaná, nebo častěji tužší až zácpovitá. Nemocné trápí nevolnost, bolestivé nucení na stolicí, krvácení z konečníku a průjmy (*Schmölmerlich et al., 1998*).

3.4.6 APLASTICKÁ ANEMIE

Aplastická anémie (AA) neboli dřevňový útlum je označení pro anémii charakterizovanou nedostatečnou tvorbou krevních buněk, která vede k úbytku všech krevních elementů (*pancytopenie*) – od červených krvinek (*anemie*), bílých krvinek (*leukopenie*) až po krevní destičky (*trombocytopenie*). První případ AA byl popsán slavným německým lékařem a vědcem Paulem Ehrlichem v roce 1888. Ve 20. letech 20. století byla popsána jedna vrozená forma aplastické anemie, tak zvaná Fanconiova anemie (*Mačák et al., 2012*).

AA je raritním onemocněním, které se objeví u 2 až 6 obyvatel z milionu ročně. Nejvyšší incidence nemoci je v zemích východní Asie. V Evropě a Izraeli se incidence pohybuje kolem 2 případů na milion obyvatel a rok. Nejvíce případů v Evropě se objeví ve věku 15-24 (30) let a dále u lidí nad 60 let.

Termín aplastická znamená, že navíc tyto typy buněk nejsou schopny dále maturovat. Příčinou AA je porucha kmenové buňky, která je prekurzorem pro všechny tři druhy krvinek a která vinou poškození zanikne (*Desmond et al., 2014*). Incidence AA v ČR je kolem 0,2/100 000 za 1 rok. Aplastické anémie mohou být vrozené nebo získané.

V kostní dřeni se přestávají tvořit krevní buňky. Mizí buňky “zárodečné”, “kmenové”. Například tvorbou protilátek proti těmto buňkám. Nemocní trpí únavou, která je způsobena chudokrevností. Mohou mít krvácivé projevy (z nosu, kožní krvácení, modřiny), které způsobuje snížený počet krevních destiček, nebo mohou trpět infekcemi (i velmi těžkými, jako například zápal plic), jež jsou dány nedostatkem bílých krvinek (*Locasciulli et al., 2007*).

Nemoc lze podle míry nedostatku krevních buněk dělit na mírnou, těžkou a velmi těžkou. Těžký stupeň aplastické anémie je popsán jako: pokles buněčnosti dřeně pod 30 % při současném chybění fibrózy; přítomností alespoň kritérií cytopenie v obvodové krvi; počet retikulocytů < 0,1% (četneutrofilních segmentů < $0,5 \times 10^9/l$, počet trombocytů < $20 \times 10^9/l$). Nemoc je léčena pomocí imunospuprese (cyklosporin A, kortikosteroidy, antithymocytární globulin) nebo alogenní transplantace (*Locasciulli et al., 2007*).

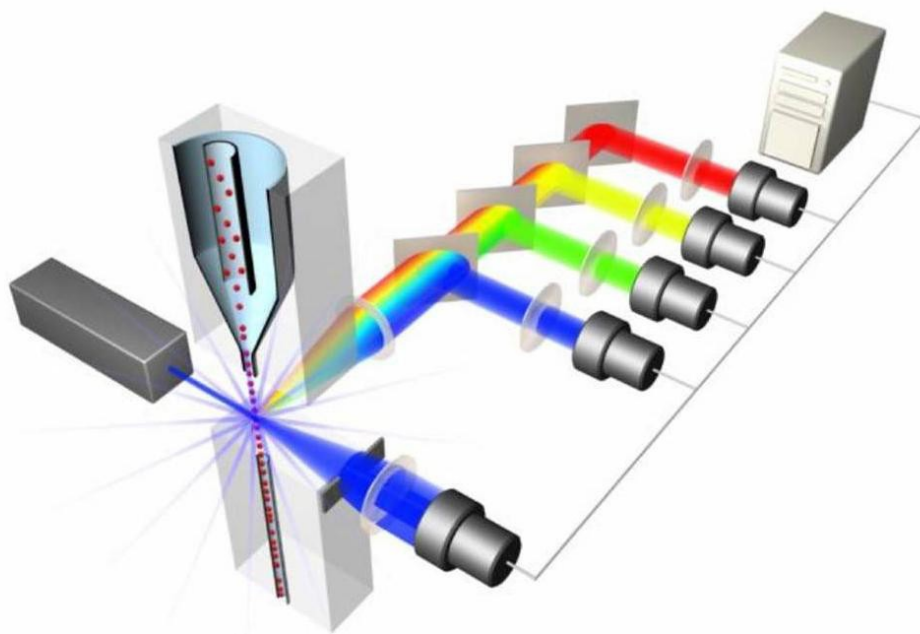
V dobách, kdy se AA neléčila, umíralo 80 % nemocných s velmi těžkou formou choroby do 1 roku od zjištění diagnózy. Příčinami smrti bylo krvácení nebo infekce. Jde tedy o nemoc velice vážnou (*Locasciulli et al., 2007*).

3.5 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie (flow cytometry), je náročná, přesto rychle se rozvíjející, přístrojová metoda využívaná jak v klinické praxi, tak ve výzkumných laboratořích pro analýzu buněk v suspenzi už řadu let (*Adan et al., 2016*). První průtokový sorter sestrojil Mack Fulwyler roku 1965, tento přístroj pracoval na principu elektrostatického vychýlení elektricky nabitých částic, tento systém vyvinul Richard Sweet pro elektrostatickou inkoustovou tiskárnu (*Doležal et al., 2007*). Buněčná suspenze se označuje nejčastěji pomocí monoklonálních protilátek (*mAb*) s navázanou fluorescenční molekulou (*fluorochromem*). Tato suspenze je v průtokovém cytometru usměrněna tak, aby v laminárně proudící tekutině byly za sebou unášeny jednotlivé buňky. Měření fyzikálních a chemických vlastností buněk je umožněno průchodem laserového paprsku (*Shapiro et al., 2003*).

Je-li buněčná suspenze označena monoklonální protilátkou, která reaguje s povrchovými receptory buněk, můžeme identifikovat např. počet T a B lymfocytů, NK buněk apod. Molekuly *mAb* se specificky vážou na antigeny na povrchu nebo uvnitř vyšetřovaných buněk. Takto označená suspenze buněk se vloží do průtokového citometru (obr. 10), kde je přetlakem stříkána skrz malý otvor (*Bartůňková et al., 2011*). Na monoklonální protilátku je navázán fluorochrom, který je excitován procházejícím laserovým paprskem a zároveň dochází k emisi světla, což se projeví jako posun fluorescence a na monitoru přístroje tak můžeme rozlišit pozitivní buněčnou populaci. Určení jednotlivých buněčných populací nám umožňuje tzv. CD klasifikace. CD tvoří skupinu protilátek, rozpoznávající specifický

epitopy daného antigenu na buněčném povrchu. Výhodou je , že je možné analýzu vlastností na úrovni buňky provádět ve vzorku o velkém počtu buněk během velmi krátkého časového úseku (*Macey et al., 2007*).



Obrázek 10. Princip průtokové cytometrie–schéma.zdroj: http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=302

3.5.1 FLUIDIKA

Fluidika je jednou z nejzákladnějších částí průtokového cytometru. Poté, co je vzorek nasán do průtokového cytometru, jsou částice náhodně rozptýleny v prostoru. Pro analýzu je nezbytné, aby se buňky nacházely ve formě suspenze (je totiž nutné, aby částice procházely systémem jedna za druhou a aby procházely konstantní rychlostí) (*Shapiro et al., 2003*). Dále je nutné zajistit, aby proudění bylo laminární a nikoliv turbulentní. Jestli je proudění laminární nebo turbulentní, je možné stanovit podle Reynoldsova čísla R_e . Kritickou hodnotou Reynoldsova čísla (R_e) je hranice mezi laminárním a turbulentním prouděním. Tato hodnota je přímo úměrná průměru trubice d , hustotě tekutiny ρ a střední rychlosti proudu v a nepřímo úměrná viskozitě tekutiny η (*Robinson et al., 1997*).

3.5.2 OPTIKA

Jakmile proběhne hydrodynamická fokusace, jsou jednotlivé částice vystaveny jednomu, popř. několika paprskům laserového světla. Průtokové cytometry bývají dvoulaserové nebo třílaserové. Nejčastěji používaným laserem je argonový laser, který je chlazený vzduchem. Emituje záření s vlnovou délkou 488 nm (modrá oblast spektra), helium-neonový laser s vlnovou délkou 633 nm (červená oblast spektra) a fialový laser s vlnovou délkou 407 nm nebo UV laser s vlnovou délkou 350 nm (*Adan et al., 2016*).

Detektory zaznamenávají:

- přímý rozptyl (forward scatter, FSC)
- boční rozptyl (side scatter, SSC)
- fluorescenci

V případě bočního rozptylu (SSC) a fluorescence je intenzita signálu nízká, a proto je nutné zesílit signál fotonásobičem. U přímého rozptylu (FSC) je intenzita dostatečná, proto není nutno ji nijak zesilovat. Intenzita paprsků FSC je přímo úměrná velikosti buňky, intenzita paprsků SSC odráží vnitřní komplexitu buněk a je úměrná granularitě buňky (*Adan et al., 2016*). Granulocyty a apoptotické buňky mají vyšší hodnoty SSC, které jsou zřejmě způsobené granulací nebo fragmentací jádra. Intenzitou paprsků FSC je možné rozlišit živé a mrtvé buňky, podle SSC granulózní a agranulózní buňky. Kombinace parametrů FSC a SSC jsou charakteristické pro každý typ buňky a může jím být rozlišena každá buňka v rámci heterogenního vzorku, jakým je např. vzorek krve (lymfocyty, granulocyty, monocyty, atd.).

Fluorescenční měření je možné provádět za různých vlnových délek a k tomu má průtokový cytometr několik kanálů, kterými zachycuje emitované světlo. Z toho důvodu jsou součástí průtokového cytometru optické filtry, které zabezpečují specifitu detekce tím, že jsou nepropustné pro některé vlnové délky, zatímco propouští vlnové délky potřebné pro měření (*Shapiro et al., 2003*).

Sběrnou optiku tvoří soustava filtrů, zrcadel a čoček. Filtry a zrcadla nám rozdělují emitované fotony podle vlnové délky na příslušné detektory (fotony jsou rozděleny do tzv. kanálů). U filtrů se používají long pass filtry, short pass filtry, pásmové filtry a dichroické filtry (*Adan et al., 2016*).

Short pass filtry (SP) propouštějí všechny vlnové délky nižší než specifická vlnová délka (např. 600SP propustí všechny kratší vlnové délky než je $\lambda=600$ nm).

Long pass filtry (LP) propouštějí všechny vlnové délky vyšší než konkrétní vlnová délka (např. 600LP propustí všechny delší vlnové délky než $\lambda=600$ nm).

Pásmové filtry propouštějí specifické rozmezí vlnových délek (*Macey et al., 2007*).

