

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Ústav imunologie

**BUNĚČNÁ IMUNITA, JEJÍ SLOŽKY, VÝZNAM PRO FUNKCI
ORGANISMU. METODY K POSOUZENÍ STAVU BUNĚČNÉ
IMUNITY. POUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PŘI
DIAGNOSTICE HYPER IGM SYNDROMU.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MUDr. Aleš Janda, MSc.

Praha 2007

Alena Potměšilová

Obsah

Seznam zkratk.....	5
Souhrn.....	8
1. Teoretická část.....	9
1. 1 Imunitní systém.....	9
1. 1. 1 Lymfatické tkáně a orgány.....	9
1. 1. 2 Molekuly imunitního systému.....	9
1. 1. 3 Buněčná složka imunitního systému.....	10
1. 2 Buňky imunitního systému.....	11
1. 2. 1 NK buňky.....	11
1. 2. 2 B lymfocyty.....	11
1. 2. 3 T lymfocyty.....	12
1. 2. 4 Fagocyty.....	13
1. 3 Imunodeficience	14
1. 3. 1 Primární imunodeficity.....	14
1. 3. 1. 1 Těžké kombinované defekty imunity (SCID).....	14
SCID T-B-.....	14
SCID T-B+.....	15
Ommenův syndrom.....	15
DiGeorgeův syndrom.....	15
1. 3. 1. 2 Funkční poruchy T lymfocytů.....	15
Aktivační poruchy T lymfocytů.....	16
Syndrom hyper-IgM.....	16
Poruchy v antigenní prezentaci.....	18
1. 3. 1. 3 Poruchy fagocytózy.....	18
Poruchy v počtu neutrofilů.....	18
Poruchy ve funkci fagocytujících buněk.....	19
Humorální imunodeficiencie.....	19
1. 3. 2 Sekundární imunodeficity.....	20
1. 4 Možnosti stanovení.....	21
1. 4. 1 Izolace buněk.....	21

1. 4. 1. 1 Gradientová centrifugace.....	21
1. 4. 1. 2 Izolace T lymfocytů pomocí rozet.....	21
1. 4. 1. 3 Imunomagnetická selekce buněk.....	22
1. 4. 2 Blastická transformace (proliferace lymfocytů).....	22
1. 4. 3 ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay).....	23
1. 4. 4 Stanovení aktivity cytotoxických buněk.....	23
1. 4. 5 Fagocytóza.....	23
1. 4. 6 Baktericidní test.....	24
1. 4. 7 Testy oxidačního metabolismu.....	24
1. 4. 8. Chemiluminiscence.....	25
1. 4. 9 Imunohistochemické metody.....	25
1. 4. 10 Průtoková cytometrie.....	25
2. Cíle práce.....	28
3. Metody.....	29
3. 1 Použité reagensie:.....	29
3. 2 Stanovení CD154-CD40 ligand.....	29
3. 3 Přístroje.....	30
Průtokový cytometr – FACS Calibur, Becton Dickinson, USA.....	30
4. Výsledky a diskuze.....	31
4. 1 Zavedení metody stanovení CD154-CD40 ligand.....	31
4. 2 Vyšetření pacienta O.Z.P.....	31
4. 3 Vyšetření pacientů s COVID.....	35
5. Závěr.....	36
Seznam použité literatury.....	37

Seznam zkratek

ADA	adenosin-deamináza
AID	activation-induced cytidine deaminase
APC	antigen-presenting cell, buňka prezentující antigen
APC	allophycocyanin
BCR	B-cell receptor, antigen-specifický receptor lymfocytů B
BLS	bare lymphocyte syndrome, syndrom holých lymfocytů
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
CID	combined immunodeficiency, kombinovaná imunodeficience
CSR	class-switch recombination
CVID	common variable immunodeficiency, běžná variabilní imunodeficience
Cy	iododikarboxykyanin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECD	energy-coupled dye
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELA	gen elastázy
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
FITC	fluorescein izothiokyanát
fMLP	formyl-methionylleucylalanin, chemotaktický peptid
FSC	forward scatter, rozptyl světla
G-CSFR	granulocyte colony-stimulating factor receptor, receptor pro granulocytární kolonie stimulující faktor
HIGM	hyper IgM syndrom
HIV	human immunodeficiency virus, virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
ICOS	inducible T cell costimulator gene
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin A
IgD	imunoglobulin D
IgE	imunoglobulin E