3.5.3 ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU

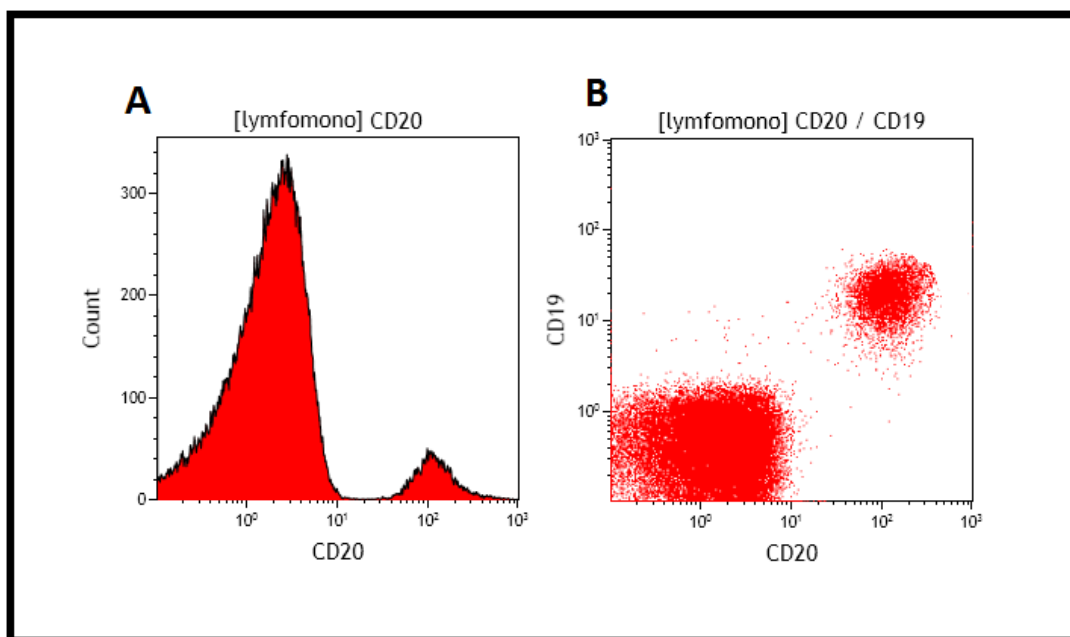
Po dopadu fotonů světla na fotosnímač dojde ke generování malého proudu (několik mikroampérů). Protože je tento proud velmi malý, je díky lineárních či logaritmických fotonásobičů zesilován. Tento signál je již natolik silný a je graficky znázorněn.

Měření z jednotlivých detektorů je označeno jako parametr (přední rozptyl, nebo fluorescenční měření). Informace z každého parametru se označují jako tzv. události (events), které jsou vztaženy k počtu buněk zobrazující určitý marker (*Schapiro et al., 2003*).

3.5.4 ANALÝZA A GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ

Veškeré parametry jsou zaznamenávány do počítače formou matice (*listmode data*). Jakmile jsou data uložena v počítači, můžeme je začít analyzovat. Nejjednodušší zobrazení je formou histogramu, který nám umožňuje získat informace o tom, jaký počet buněk vykazuje pozitivitu pro daný marker. Pro všechny buňky i pro libovolnou subpopulaci, můžeme zjistit základní statistická data, jako je četnost, modus, intenzitu fluorescence včetně jejího mediánu, odchylku nebo geometrický průměr.

Pro vyjádření vzájemných vztahů mezi dvěma parametry, použijeme tzv. dvourozměrné grafy. Nejběžněji se používají tzv. bodové (dot plot) grafy, kde jsou buňky znázorněny jako tečky. V případě, že se více buněk překrývá na jednom místě, vidíme stále jednu tečku a na grafu se to neprojeví (*Batůňková et al., 2011*).



Obrázek 9 Zobrazení naměřených dat průtokovém citometru). A)Histogram (*Rahman., 2006*), B)Dot plot graf (nepublikovaná data).

4 METODY A MATERIÁLY

4.1 ZPRACOVÁNÍ PERIFERNÍ KRVE

Periferní krev byla odebrána do odběrových (9 ml) zkumavek s K3EDTA pacientům s různými autoimunitními chorobami (revmatoidní artritida, Crohnova choroba, ankylózní spondylitida), nádorovými onemocněními (kolorektální karcinom, karcinom pankreatu a žaludku), hematologickými onemocněními (aplastická anemie, myelodysplastický syndrom, mnohotný myelom) a zdravým jedincům, kteří slouží jako zdravé kontroly.

4.1.1 PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ SUSPENZE

Mezi první krok patří vyizolovat tzv. PMBC (*peripherall blood mononuclear cell-mononukleární buňky z periferní krve*). Způsob jejich izolace je závislý na době, která uběhla od odběru vzorků periferní krve. To jakým způsobem budou buňky izolovány, záleží na tom, zda vzorek periferní krve byl odebrán v den zpracování a nebo den předem. Pro vzorek, který byl odebrán den předem, byla izolace PBMC prováděna pomocí klasického ficollu ve zkumavce pomocí hustotní gradientové centrifugace. Pokud byl vzorek odebrán v ten samý den, ve který se bude zpracovávat, použijeme rychlejší variantu B (*tzv. SepMate -StemCell Technologies, Vancouver, Kanada*).

Varianta A

1. Vzorek periferní krve ředíme pomocí PBS v poměru 1:1 v 50ml zkumavkách (TPP AG, Trasadingen, Švýcarsko) a pomocí pipety dobře promícháme.
2. Do další 50ml zkumavky pomocí Pasteurovy pipety napipetujeme 15ml Ficollu.
3. Pomocí Pasteurovy pipety pomalu vrstvíme (ze šikma) zředěnou periferní krev na povrch Ficollu.
4. Vzorek následně centrifugujeme podle níže uvedených parametrů:

Otáčky/min	G	Čas	Teplota (°C)	Akcelerace	Decelerace
1600	400	30min	15	0	0

- Po centrifugaci prstenec PBMC odsajeme pomocí Pasteurovy pipety a přeneseme do nové 50ml zkumavky.
- Suspenzi buněk v 50ml zkumavce doplníme do 40 ml 1x PBS a centrifugujeme podle níže uvedených parametrů:

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

- Po centrifugaci supernatant (nad buňkami) vylijeme do výlevky a resuspendujeme za pomocí třepáčky. Následně doplníme pomocí PBS k 20ml rysce a centrifugujeme podle níže uvedených parametrů:

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

Varianta B

- Periferní krev jsme přelili do 50 ml zkumavky (TPP AG, Trasandingen, Švýcarsko) a zředili v poměru 1:1 pomocí 1x PBS.
- Do 50 ml SepMate zkumavky s membránou (StemCell Technologies) jsme pomocí Pasteurovy pipety napipetovali roztok Ficollu až po okraj zkumavky.
- Pomocí pipety opatrně vrstvíme 30 ml suspenze periferní krve zředěné v 1x PBS (viz. bod 1) na povrch membrány.
- Dále postupujeme jako v bodě 5. Varianta A.

5. Cetrifugujeme dle parametrů:

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

6. Po centrifugaci supernatant slijeme do výlevky a k sedimentu PBMC jsme přidáme 20 ml 1x PBS.
7. Vzorek opět stočíme:

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

8. Supernatant vylijeme a resuspendujeme pomocí třepačky nebo pipety.
9. Resuspendovanou paletu ředíme pomocí WSB dle míry zákalu a to v rozmezí 2-10ml (Polák., 2014).

4.1.2 TEST VIABILITY A URČENÍ MNOŽSTVÍ BUNĚK

1. Ze vzorku PBMC ve WSB jsme odpipetovali 50 μ l suspenze do 0,5 ml zkumavky Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo) následně jsme přidali jsme 5 μ l trypanové modři Trypan Blue stain 0,4 % (Invitrogen, Carlsbad, USA).
2. Jako viabilní se hodnotili buňky, které nebyly modré (neporušená buněčná membrána nedovolí průnik trypanové modři do cytoplazmy).
3. Koncentraci PBMC v 1 ml jsme zjišťovali ve Fuchs-Rosenthalově komůrce (LaborOptik, Lancing, UK) a pomocí světelného mikroskopu při 400 násobném zvětšení (Optica Microscopes Italy, Ponteranica, Itálie).
4. Koncentraci buněk jsme zjistili podle vzorce:
$$\text{celkové množství PBMC} \times 4) / 100 = \text{počet buněk} \times 106 / \text{ml}.$$
5. Výtěžek jsme určili podle vzorce: koncentrace buněk/ml x celkový objem suspenze.

4.1.3 ZNAČENÍ BUNĚK PRO MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

1. Do každé jamky na mikrotitrační destičce jsme napipetovali $0,5 \times 10^6$ buněk/ml. Každou jamku s PBMC jsme převrstvili 100 μ l WSB.
2. Destičku jsme následně stočili na centrifuze při 277 g (5 min), při teplotě 15 °C. Akceleraci a deceleraci jsme nastavili na hodnotu 7. Supernatant jsme pak slili do odpadu.
3. Buňky jsme následně označili pomocí monoklonálních protilátek v roztoku WSB podle našich protokolů na ledu.
4. PBMC s monoklonálními protilátkami jsme inkubovali a v temnu, po dobu 25 minut v lednici při 4°C.
5. Po inkubaci jsme suspenzi 2x promyli 100 μ l roztoku WSB a stočili na centrifuze při 277 g (10min) při 15°C. Akcelerace a dekcelerace byla nastavena na hodnotu 7.
6. Po centrifugaci jsme supernatant vylili do odpadu. Mikrotitrační destičku jsme položili na filtrační papír (odsajeme přebytečnou tekutinu). Dbáme na to, aby nedošlo ke kontaminaci jamek různými monoklonálními protilátkami.
7. Pomocí multikanálové pipety jsme přidali do každé jamky 200 μ l WSB. Mikrotitrační destičku jsme zabalili do alobalu, označili a takto připravenou ji nechali v chladu a temnu do druhého dne, kdy bylo provedeno měření.
8. 10 min před každým měřením musíme přidat do určitých jamek barvivo Hoechst 333258, ten pipetujeme do všech FMO kontrol a monokontroly pro Hoechst.

Tab. 2: Objemy monoklonálních protilátek používaných pro značení jednotlivých B-buněčných subpopulací v našem protokolu, včetně použitých klonů monoklonálních protilátek.

Fluorochrom	FITC	PE	APC	PerCP Cy5.5	Alexa F700	PE Cy7	APC H7	BV655	BV605	BV510
mAb	IgA	CD24	CD21	CD20	CD38	CD19	CD27	IgM	IgG	IgD
Klon mAb	SA- DA4	eBioSN3	HB5	2H7	HIT2	SJ25C1	M- 271	MHN- 88	G18- 145	IA6-2
Objem (μl)	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3

Objemy monoklonálních protilátek (viz Tab.2) používaných v našem protokolu byly stanoveny titračně. V našem případě se jedná o 20x ředěné protilátky. Jamky v mikrotitrační destičce sloužící ke stanovení všech sledovaných B buněčných subpopulací vždy obsahovaly všechny monoklonální protilátky.