IgM	imunoglobulin M
IL	interleukin
IM	ionomycin
INT	iod-nitroblue-tetrazoliová sůl
JAK	Janusova kináza
LAD	leukocyte adhesion deficiency, deficit adhezivních molekul
MCP	monocyte chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MIP	macrophage inflammatory protein-1-alpha
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid -fosfát
NBT	nitroblue-tetrazolium chlorid
NEMO	nuclear factor κ B essential modulator
NF κ B	nuclear factor κ B
NK	natural killer, přirozený zabíječ
PAF	platelet activating factor, faktor aktivující krevní destičky
PBS	phosphate buffer saline, fyziologický roztok s fosfátovým bufferem
PC	plasmatic cell, plazmatická buňka
PE	phycoerythrin
PerCP	peridin-chlorophyl
PHA	fytohemaglutinin
PMA	phorbol-myristát-acetát
PVDF	polyvinylidene fluoride
PWM	pokeweek-mitogen
RAG	recombination activating gene
SCID	severe combined immunodeficiency, těžká kombinovaná imunodeficiencie
SHM	somatická hypermutace
SSC	side scatter, odražené světlo
TACI	transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
Tc	cytotoxic T cell, cytotoxický T lymfocyt
TCR	T-cell receptor, antigen specifický receptor lymfocytů T
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor

Th	helper T cell, pomocný T lymfocyt
Treg	regulační T lymfocyty
UNG	uracyl-DNA glykosyláza

Souhrn

Buněčná imunita je důležitou součástí imunitního systému. V případě jejího těžkého postižení vedoucí ke zvýšené náchylnosti pacienta k infekcím, mluvíme o imunodeficitním stavu. Existuje řada imunodeficitů. Jakým způsobem se imunodeficit projeví záleží na tom, jaká složka imunitního systému je postižena. K vyšetření buněčné imunity je dostupná řada metod, které posuzují počet, zastoupení a funkci buněk imunitního systému.

Jednou z imunodeficiencí je tzv. hyper IgM syndrom (HIGM), který je způsoben poruchou izotypového přesmyku. Pacienti vytvářejí protilátky třídy IgM, ostatní izotypy se netvoří anebo jen v malé míře. Jednou z příčin je defekt v povrchové molekule CD154 (CD40L) na T lymfocytech. Tento imunodeficit lze diagnostikovat pomocí průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je standardní metodou k vyšetření buněčné imunity. Její použití je rychlé a relativně levné. Výsledkem vyšetření je potvrzení přítomnosti nebo nepřítomnosti povrchové molekuly CD154 (CD40 ligand).

K definitivní diagnostice je nutné molekulárně genetické vyšetření. Existují případy HIGM, kdy je příčina vzniku jiná. V České republice byly zaznamenány pouze 4 případy tohoto onemocnění.

Jeden z těchto nemocných, pacient O.Z.P., se v motolské nemocnici podrobil transplantaci kostní dřeně. Díky nově zavedené metodě stanovení povrchové molekuly CD154 lze sledovat obnovu jeho imunitního systému. Tato metoda také umožňuje záchyt nových případů u pacientů s CVID, u kterých může být deficit CD154 příčinou nízkých hladin protilátek.

Klíčová slova: buněčná imunita, imunodeficience, hyper IgM syndrom, průtoková cytometrie, CD154, CD40 ligand

1. Teoretická část

1. 1 Imunitní systém

Imunitní systém je součástí regulačních mechanismů organismu, které zajišťují jeho integritu a udržují vnitřní prostředí, homeostázu. Imunitní systém je schopen rozpoznat škodlivé od neškodného, ale také cizí od vlastního. Jeho hlavní funkcí je obrana organismu proti patogenním mikroorganismům a toxinům. Odpovídá za rozpoznání vlastních buněk a tkání a za toleranci vůči nim, a za imunitní dohled, tj. odstraňuje staré, nefunkční či jinak poškozené buňky. Funkce imunitního systému je zajišťována provázaností nespecifických (neadaptivní) a specifických mechanismů (adaptivní). Neadaptivní mechanismy jsou vrozené, nejsou ovlivněny předchozím setkáním s antigenem. Adaptivní, získané, mechanismy uplatňují imunologickou paměť [13].