Součástí našeho protokolu byly tzv. monokontroly pro každou fluorescenčně značenou protilátku, které sloužily jako kompenzační kontroly a FMO (fluorescence minus one) kontroly, které sloužily ke správnému vymezení (gate) dané B-buněčné subpopulace.

4.2 MĚŘENÍ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Měření vzorků pacientů a kontrol bylo provedeno ve Středisku Cytometrie a Mikroskopie v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky na průtokovém cytometru LSR II (Becton & Dickinson, Franklin Lake, USA). Data z průtokového cytometru byla získána programem Diva v 5.0.1 (Becton & Dickinson, Franklin Lake, USA).

4.3 VYHODNOCENÍ DAT NA PRŮTOKOVÉM CYTOMERU

Zastoupení a distribuce jednotlivých B buněčných subpopulací vzorků pacientů a kontrol bylo provedeno pomocí analyzačního programu Kaluza Analysis verze 1.3 (Beckman-Coulter, Fulerton, USA) na základě naší strategie vymezení (gate) jednotlivých subpopulací.

V každém vzorku periferní krve kontroly a pacienta bylo nasbíráno v lymfomonocytárním gate 5×10^5 buněk, které byly následně dále hodnoceny. Pozitivně a negativně značené B-lymfocytární subpopulace byly stanoveny pomocí dot plot analýzy, na základě nastavení celého systému pomocí izotypových kontrol (myší IgG1 izotyp s příslušným fluorochromem) (Polák, 2014).

4.3.1 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Data z průtokového cytometru jsou po naměření uváděna v procentech a absolutních hodnotách, pro další naši práci s jednotlivými skupinami a naměřenými daty jsou prezentovány jako medián \pm standardní chyba (SE, standard error). Některé klinické parametry jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (SD, standard deviation).

Ke statistickému zpracování dat bylo použito softwaru GrapPad Prism 3 a 6 (GrapPad Software, Inc., La Jolla, USA), jako statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$. V případě malých souborů jsme vyhodnocovali statistická data pomocí Kolmogorov-Smirnov testu.

4.3.2 SLEDOVANÉ B BUNĚČNÉ SUBPOPULACE A STRATEGIE VYMEZENÍ (GATE)

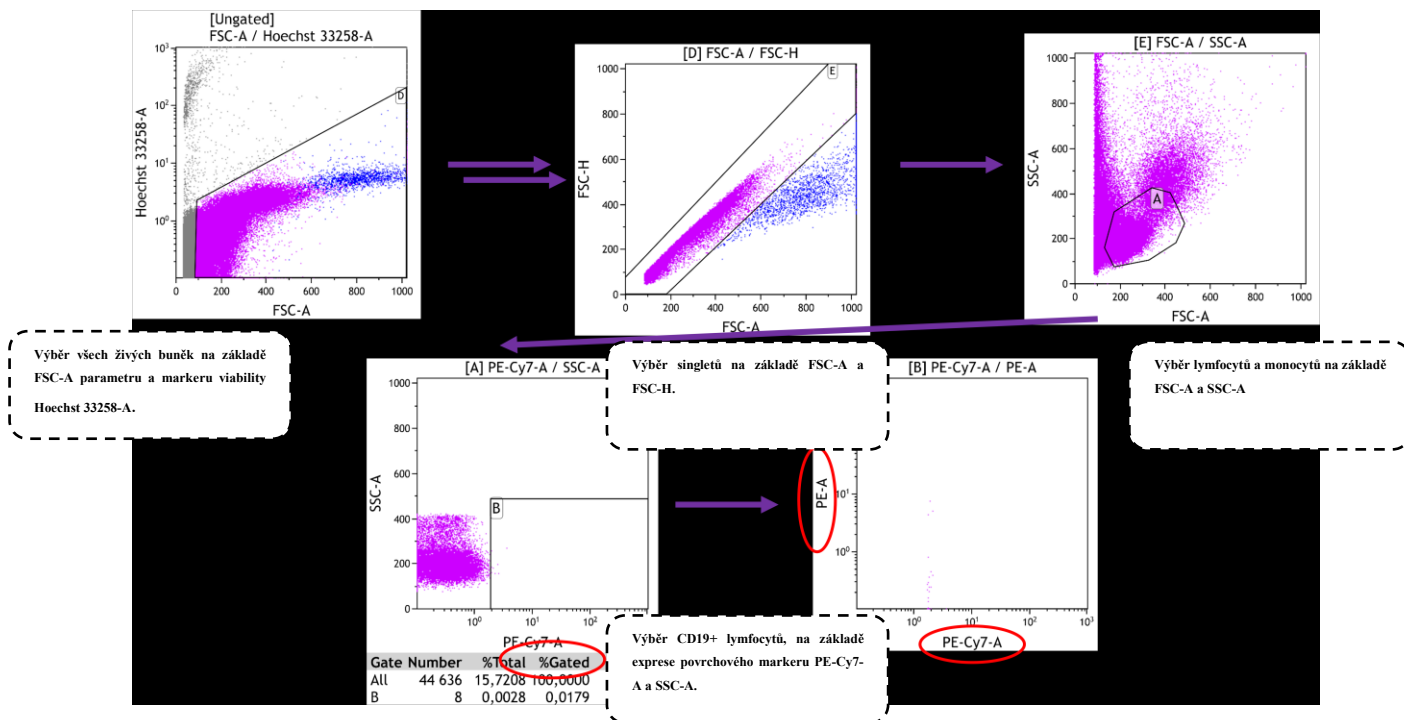
V prvních krocích naší strategie vymezení (gate) jednotlivých populací B lymfocytů používáme jednotnou strategii. Tato strategie zahrnuje vymezení v těchto krocích:

živé buňky (live) \rightarrow singlety (singlets) \rightarrow lymfocyty/monocyty (lymfomono) \rightarrow CD19+ lymfocyty (CD19+, výjimka je u NMBC subpopulací).

Jednotlivé sledované B buněčné subpopulace byly definovány takto:

1) Základní rozdělení subpopulací B lymfocytů na **naivní, paměťové B lymfocyty a plazmatické buňky** – na základě exprese CD19, CD20 a CD27 molekul (dle Klein et al., 1998),

2) u těchto populací byla sledována koexprese znaků **CD21, CD24 a CD38** také **IgD, IgM, IgG a IgA**.



Obrázek 12 Základní rozdělení B lymfocytů na naivní, paměťové B a plazmatické buňky (podle CD19, CD20, CD27, dle Klein et al., 1998)

4.4 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

4.4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Lymphoprep (hustota: $1,007 \pm 0,001$ g/ml při 20 °C) - Axis-ShealidsPoC, Oslo, Norsko

Chlorid sodný (NaCl) - Lachema, Neratovice, ČR

Chlorid draselný (KCl) - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného - Penta, Chrudim, ČR

Dihydrogen fosforečnan draselný (KH_2PO_4) - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Deionizovaná H₂O (ddH₂O) vlastní výroba, systém Millipore, Billerica, USA

Hoechst 33258 Hoechst A - Frankfurt nad Mohanem, Německo

Azid sodný (NaN_3) Sigma - Aldrich, St. Louis, USA

Gelatine Sigma - Aldrich, St. Louis, USA

Trypanová modř Trypan Blue stain 0,4% - Invitrogen, Carlsbad, USA

4.4.2 POUŽITÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Tab. 3: Jména použitých monoklonálních protilátek, klon a katalogové číslo.

Mouse anti-human CD19 (PE-Cy7)	SJ25C1	557835
Mouse anti-human CD20 (PerCP-Cy5.5)	2H7	45020942
Mouse anti-human CD21 (APC)	HB5	1721942
Mouse anti-human CD24 (PE)	eBioSN3	12024742
Mouse anti-human CD27 (APC-H7)	M-T271	560222
Mouse anti-human CD38 (Alexa Fluor 700)	HIT2	560676
Mouse anti-human IgM (BV655)	MHN-88	314525
Mouse anti-human IgG (BV605)	G18-145	563246
Mouse anti-human IgD (BV510)	IA6-2	563034
Mouse anti-human IgA (FITC)	M24A	130093071

4.4.3 SEZNAM ROZTOKŮ A JEJICH PŘÍPRAVA

10XPBS

Tab. 4: Příprava roztoku PBS

Použitá chemikálie	Navážené množství/objem	Výsledná koncentrace
NaCl	80 g	0,37mM
KCl	2 g	0,027mM
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	29 g	0,081mM
KH ₂ PO ₄	2 g	0,015mM
ddH ₂ O	Doplnit do 1000 ml	-

1x PBS

10 ml 10x PBS + 90 ml ddH₂O; pH 7,2-7,4

Wash and Staining Buffer (WSB)

Tab. 5: Příprava roztoku WSB

Použitá chemikálie	Navážené množství/objem	Výsledná koncentrace
Želatina	4 ml	0,004%
Azid sodný	1 g	0,1%
1x PBS	Doplnit do 1000 ml	-

4.4.4 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ

Automatické pipety - Gilson, Middleton, USA

Centrifuga Alegria X-22R Centrifuge - Beckman-Coulter, Fulerton, USA

Digitální váha Sartorius - AG, Gottingem, Německo

Průtokový cytometr LSR II - Becton&Dickinson, Franklin Lakes, USA

Software Diva v 5.0.1 - Becton&Dickinson, Franklin Lakes, USA

Software GrapPad Prism 6 - GrapPad Software, Inc., La Jolla, USA

Software Kaluza Analysis 1.3 - Beckman-Coulter, Fulerton, USA

Vortex V-1 plus - Biosan, Riga, Litva

Výrobce ledu Bar line B 21 - AS/WS Frimont, Milano, Itálie

4.4.5 SEZNAM POUŽITÉHO MATERIÁLU

Latexové rukavice Sempercare - Sempermed, Northamptonshire, VB

Mikrozkumavky - Eppendorf, Hamburg, Německo

Mikrotitrační destičky (96 jamek) - TPP AG, Trasadingen, Švýcarsko

Pasteurova pipeta - Biologix Reaserch Company, Lenexa, USA

Špičky k pipetám - Gilson, Middleton, USA

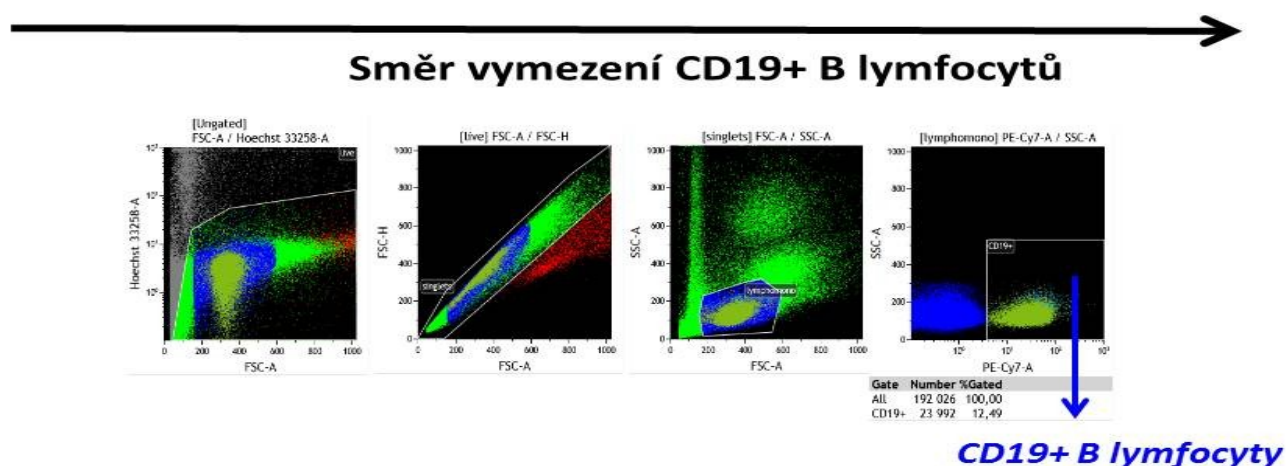
Zkumavky 50 ml - TPP AG, Trasadingen, Švýcarsko

Zkumavky SepMate - StemCell Technologies, Vancouver, Kanada

5 VÝSLEDKY

V diplomové práci jsou vzhledem k rozsahu analýzy pomocí 11-ti barevného panelu prezentovány pouze nejvíce signifikantní výsledky a to na souboru pacientů s CD a UC, které byl detekovány vesměs u populace s imunofenotypem charakterizovaným přítomností marker **CD27+**. Analýza dalších vzorků pacientů v současné době stále probíhá a bude dokončena v řádu 1-2 měsíců.