1. 1. 1 Lymfatické tkáně a orgány

Centrální lymfatické orgány jsou kostní dřev a thymus (brzlík). Centrální lymfatické orgány jsou místem vzniku a diferenciacie imunokompetentních buněk. Všechny buněčné linie se diferencují v kostní dřev až do stadia zralých buněk, pouze prekursori T lymfocytů přecházejí do thymu a jejich diferenciacie probíhá v tomto orgánu.

Periferní lymfatické orgány jsou slezina, tonsily, lymfatické uzliny a lymfatická tkáň rozptýlená ve sliznici zažívacího traktu, dýchacích cest a kůže. Periferní lymfatické orgány jsou místem, kde probíhá imunitní reakce. Dochází tu ke zpracování a prezentaci antigenu, a k diferenciaci zralých imunokompetentních buněk do buněk efektorových [13].

1. 1. 2 Molekuly imunitního systému

Základními molekulami jsou antigenně specifické receptory na povrchu T a B lymfocytů, HLA (human leukocyte antigen) glykoproteiny I. a II. třídy, Fc receptory, adhezivní a kostimulační molekuly, imunoglobuliny, cytokiny a jejich receptory, složky komplementového systému. Tyto molekuly jsou buď součástí buněčné membrány, nebo jsou buňkami sekretovány [13].

1. 1. 3 Buněčná složka imunitního systému

Imunokompetentní buňky pocházejí z pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni. Charakteristickým znakem kmenových buněk je přítomnost povrchové molekuly CD 34. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní.

Z myeloidní linie vznikají monocyty (cirkulují v krvi, ve tkáních se diferencují na makrofágy), dendritické buňky a granulocyty: neutrofilů, eozinofilů, bazofilů (tkáňovou formou bazofilů jsou žírné buňky). Většina buněk z myeloidní linie je schopna fagocytózy. Dendritické buňky, monocyty a makrofágy působí jako buňky prezentující antigen (APC). Tyto buňky rozpoznají antigen, pohltnou jej a rozštěpí na malé částice, které pak vystaví na svém povrchu.

Z lymfoidní linie se diferencují buňky NK (natural killer), lymfocyty B a T. B lymfocyty se vyvíjí v kostní dřeni, jejich vývoj se dokončuje po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Konečným diferenciačním stadiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky produkující protilátky. Hlavní část vývoje T lymfocytů probíhá v thymu. Thymus opouští odlišné subpopulace T lymfocytů - prekurzory pomocných T buněk (T_H), na povrchu mají receptor CD 4 a prekurzory cytotoxických T buněk (T_C), na povrchu nesou receptor CD 8. NK buňky jsou vývojově bližší T lymfocytům, mají však omezenou antigenní specifitu. Na zralé efektorové buňky se prekurzory T_H a T_C diferencují po setkání s antigenem na povrchu APC [13].

1. 2 Buňky imunitního systému

1. 2. 1 NK buňky



Ilustrace 1: NK buňka
(www.rkm.com.au)

Nk buňky (natural killer), přirození zabíječi, jsou morfologicky granulární lymfocyty. Vývoj NK buněk probíhá v kostní dřeni, pocházejí z lymfoidní linie [6]. Na plazmatické membráně mají řadu povrchových molekul, např. CD2, CD16, CD56, aj. Narozdíl od T a B lymfocytů na svém povrchu nemají antigenně specifické receptory (TCR, BCR), nesou však inhibiční a aktivační receptory. Jsou schopné zabít některé nádorové buňky a buňky napadené virem bez nutnosti prezentace specifického antigenu. Hrají tak významnou roli v protinádorové imunitě. Vyznačují se spontánní cytotoxicitou, jsou schopny likvidovat cílovou buňku již při prvním setkání. Při výběru cílových buněk, hrají roli molekuly HLA I. třídy [17]. Pokud má buňka na svém povrchu málo molekul HLA systému I. třídy, stimulační receptory se aktivují. Stimulací NK buněk dochází k aktivaci cytotoxických mechanismů a cílová buňka je zabita.