Jak je vidět z obr. 13, základní hodnotící schéma vycházelo vždy z vymezení živých buněk, singletů (vyloučení mrtvých a slepených, případně agregovaných buněk a debris). Po té byly ohrazen "lymfomono gate" a subpopulace jsou poté vymezeny vždy z **CD19⁺** B lymfocytů.



Obrázek 13. Schéma používané strategie k vymezení CD19⁺ B lymfocytů

Celkem bylo analyzováno 23 subpopulací na základě exprese znaků CD19, CD20, CD21, CD24, CD27, CD38, IgM, IgD, IgG a IgA, analyzovány byly pouze živé tj. Hoechst 33258 negativní a hodnoceny byly pouze populace nesoucí CD27 znak (tj. CD27⁺).

Všechny studované B buněčné populace byly analyzovány celkem na 40 vzorcích periferní krve, z toho 14 kontrol, 7 pacientů s CD a 5 s UC. Jak je patrné z tabulky 9, u 6 z nich jsme

měli možnost námi studované imunofenotypy stanovit také 2 hodiny po intravenózní aplikaci Infliximabu a u jednoho po 14 dnech od podání léku.

Tab. 6: Soubor kontrol (KO), pacientů s CD a UC.

Celkem N=40	Vzorky pacientů s CD (n=26)			
KO	T0	T1	T2	UC
14	6	5	5	5

T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, T2 = odběr 14 dní po aplikaci IFX, IFX = Infliximab

Tabulka 6 shrnuje klinické parametry sledovaných pacientů, převažují muži, pacienti jsou spíše mladší a nikdo z nich nebyl v minulosti léčen anti-TNF preparátem, jednalo se o pacienty tzv. naivní, u nichž došlo postupně k exacerbaci choroby.

Tab. 7: Soubor pacientů s CD a UC.

Demografie			Onemocnění				Bioléčba v minulosti
Číslo	Věk	Pohlaví	Dg.	Trvání nemoci [roky]	Perianální postižení	Operace střevní	Ano/ne
1	58	M	CD	1	ano	ne	ne
2	29	M	CD	nd	nd	nd	nd
3	31	F	CD	1	ne	ne	ne
4	42	M	CD	nd	nd	nd	nd
5	36	F	CD	15	ano	ano	ne
6	31	F	UC	1	ne	ne	ne
7	19	M	UC	0	ne	ne	ne
8	nd	nd	UC	nd	nd	nd	nd
9	nd	nd	UC	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	UC	nd	nd	nd	nd
11	19	M	CD	0	ne	ne	ne

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, M – muž, F – žena, nd - nedefinováno

Jak bylo výše zmíněno, v tomto project jsme se zaměřili pouze na B lymfocyty paměťové.

Jak je vidět z tab. 8 a obr. 14, frekvence CD19⁺CD27⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD zvýšena oproti kontrolám (medián 20,06% vs. 11,75%) a zajímavé zjištění je, že

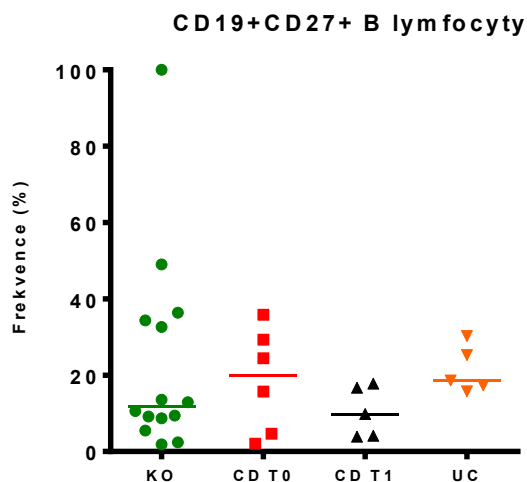
2 hodiny po podání Infliximabu došlo k poklesu frekvence těchto B lymfocytů na 9,84%, tj. dokonce pod hladinu pozorovanou u kontrol. Pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk také zvýšenou oproti kontrolám (medián 18,60%).

Tab. 8: Frekvence CD19⁺CD27⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD27+	KO	CD T0	CD T1	UC
	12,91	15,68	16,74	30,23
	9,19	24,43	17,81	15,75
	32,65	29,30	3,90	25,26
	36,38	4,69	4,12	17,32
	2,40	2,07	9,84	18,60
	5,51	35,86		
	10,58			
	8,68			
	100,00			
	9,40			
	49,00			
	34,33			
	13,56			
	1,90			
rozsah	1,90- 100,00	2,07-35,86	3,90- 17,81	15,75- 30,23
95% CI	5,51-36,38	2,07-35,86	3,90- 17,81	15,75- 30,23
median	11,75	20,06	9,84	18,60
SD	26,47	13,58	6,65	6,11

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v %.

Obrázek 14. Frekvence CD19⁺CD27⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab .

Jak je vidět z tab. 9 a obr. 15, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD opět zvýšena oproti kontrolám (medián 17,61% vs. 11,75%) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo opět k poklesu frekvence těchto B lymfocytů na 12,50%, tj. dokonce pod hladinu pozorovanou u kontrol. Avšak v případě této B buněčné populace pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk podobnou kontrolám (medián 10,89%).

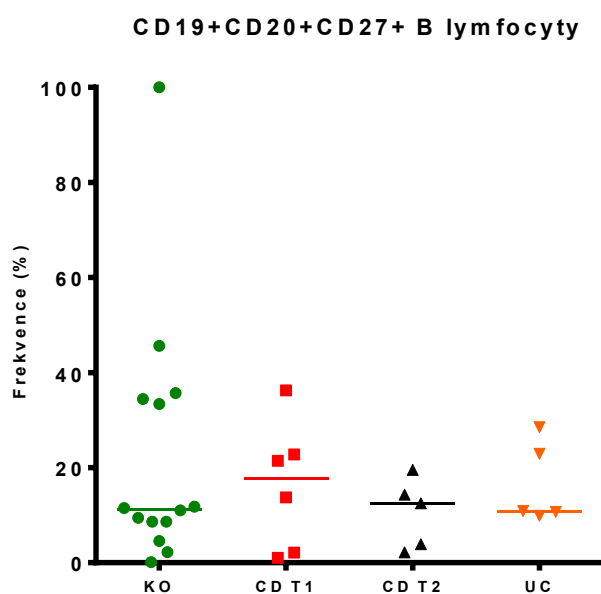
Tab. 9: Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+	KO	CD T0	CD T1	UC
	11,50	13,75	14,34	28,49
	11,77	22,79	19,54	10,89
	33,41	21,46	3,90	22,93
	34,42	2,12	2,17	9,87
	2,23	1,01	12,50	10,68
	4,56	36,27		
	11,00			
	8,65			

	100,00			
	8,65			
	45,61			
	35,68			
	9,43			
	0,14			
rozsah	0,14- 100,00	1,01- 36,27	2,17- 19,54	9,87- 28,49
95% CI	4,56-35,68	1,01- 36,27	2,17- 19,54	9,87- 28,49
median	11,25	17,61	12,50	10,89
SD	26,50	13,48	7,30	8,58

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v % .

Obrázek 15. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab .

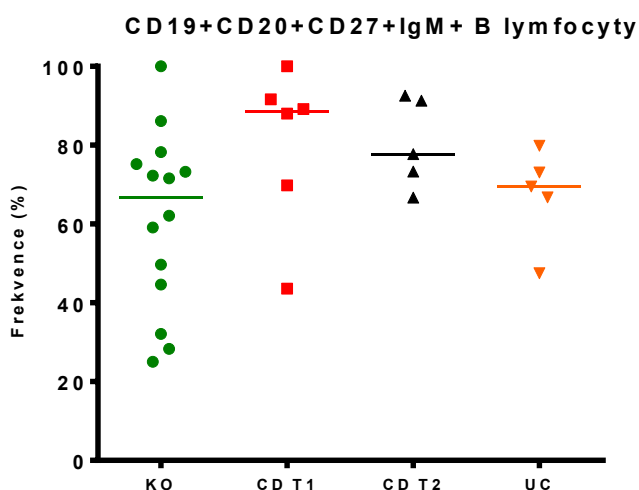
Jak je vidět z tab. 10 a obr. 16, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD opět zvýšena oproti kontrolám (medián 88,60% vs. 66,82%) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo opět k poklesu frekvence těchto B lymfocytů na 77,71%, tj. dokonce pod hladinu pozorovanou u kontrol. Avšak v případě této B buněčné populace pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk podobnou kontrolám (medián 69,59%).

Tab 10. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+IgM+	KO	CD T0	CD T1	UC
	59,13	88,01	77,71	79,83
	72,26	89,18	92,53	66,76
	32,08	43,59	66,67	69,52
	28,29	69,78	73,33	47,51
	86,12	100,00	91,32	73,06
	44,63	91,62		
	71,56			
	75,22			
	100,00			
	73,24			
	62,08			
	78,25			
	49,68			
	25,00			
rozsah	25,00-100,00	43,59-100,00	66,67-92,53	47,51-79,83
95% CI	32,08-78,25	43,59-100,00	66,67-92,53	47,51-79,83
median	66,82	88,60	77,71	69,52
SD	22,60	20,56	11,31	12,11

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v %.

Obr 16. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab.

Jak je vidět z tab. 11 a obr. 17, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD tentokrát statisticky významně snížena oproti kontrolám (medián 11,10% vs. 39,40%; p=0,0243) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo dokonce ke zvýšení frekvence těchto B lymfocytů na 22,29%. V případě této B buněčné populace pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk mírně redukovanou oproti kontrolám (medián 12,22%).

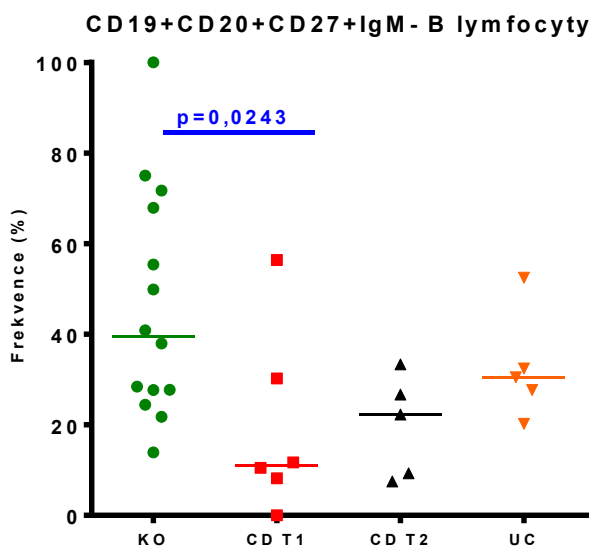
Tab 11. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁻ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+IgM-	KO	CD T0	CD T1	UC
	40,87	11,70	22,29	20,21
	27,74	10,50	7,47	32,46
	67,92	56,41	33,33	30,48
	71,71	30,22	26,67	52,49
	13,88	0,00	9,28	27,68
	55,37	8,21		
	28,44			

	24,42			
	100,00			
	27,69			
	37,93			
	21,75			
	49,89			
	75,00			
rozsah	13,88-100,0	0,00-56,41	7,47-33,33	20,2-52,49
95% CI	24,42-71,71	00,00-56,41	7,47-33,33	20,21-52,49
median	39,40	11,10	22,29	30,48
SD	25,05	20,62	11,17	12,02
	p=0,0243			

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, p – hladina významnosti, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v %.

Obr 17. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, p – hladina významnosti, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX.

Jak je vidět z tab. 12 a obr. 18, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD také zde snížena oproti kontrolám (medián 14,16% vs. 22,86%) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo dokonce ke zvýšení frekvence těchto B lymfocytů na 20,83%. V případě této B buněčné populace pacienti s UC

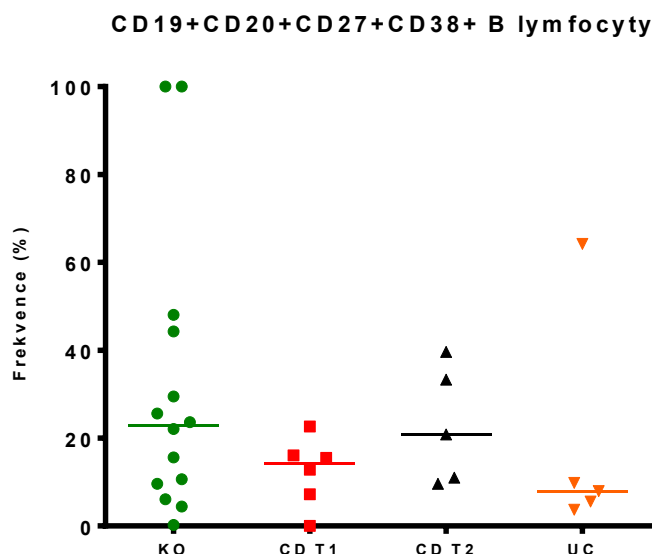
měli frekvenci těchto buněk redukovanou, dokonce pod hladinou pozorovanou u pacientů s CD před podáním anti-TNF léčby (medián 7,95%).

Tab 12. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+CD38+	KO	CD T0	CD T1	UC
	23,65	15,50	39,63	5,54
	6,09	7,21	11,00	7,95
	44,27	12,82	33,33	3,70
	29,47	22,67	20,83	9,79
	22,06	0,00	9,58	64,21
	25,62	16,09		
	4,40			
	15,60			
	100,00			
	9,61			
	10,65			
	0,22			
	48,06			
	100,00			
rozsah	0,22-100,00	0,00-22,67	9,58-39,63	3,7-64,21
95% CI	0,22-100,00	0,00-22,67	9,58-39,63	3,7-64,21
median	22,86	14,16	20,83	7,95
SD	32,27	7,87	13,34	25,80

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v % .

Obr 18. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD38⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab.

Jak je vidět z tab. 13 a obr. 19, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD24⁻CD21⁺ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD také zde snížena oproti kontrolám (medián 6,81% vs. 18,22%) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo dokonce ke zvýšení frekvence těchto B lymfocytů na 15%. V případě této B buněčné populace pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk redukovanou na úroveň kontrol (medián 16,18%).

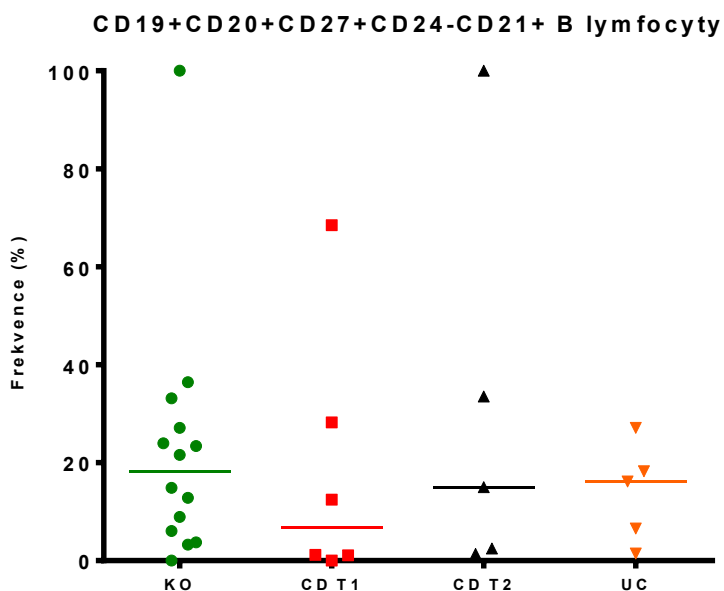
Tab 13. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD24⁻CD21⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+CD24-CD21+	KO	CD T0	CD T1	UC
	3,27	1,17	2,48	6,57
	3,72	1,10	1,38	16,18
	8,91	28,21	100,00	18,24
	27,11	12,44	15,00	27,13
	6,05	0,00	33,53	1,48
	23,97	68,48		
	14,85			
	23,40			
	100,00			
	12,81			
	21,58			
	36,43			

	33,15			
	-			
rozsah	00,00-100,00	0,00-68,48	1,38-100,00	1,48-27,13
95% CI	3,72-33,15	0,00-68,48	1,38-100,00	1,48-27,13
median	18,22	6,81	15,00	16,18
SD	25,08	26,74	40,97	10,09

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab.

Obr 19. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺CD24⁻CD21⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab.

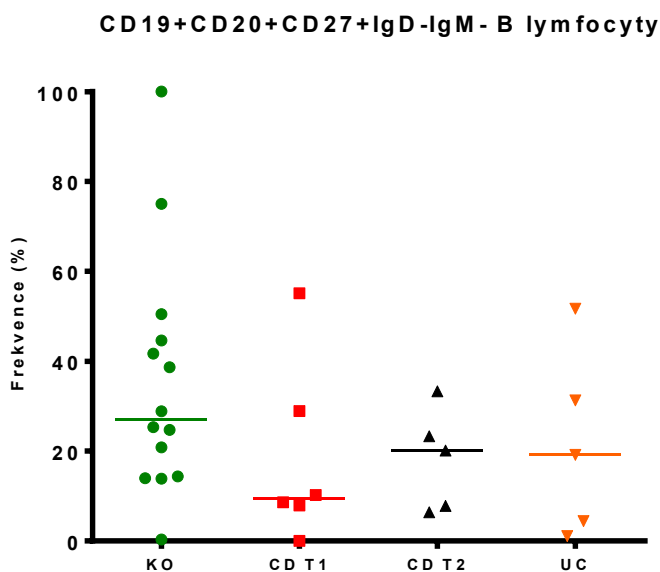
Tab 14. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁻ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.

CD19+CD20+CD27+IgD-IgM-	KO	CD T0	CD T1	UC
	38,65	10,23	20,12	19,15
	13,96	8,62	6,39	31,30
	0,33	55,13	33,33	1,11
	50,49	28,89	23,33	51,69
	13,88	0,00	7,78	4,43
	44,63	7,88		

	24,74			
	20,85			
	100,00			
	25,31			
	28,85			
	14,39			
	41,68			
	75,00			
rozsah	0,33-100,00	0,00-55,13	6,39-33,33	1,11-51,69
95% CI	13,96-50,49	0,00-55,13	6,39-33,33	1,11-51,69
median	27,08	9,43	20,12	19,15
SD	26,56	20,35	11,26	20,74

CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, KO – kontrola, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab, frekvence jsou uvedeny v %.

Obr 20. Frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁺ B lymfocytů u kontrol a pacientů s CD a UC.



CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, 95% CI – 95% confidence interval, CD – Crohnova nemoc, UC – ulcerózní kolitida, KO – kontrola, T0 = odběr krve před aplikací IFX, T1 = 2 hodiny po aplikaci IFX, IFX = Infliximab.

Jak je vidět z tab. 14 a obr. 20, frekvence CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgD⁻IgM⁻ B lymfocytů byla u pacientů s aktivní formou CD také zde snížena oproti kontrolám (medián 9,43% vs. 27,08%) a zajímavé zjištění je, že 2 hodiny po podání Infliximabu došlo dokonce ke zvýšení frekvence těchto B lymfocytů na 22,12%. V případě této B buněčné populace pacienti s UC měli frekvenci těchto buněk redukovanou pod úroveň kontrol (medián 19,15%).

6 DISKUSE

Práce byla zaměřena na studium dosud velmi málo probádané $CD27^+$ frakce periferních $CD19^+$ B lymfocytů. Jak je vidět na obr. 14-16, výchozí $CD19^+CD27^+$ populace paměťových B lymfocytů stejně jako obě její subpopulace $CD19^+CD20^+CD27^+$ a $CD19^+CD20^+CD27^+IgM^+$ (tzv. klasické paměťové B lymfocyty ve smyslu definice dle Kleina, Klein et al. 1998) byly detekovány vždy ve zvýšených frekvencích oproti kontrolám. To je plně v souladu s tím, že pacienti s CD byli všichni neléčení a u všech se jednalo o klinicky potvrzené aktivní stádium nemoci.

Jeden z velmi zajímavých nálezů lze objevit při bližším hodnocení výsledků, kdy je vidět, že při použití pouze dvou znaků, tj. $CD19$ a $CD27$, také pacienti s UC mají frekvenci těchto B buněk zvýšenou oproti kontrolám (obr.14). Avšak přidání aktivačního znaku $CD20$ vede k odlišení pacientů s CD od UC, kdy pacienti s UC se svým profilem neodlišují od kontrol a frekvence B buněčné subpopulace je prakticky stejná jako u kontrol (obr.15). Pokud je však do imunofenotypizace přidán ještě další marker, v tomto případě IgM , pak rozlišení pacientů s CD a UC je ještě více patrné (obr. 16). To může znamenat, že jednak bude možné využít průtokovou cytometrii k diferenciální diagnostice CD a UC a UC představuje jiný typ IBD pravděpodobně s jiným mechanismem patogeneze a jedná se tedy skutečně o jinou klinickou jednotku také na bázi buněčné. Dalším výstupem je skutečnost, že je třeba používat více markerů k postižení rozdílů, které ve výchozí „makropopulaci“ prostě zjistit nelze.

U všech třech populací u pacientů s CD došlo 2 hod. po intravenózní aplikaci Infiximabu k poklesu jejich frekvencí v periferní krvi, což znamená, že naši metodu lze použít k monitorování odpovědi na podaný lék. Nejzajímavější je tento nález z hlediska farmakokinetiky, neboť reakce v tomto případě vlastně systémová, se odehrává v řádu hodin. Zde by bylo vhodné doplnit data o analýzu periferní krve v dalších časových intervalech (po 4, 6 a 8 hod. od podání léku), což však naráží na etické problémy a neochotu pacientů zůstat delší dobu ve zdravotnickém zařízení.

U dalších analyzovaných $CD27^+$ B buněčných subpopulací, $CD19^+CD20^+CD27^+CD38^+$, $CD19^+CD20^+CD27^+CD24^-CD21^+$ a $CD19^+CD20^+CD27^+IgD^-IgM^-$ byly jejich frekvence

v periferní krvi deprivovány ve srovnání s redukované (obr. 17-20). U populace **CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁻** B buněk tato redukce byla dokonce statisticky významná.

Po podání anti-TNF preparátu se frekvence všech čtyřech subpopulací zvýšila, což představuje naprosto odlišnou reakci od popsané pro výše uvedené paměťové B lymfocyty. Vzhledem k tomu, že pro lidské CD27⁺ B lymfocyty neexistují žádná data, je obtížné uvést nějaké vysvětlení. Jedním by mohl být fakt, že kombinace znaků umožnila detekovat neznámé subsety CD27⁺ B lymfocytů, které navzdory přítomnosti molekuly CD27 mohou stát v maturačně-diferenčním diagramu jinde než klasická efektorová/aktivovaná stádia a mohly by dokonce představovat také stádia méně zralá. Pak by mohly mít určitý kompenzační význam, kdy by doplňovaly vyčerpaný imunitní systém díky persistentnímu zánětu v tenkém střevě, kdy periferní B lymfocyty buď odcestovaly z periferie do místa zánětu, nebo byly díky němu deprivovány (a proto se vyskytují v nízkých frekvencích), případně tyto procesy by mohly probíhat současně. Po podání anti-TNF preparátu je pak buď migrace inhibována nebo deprivace přerušena (anebo obojí) a frekvence těchto B buněk se opět zvyšuje. Otázkou zůstává, jakou funkci plní a jak je to s jejich aktivačně-diferenčním stavem. Také pro tento typ buněk platilo, že pacienti s UC vykazovaly expresní vzor podobný kontrolám.

Tato naše tvrzení bude ještě nutné potvrdit, do probíhajících analýz budou zahrnuti ještě další pacienti s CD a UC (a pacienti s dalšími imunopatologiemi) a bude třeba se také zabývat kombinacemi s dalšími znaky v rámci našeho 11-ti barevného panelu. S jistotou však můžeme říci, že CD27⁺ B buněčná subpopulace představuje velmi heterogenní buněčné prostředí.

B lymfocyty hrají roli v různých (imuno)patologiích prostřednictvím kombinace mechanismů na protilátkách dependentních a independentních, tyto procesy zahrnují např. prezentaci antigen, regulaci T lymfocytů, podíl na genezi lymfoidních orgánů a produkci cytokinů (*Manjarrez-Orduno et al. 2009*). Tato funkční diversita je u lidí velmi málo prozkoumána a patogenní nebo protektivní působení B lymfocytů je pak výsledkem nerovnovážného působení určitého subsetu B buněk.

Navíc, rozlišení funkčních nebo maturačně aktivačních stádií B buněk je v podstatě většinou omezeno na IgD, CD27, CD38 a CD24 a následné definování hlavních obecně přijímaných

populace transientních, naivních, paměťových a plazmablastických stádií (*Wei et al. 2011*). To vede k tomu, že nejsme schopni v rámci konvenčních subsetů differencovat četné populace s jinými funkčními vlastnostmi. V tomto kontextu je velkým přínosem, protože kombinace více než pěti znaků povede k jemnějšímu rozlišení jinak v podstatě “neviditelných” nízkofrekvenčních subsetů (s frekvencemi v řádu po jednu desetinu procenta a níže).

V současné době je používáno rozdělení periferních CD19⁺ B lymfocytů na základě kombinace znaků IgD/CD27 (*Klein et al 1998, Kaminsky et al. 2012*). Z IgD⁻ frakce jsou pak vymezovány plazmablasty jako CD27⁺⁺CD38⁺⁺, transientní CD27⁺⁺CD38⁺⁺ B buňky z frakce CD27⁺IgD⁺ a z CD27⁺ frakce paměťové B lymfocyty (*Sims et al. 2005, Palanichamy et al. 2009, Klein et al. 1998, Klein et al. 1997, Weller et al. 2004, Dogan et al. 2009*).

Dalším subsetem B lymfocytů, který svým způsobem představuje recentní “top téma”, jsou regulační B lymfocyty - tzv. Breg lymfocyty. Také zde se kromě obecně přijímaného Breg-specifického markeru cytokinu IL-10 setkáváme s různými subtypy buněčnými populací: naivní IgD⁺CD27⁻, transientní CD24^{hi}CD38^{hi}, B10 CD24^{hi}CD27⁺, B1orc CD11b⁺, CD1d^{hi}CD5⁺ (*Iwata et al. 2011, Griffin et al. 2008, Bosma et al. 2012*).

V současné době je velmi málo ne-li téměř žádná, která by se zabývala CD19⁺CD20⁺CD27⁺ B lymfocyty a CD27⁺ populace paměťových buněk je vlastně neprostudovaná. Situace je ještě komplikována tím, že u myši „pool“ paměťových B lymfocytů není definován přítomností této molekuly a jedná se o ryze lidský specifiku. U myši v podstatě neexistují markery specifické pro paměťové B buňky a pouze existují studie indikujícíže myši CD38^{low} a CD38^{high} imunofenotypu jsou specifické pro izotypově přepnuté B buňky germinálních center a B buňky paměťového typu (*Agematsu et al. 1998, Klein et al. 1998, Tangye et al. 1998*). Naopak u lidí je 30-50% všech CD19⁺ B buněk periferní krve CD27 pozitivní (*Klein et al 1998*). Jedna z recentních studií přinesla experimentální důkaz, že pacienti s kolorektálními nádory mají v periferní krvi dokonce vyšší frekvence CD27+IgD⁻ B lymfocytů než zdravý jedinci, což autoři vysvětlují imunitní odpovědí specificky namířenou proti nádoru (*Jahrsdörfer et al. 2014*).

Z mnoha těchto studií při jejich studiu vyplývá, že přidá-li se nebo vynechá některý z markeru, znamená to, že je prováděna analýza úplně odlišné subpopulace s diferentními biologickými vlastnostmi a funkcemi na jedné straně a na druhé straně se opakovaně potvrzuje, že CD19⁺ B lymfocyty představují vnitřně velmi heterogenní buněčné prostředí.

Polychromatická průtoková cytometrie použitím např. až dvaceti markerů v jednom a téže vzorku umožní podchytit přítomnost/absenci raritních buněčných populací a následnou multidimenzionální analýzou získaných dat bude možné podchytit nejen jemné změny v zastoupení či frekvencích, ale také vzájemné souvislosti a propojení mezi nimi za fyziologického stavu a za patologických podmínek.

7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na detailní charakterizaci CD27⁺ B buněčných subpopulací definovaných na základě použití 11 povrchových markerů a polychromatické průtokové cytometrie v souboru zdravých jedinců a pacientů s aktivní neléčenou Crohnovou chorobou a ulcerativní kolitidou. Klasicky definované populace paměťových B lymfocytů jako jsou CD19⁺CD27⁺, CD19⁺CD20⁺CD27⁺ a CD19⁺CD20⁺CD27⁺IgM⁺ byly u pacientů s CD přítomné vždy ve zvýšených frekvencích oproti kontrolám, což odpovídá aktivnímu neléčenému stadiu choroby.

Nejzajímavějším nálezem je snížení frekvencí těchto subpopulací 2 hodiny po podání anti-TNF preparátu, což znamená, že lze odpověď na léčbu monitorovat a navíc je to přímý důkaz aktivity a účinnosti anti-TNF léčby.

Kromě toho pacienti s ulcerózní kolitidou vykazovaly vždy imunofenotyp sledovaných B buněčných populací odlišný od obrazu přítomného u Crohnovy choroby.

Tato práce byla koncipována jako pilotní studie a zpracování dat od dalších pacientů s Crohnovou chorobou a dalších imunopatologií včetně korelačních analýz dále pokračují.

Je plánována příprava publikace v impaktovaném časopise a prezentace na zahraničním kongresu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbas, A.K., (ed.). (2009): Cellular and mollecular biology. 3th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier.

Adan, A., Alizada, G., Kiraz,Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2016): Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol. Jan 14:1-14.

Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., et al. (1997): B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+B cells and helper T cells in immunoglobulin production. Eur J Immunol. 27: 2073-2079.

Agematsu, K., Nagumo, H., Shinozaki, K., Hokibara, S., Yasui, K., Terada, K., Kawamura, N., Toba, T., Nonoyama, S., Ochs, H.D., Komiyama, A.(1998): Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. J Clin Invest.102:853-860.

Ahmed, R., Gray, D. (1996): Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. 272:54-60.

Aigner, S., Stoeber, Z.M., Fogel, M., Weber, E., Zarn, J., Ruppert, M., Zeller,Y., Vestweber, D., Stahel, R., Sammar, M., Altevogt, P. (1997): CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cell. Blood. 89:3385-3395.

Allen, C.D., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., Cyster, J.G. (2004): Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nature Immunol. 5:943–952.

Alberts, B., Bray, D. Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998): Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell. Garland.

Alessio, M., Roggero, S., Funaro, A., De Monte, L.B., Peruzzi, L., Geuna, M., Malavasi, F. (1990): CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. J Immunol. 145:878-884.

Allman, D.M., Ferguson, S.E., Cancro, M.P. (1992): Peripheral B cell maturation. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenic and exhibit unique signaling characteristics. *J Immunol.* 149:2533–2540.

Allman, D.M., Lindsley, R.C., De Muth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R. (2001): Resolution of free non proliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol.* 167:6834–6840.

Anderson, K.C., Bates, M.P., Slaughenhaupt, B.L., Pinkus, G.S., Schlossman, S.F., Nadler, L.M. (1984): Expression of human B cell associated antigens on leukemias and lymphomas: A model of human B cell differentiation. *Blood.* 63:1424-1433.

Arakawa, H., Hauschild, J., Buerstedde, J.M. (2002): Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. 295:1301-1306.

Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., Mc Shane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S. (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. 31:315-324.

Asokan, R., Banda, N.K., Szakonyi, G., Chen, X.S., 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.* 53:99-110.

Attanavanich, K., Kearney, J.F. (2004): Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *Immunol.* 172:803-811.

Bartůňková, J., Paulík, M. a kolektiv (2011): *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, Praha.

Baron, B.W., Anastasi, M.J., Thirman, Y., Furukawa, S.F., Kim, D.C., Simone, F., Birkenbach, M., Montag, A., Sadhu, A., Zeleznik-Le, N., et al. (2002): The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:2860-2865.

- Benitez, A., Weldon, A.J., Tatosyan, L., Velkuru, V., Lee, S., Milford, T.A., et al. (2014): Differences in mouse and human nonmemory B cell pools. *J Immunol.* 192: 4610-4619.
- Bransteitter, R., Sneed, J.L., Allen, S., Pham, P., Goodman, M.F. (2006): First AID (activation-induced cytidine deaminase) is needed to produce high affinity isotype-switched antibodies. *J Biol Chem.* 281:16833-16836.
- Brody, N.I., Walker, J.G., Siskind, G.W. (1967): Studies on the control of antibody synthesis. Interaction of antigenic competition and suppression of antibody formation by passive antibody on the immune response. *J Biol Chem.* 242:81-91.
- Borst, J., Hendriks, J., Xiao, Y., et al. (2005): CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *J Immunol.* 175:275-281.
- Buchan, G., Barrett, K., Turner, M., Chantry, D., Maini, R.N., Feldmann, M. (1988): Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *J Rheumatol.* 15:449-455.
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W.A.M., Borst, J., 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: 3165-3169.
- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., et al. (2001): The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity.* 14:603-615.
- Carsetti, R., Koehler, G., Lamers, M.C. (1995): Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med.* 181:2129-2140.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., Wardmann, J. (2004): Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 197:179-191.
- Carter, R.H., Barrington, R.A. (2004): Signaling by the CD19/CD21 complex on B cells. *Curr Dir Autoimmun.* 7:4-32.

Casellas, R., Jankovic, M., Meyer, G., Gazumyan, A., Luo, Y., Roeder, R., Nussenzweig, M. (2002): OcaB is required for normal transcription and V(D)J recombination of a subset of immunoglobulin kappa genes. *110:575-585*.

Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W. Jr, Cyster, J.G. (2008): Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol. 9:54–62*.

Coffey, F., Alabyev, B., Manser, T. (2009): Initial clonal expansion of germinal center B cells takes place at the perimeter of follicles. *Immunity. 30:599-609*.

Corcoran, L.M. a Karvelas, M. (1994): Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity. 8: 635-645*.

Claus, C.H., Riether, C., Schürch, C.H., Matter, M.S., Hilmenyuk, T., Ochsenbein, A.F. (2012): CD27 signaling increases the frequency of regulatory T cells and promotes tumor growth. *Cancer Res. 12:3664-3676*.

Desmond, R., Townsley, D.M., Dumitriu, B., Olnes, M.J., Scheinberg, P., Bevans, M. et al. (2014): Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. *Blood. 123:1818–1825*.

de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G., MacLennan, I.C. (2000): Germinal centers without T cells. *J Exp Med. 191:485-494*.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., Papavasiliou, N.F. (2003): AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med. 197:1291-1296*.

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., et al. (2009): Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol. 10:1292–1299*.

Doležal, J. (2007): Flow cytometry with plant cells : analysis of genes, chromosomes and genomes. Weinheim: Wiley-VCH. 454 p. ISBN 9783527314874.

Eichhorn, M.S., Granoff, D.M., Hahn, M.H., Shackleford, P.G. (1987): Concentrations of antibodies in paired maternal and infant sera: Relationship to IgG subclasses. *J Pediatr. 111: 783-788*.

Ehrhardt, G.R., Davis, R.S., Hsu, J.T., Leu, C.M., Ehrhardt, A., Cooper, M.D. (2003): The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 13489-13494.

Ehrhardt, G.R., Hsu, J.T., Gartland, C.M., Leu, C.M., Zhang, S., Ehrhardt, A., Davis, R.S., Cooper, M.D. (2005): Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *202:783-791*.

Fearon, D.T. a Carroll, M.C. (2000): Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annual review of immunology*. 18:393-422.

Feldtkeller, E., Khan, M.A., van der Heijde, D., van der Linden, S., Braun, J. (2003): Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. Positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology international*. 23:61–66.

Ferguson, A.R., Youd, M.E., Corley, R.B. (2004): Marginal zone B cells transport and deposit IgMcontaining immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol*. 16:1411–1422.

Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y. (2005): *Imunitní systém; informace pro každého*. 1. české. vyd. Praha, Grada Publishing.

Flemming, W. (1885): Studien über Regeneration der Gewebe. *Arch mikr Anat*. 24:50-97.

Franke, A., Niederfellner, G.J., Klein, C., Burtscher, H. (2011): Antibodies against CD20 or B-cell receptor induces similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *PLoS One*. 6: e16596.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., et al. (1997): Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med*. 186:439-448.

Furukawa, K., Akasako-Furukawa, A., Shirai, H., Nakamura, H., Azuma, T. (1999): Junctional amino acids determine the maturation pathway of an antibody. *11:329-338*.

Gravestien, L.A., Blom, B., Nolten, L.A., de Vries, E., van der Horst, G., Ossendorp, F., Borst, J., Loenen, W.A. (1993): Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1BB, another lymphocyte specific member of the nerve growth factor receptor family. *Eur J Immunol*. 23:943-950.

Hamze, M., Desmetz, C., Guglielmi, P. (2013): B cell-derived cytokines in disease. *Eur Cytokine Netw.* 24:20-26.

Han, B.K., Olsen, N.J., Bottaro, A. (2016): The CD27-CD70 pathway and pathogenesis of autoimmune disease. 45:496-501.

Hašek, M., Holáň, V. (1988): *Buněčné a molekulární základy specifické imunity*, Academia, Praha.

Healy, J. I., Dolmetsch, R. E., Timmerman, L. A., Cyster, J. G., Thomas, M. L., Crabtree, G. R., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. (1997): Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity.* 6:419-428.

Henniker, A.J. (2001): Cd24. *J Biol Regul Homeost Agents.* 15:182–184.

Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldmann, M., et al. (1988): Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. 18:1797-1801.

Horst, A., Hunzelmann, N., Arce, S., Herber, M., Manz, R.A., Radbruch, A., Nischt, R., Schmitz, J., Assenmacher, M. (2002): Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE⁺ plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clin Exp Immunol.* 130:370-837.

Horikawa, K., Kaku, H., Nakajima, H., Davey, H.W., Hennighausen, L., Iwamoto, I., Yasue, T., Kariyone, A., Takatsu, K. (2001): Essential role of Stat5 for IL-5-dependent IgH switch recombination in mouse B cells. 167:5018-5026.

Hořejší, V., Bartůňková, J. (1998): *Základy imunologie*, TRITON, 120-123.

Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdička, T., Špišek, R. (2013): *Základy imunologie*, Triton, Praha.

Hoyer, B.F., Moser, K., Hauser, A.E., Peddinghaus, A., Voigt, C., Eilat, D., Radbruch, A., Hiepe, F., Manz, R.A. (2004): Short lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. 199:1577-1584.

Ise, W., Kohyama, M., Schraml, B.U., Zhang, T., Schwer, B., Basu, U., Alt, F.W., Tang, J., Oltz, E.M., Murphy, T.L., et al. (2011): The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *12*:536-543.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., et al.(2011): Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*.117:530–541.

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., Weiss, U. (1991): Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 354:389–392.

Jahrsdörfer, B., Lindner, S., Hagn, M., Schrezenmeier, H. (2014):nCD27(+)IgD(-) B cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients: on anti-tumor or tumor-protective mission? *Oncoscience*.1:558-559.

Janeway, C. A., Jr. (ed.). (2005): *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th ed. Garland Publishing.

Jiménez-Balderas, F.J., Mintz, G. (1993): Ankylosing spondylitis: clinical course in women and men. *J Rheumatol*. 20:2069–2072.

Jung, J., Choe, J., Li, L., Choi, Y.S.,(2000): Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: the pivotal role of IL-10. *Eur J Immunol*. 30:2437-2443.

Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, T., Kawai, T., Nomura, F., Terada, N., et al. (2001): IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J Exp Med*. 193:417-426.

Kaminski, D., Wei, C., Rosenberg, A., Lee, F.E-H., Sanz, I. (2012): Multiparameter flow cytometry and bioanalytics for B cell profiling in systemic lupus erythematosus. In: Perl, A. editor. *Autoimmunity*, vol. 900. New York: HumanaPress. p. 109–134.

Kaminski, D.A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A.F., Sanz, I. (2012): Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol*.3:302.

Katoh, M. (2005): Human FOX gene family (Review). *Int. J. Oncol*. 25:1495-1500

Kay, R., Rosten, P.M., Humphries, R.K. (1991): CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol.* 147:1412- 1416.

Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K. (1997): Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood.*89:1288–1298.

Klein, U., Rajewsky, K., 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.*188:1679–1689.

Klein, U., Rajewsky, K., Küppers, R. (1998): Human immunoglobulin IgM+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. 188:1679-1689.

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R. (2006): Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol.* 7:773-782.

Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Rev. Immunology.* 8:22-33.

Kohout, P., Pavlíčková, J.(2006): Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, FORSAPI, Praha.

Komori, T. (2005): Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem.* 95:445-453.

Kuo, T.C., Shaffer, A.L., Haddad, Jr. J., Choi, Y.S., Staudt, L.M., Calame, K. (2007): Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *J Exp Med.* 204: 819-830.

Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. (1993): Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Exp Med Biol J.* : 4955-4967.

Krejsek, J., Kopecký, O. (2004): *Klinická imunologie*, NUCLEUS HK, 241-270.

Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., et al. (2008): Instructive Role of the Transcription Factor E2A in Early B Lymphopoiesis and Germinal Center B Cell Development. *Immunity*. 28:751-762.

Lam, K.P., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1997): In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*. 90:1073–1083.

Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000): Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. 290:92-97.

Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2002): Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nature Rev. Immunol.* 2:982–987.

Lee, C.H., Melchers, M., Wang, H., Torrey, T.A., Slota, R., Qi, Ch.F., Kim, J.Y., Lugar, P., Kong, H.J., Farrington, L., et al. (2006): Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. 203:63-72.

Locasciulli, A., Oneto, R., Bacigalupo, A., et al. (2007): Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 92:11–18.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., 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*. 190:75–89.

Loftus, E. V., Silverstein, M. D., Sandborn, J. W., Tremaine, W. j., Harnsen, W. S., Zeinsmaier, A. R. (1998): Crohn's disease in Olmsted Country, Minesota: Incidence, prevalence, and survival. *Gastroent.* 114:1940-1993.

Lopes-Carvalho, T., Kearney, J.F. (2004): Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 197:192–205.

Lukáš, K., a kol (1999): Idiopatické střevní záněty, TRITON, Praha.

Lukáš, K., Žák, A., a kol. (2007): Gastroenterologie a hematologie, Grada publishing, Praha.

Lyons, R., Narain, S., Nichols, C., Satoh, M., Reeves, W.H. (2005): Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann NY Acad.* 1050:217-228.

Macey, M.G. (2007): *Flow Cytometry: Principles and Applications*, Totowa, N.J: Humana Press, 294.

Mačák, J., Mačáková, J., Dvořáčková, J. (2012): *Patologie*, Grada publishing, a.s., Praha.

Male, D. (2006): (ed.) *Immunology*, 7th ed. Edinburgh, Mosby.

Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I. (2006): *Immunology*. (7th ed.), Edinburgh, Mosby.

Maloney, D. G., Grillo-López, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., Levy, R. (1997): IDEC-C2B8 (Rituximab) – anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma, *Blood*. 90:2188-2195.

Mamula, P., Markowitz, J. E., Baldassan, R. N. (2013): *Pediatric Inflammatory Bowel Disease*, Springer, New York.

Manjarrez-Orduno, N., Quach, T.D., Sanz, I. (2009): B cells and immunological tolerance. *J Invest Dermatol.* 129:278–288.

Mansson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., et al. (2007): Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*. 26:407-419.

Marinova, E., Han, S., Zheng, B. (2007): Germinal center helper T cells are dual functional regulatory cells with suppressive activity to conventional CD4+ T cells. 178: 5010-5017.

Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F. (2001): Marginal zone and B-1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 14:617-629.

Mařatka, Z. (1990): Nové poznatky o patogenezi nespecifických střevních zánětů, *Mechanismy tkáňového poškození, Československá gastroenterologie a výživa*.

Mauri, C., Bosma, A. (2012): Immune regulatory function of B cells. *Ann rev Immunol*. 30:221-241.

MacLennan, I.C. (1994): Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol*. 12:117–139.

McHeyzer-Williams, L.J., Malherbe, L.P., McHeyzer-Williams, M.G. (2006): Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunol Rev*. 211:255-268.

Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I., Brieva, J.A. (2002): The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 99:2154-2161.

Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gaul, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wyszocki, L.J., Cambier, J.C. (2006): Identification of Anergic B Cell within a Wild-Type Repertoire. *Immunity*. 25:953-962.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T. (2000): Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553–563.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2007): *Janeway's Immunobiology* 7th edition, Garland Pub, New York.

Mourek, J. (2012): *Fyziologie*, Grada publishing, a.s., Praha.

Molnar, A., Georgopoulos, K. (1994): The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 14(12):8292-8303.

Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., et al. (1997): Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *Exp Med Biol J*. 16:2004-2013.

Nutt, S.L. a Kee, B.L. (2007): The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 26:715-725.

Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dörfler, P., Rolink, A., Busslinger, M. (1998): Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Exp Med Biol J*. 7: 2319-2333.

O'Riordan, M., Grosschedl, R. (1999): Coordinate Regulation of B Cell Differentiation by the Transcription Factors EBF and E2A. 11:21-31.

Paramithiotis, E., Cooper, M.D. (1997): Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:208-212.

Payne, K.J., Dovat, S. (2011): Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia, *Crit Rev Oncog*. 16:3-12.

Petterson, H., et al. (1995): A global textbook of radiology, The NICER Institute, Oslo.

Pillai, S., Cariappa, A., Moran, S.T. (2005): Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. 3:161-196.

Pillai, S., Cariappa, A. (2009): The follicular versus margine zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 9: 767-777.

Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., Cogné, M. (2001): Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. 15: 187-199.

Polák, M. (2014): Imunofenotypové rozdíly v B-lymfocytárních populacích „non-memory” B-lymfocytů u zdravých kontrol a pacientů s imunopatologiemi, Praha.

Rahman, M. (2006): Introduction to flow cytometry, BioRad, Oxford.

Ramakrishnan, P., Wang, W., Wallach, D. (2004): Receptor-Specific Signaling for Both the Alternative and the Canonical NF- κ B Activation Pathways by NF- κ B-Inducing Kinase. *Immunity*. 21: 477-489.

- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., et al. (2000): Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 102: 565–575.
- Reya, T., O’Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., Grosschedl, R. (2000): Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. 13:15-24.
- Riether, C., Schürch, CH., Ochsenbein, A.F. (2012): Modulating CD27 signaling to treat cancer. *Oncoimmunology*. 1:1604-1606.
- Robinson, J. P. (1997): *Current protocols in cytometry*, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-16131-4, New York.
- Roessler, S., Gyory, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M et al. (2007): Distinct promoters mediate the regulation of *Ebfl* gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol Cell Biol*. 27: 579-594.
- Saijo, K., Schmedt, C., Su, I.H., Karasuyama, H., Lowell, C.A., Reth, M., et al., (2003): Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- κ B activation during B cell development. *Nat Immunol*. 4:274-279.
- Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A.L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J.B., Nussenzweig, M. (1993): Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. 178:1049-1055.
- Seifert, M., Küppers, R. (2009): Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. 206:2659-2669.
- Seshi, B., Kumar, S., Sellers, D. (2000): Human bone marrow stromal cell: Coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis*. 26:234-246.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A. (2011): Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 61:212-236.

- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., Lipsky, P.E. (2005): Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*.105:4390–4398.
- Sinha, A.A., Lopez, M.T., McDevitt, H.O. (1990): Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *4961*:1380-1388.
- Su, T.T., Rawlings, D.J. (2002): Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol*.168:2101-1210.
- Su, T.T., Guo, B., Wei, B., Braun, J., Rawlings, D.J. (2004): Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev*.197:161-178.
- Shapiro, H. M. (2003): Practical flow cytometry, 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 681 p. ISBN 0471411256.
- Schebesta, M., Pfeffer, P.L., Busslinger, M. (2002): Control of pre-BCR signaling by Pax-5 dependent activation of the BLNK gene. *Immunity*. 17:473-485.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvaggio, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., Busslinger, M. (2007): Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *27*:49-63.
- Scheeren, F.A., Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., et al. (2000): STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol*. 56:303-313.
- Schmölmerlich, J., a kol. (1998): *Ulcerózní kolitida Crohnova choroba*, Falk Foundation e. V., Freiburg.
- Schreiber, S., Wedel, S. (1997): Diagnosis and treatment of anemia in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*. 3:204-216.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., Singh, H. (1994): Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages *Science*. 265: 1573-1577.

Smith, K.G., Light, A., O'Reilly, L.A., Ang, S.M., Strasser, A., Tarlinton, D. (2000): bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J Exp Med.*191:475-484.

Stavnezer, J., Schrader, C.E. (2006): Mismatch repair converts AID-instigated nicks to doublestrand breaks for antibodyclass-switch recombination. *Trends Genet.* 22:2338.

Stavnezer, J., Guikema, J. E.J., Schrader C.E. (2008): Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev.Immunol.* 26:261-292.

Strubin, M., Newell, J.W., Matthias, P. (1995): OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamerbinding proteins. *80:* 497-506.

Stříž, I., Holář, V. (2015): *Cytokiny v klinické medicíně*, Maxdorf jessenius, Praha.

Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., de Vries, J.E.(1998): Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27.*J Exp Med.*188:1691-703.

Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B., Shaughnessy, J. Jr. (2003): Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *102:*592-600.

Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., Farris, D.A. (2007): Cutting edge: transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *J Immunol.* 178:7511-7515.

Tedder, T.F., Streuli, M., Schlossman, S.F., Saito, H.(1988): Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1):208–212.

Teng, G., Papavasiliou, F.N. (2007): Immunoglobulin Somatic Hypermutation. *Annu. Rev. Genet.* 41: 107–120.

Tierens, A., Delabie, J., Michiels, L., Vandenberghe, P., De Wolf-Peeters, C. (1999): Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *93:*226-234.

Timens, W., Boes, A., Poppema, S. (1989): Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *Eur J Immunol.*19:2163-2166.

Tonnelle, C., et al. (2009): Stage specific over-expression of the dominant negative Ikaros 6 reveals distinct role of Ikaros throughout human B-cell differentiation. *Mol Immunol* :46(8-9):1736-1743.

Turner, C.A. Jr., Mack, D.H., Davis, M.M. (1994): Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *77*:297-306.

Turvey, S. E., Broide, D. H. (2010): Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125:24-32.

van Furth, R., Schuit, H. R. E., Hijmans, W. (1965): The immunological development of human fetus. *J Exp Med.* 122:1173-1188.

Vasanwala, F.H., Kusam, S., Toney, L.M., Dent, A.L. (2002): Repression of AP-1 Function: A Mechanism for the Regulation of Blimp-1 Expression and B Lymphocyte Differentiation by the B Cell Lymphoma-6 Protooncogene. *J Immunol.* 169:1922-1929.

Venkitaraman, A.R., Williams, G.T., Dariavach, P., Neuberger, M.S. (1991): The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *352*:777-781.

Virella, Gabriel. (2001): *Medical Immunology. 5. Vyd, New York, Basel* : Marcel Dekker. ISBN 0-8247-0550-5.

Vlková, M., Fronková, E., Kanderová, V., Janda, A., Ruzicková, S., et al. (2010): Characterization of lymphocyte subsets in patients with common variable immunodeficiency reveals subsets of naive human B cell marked by CD24 expression. *J Immunol.* 185: 6431-6438.

Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N., Carsetti, R. (2002): B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med.* 195:771-780.

Weil, G. J., Hussain, R., Kumaraswami, V., Tripathy, S. P., Phillips, K. S., Ottesen, E. A. (1983): Prenatal allergic sensitization to helminth antigens in offspring of parasite infected mothers. *71:1124-1129.*

Wei, C., Jung, J., Sanz, I. (2011): phenotypic analysis of human memory B cells. *Cytometry A. OMIP-003.79A:894–896.*

Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., et al. (2004): Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *104:3647-3654.*

Wiles, N., Symmons, D.P.M., Harrison, B., Barret, E., Barret, J.H. (1999): Estimating the incidence of rheumatoid arthritis. *42:1339-1346.*

Yeramilli, V.A., Knight, K.L.(2011): Somatically diversified and proliferating transitional B cells: implications for peripheral B cell homeostasis. *186:6437-6444.*

Zhou, L.J., Ord, D.C., Hughes, A.L., 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. 147:1424–1432.*

Zhou, J.X., Lee, C.H., Qi, C.F., Wang, H., Naghashfar, Z., Abbasi, S. (2009): 3rd. IFN regulatory factor 8 regulates MDM2 in germinal center B cells. *J Immunol. 183:3188-3194.*

Zwollo, P., Arrieta, H., Ede, K., Molinder, K., Desiderio, S., Pollock, R. (1999): The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cellevlopment. *J Biol Chem. 72:10160-10168.*