1. 2. 2 B lymfocyty



Ilustrace 2: B lymfocyt
(www.visualsunlimited.com)

B lymfocyty se vyvíjí z prekurzorů v kostní dřeni a jejich vývoj se dokončuje po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. B lymfocyty se specializují na produkci protilátek. Na povrchu nesou B lymfocyty antigenně specifický receptor - B receptor (BCR). Dalším důležitým receptorem je molekula CD40. Vazba s molekulou CD40L (CD40 ligand, CD154) na povrchu aktivovaného pomocného T lymfocytu je jedním z pomocných signálů k produkci protilátek. Po prvním setkání s antigenem se nejprve produkují imunoglobuliny třídy IgM. Při přímém kontaktu B lymfocytu s aktivovaným pomocným T lymfocylem dochází k izotopovému přesmyku (změna části struktury imunoglobulinu důsledkem přeskupení částí imunoglobulinového genu), při kterém se mění třída imunoglobulinů z původních IgM nebo IgD na některou jinou (IgA, IgE, IgG). Po izotopovém přesmyku B lymfocyt

dokončí svůj vývoj a přemění se v plazmatickou buňku.

1. 2. 3 T lymfocyty



Ilustrace 3: T lymfocyt
(www.lbl.gov)

Hlavním znakem T lymfocytů je receptor pro rozpoznání antigenu (TCR). T lymfocyty se diferencují do dvou základních subpopulací- pomocné T lymfocyty (Th - helper) a cytotoxické T lymfocyty (Tc). Th lymfocyty nesou znak CD4, Tc lymfocyty CD8.

Th lymfocyty pomocí TCR rozpoznávají komplex cizího antigenu a molekulami HLA systému II. třídy [12]. Th lymfocyty lze dále rozdělit podle cytokinů, které produkují, na Th1 (produkce IL- 2 a IFN- γ), Th2 (produkce IL- 4, IL- 5, IL- 6, IL- 10), Th3 (intenzivní produkce TGF- β).

Základní funkcí Th1 buněk je spolupráce s makrofágy. Cytokiny produkované Th1 buňkami jsou nezbytné pro jejich aktivaci. Vzájemné působení Th1 buněk a makrofágů je základním mechanismem imunopatologické reakce opožděného typu.

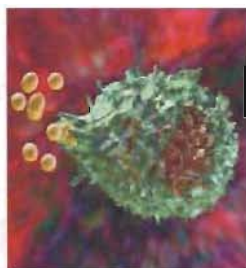
Th2 buňky spolupracují s B lymfocyty, které byly předem stimulovány antigenem. Dochází k navázání povrchového receptoru CD40 na B buňkách a CD40L na povrchu aktivovaných Th2 buňkách. Dochází k izotopovému přesmyku, při kterém hraje důležitou roli IL- 4 [4].

Další subpopulací jsou regulační lymfocyty (Treg). Exprimují na svém povrchu molekulu CD25, intracelulárně je přítomen specifický transkripční faktor foxP3, a nesou TCR rozpoznávající autoantigeny. Sekretují tlumivé cytokiny IL- 10 a TGF- β . Podílejí se tak na potlačování autoimunitních reakcích [30]. Inhibiční schopnosti Treg buněk však mohou být posíleny nádorovými buňkami. Důsledkem toho klesá protinádorová imunita [31].

Cytotoxické lymfocyty (Tc) rozeznávají a ničí buňky napadené virem nebo jinými intracelulárními parazity. Pro spuštění reakce musí Tc rozeznat komplex antigenu a molekul HLA systému I. třídy na povrchu buněk prezentující antigen (APC). Důležitou roli zde hrají molekuly CD40 na povrchu APC a CD40L na povrchu Th [2]. Pomocí signálů mezi CD40 a CD40L začne APC exprimovat molekulu CD80 a CD86, a tím stimuluje Tc [22]. Cílové buňky jsou zabíjeny pomocí granul obsažených

v cytoplazmě zralých Tc, který se váže na receptor Fas (tzv. Fas-ligand), jenž aktivuje apoptózu, tj. kaskádu reakcí vedoucí k buněčné smrti.

1. 2. 4 Fagocyty



*Ilustrace 4: Makrofág
pohlcující bakterii
(www.rkm.com.au)*

Fagocyty jsou buňky schopné fagocytózy tj. děje, při kterém jsou cizorodé částice pohlcovány a ničeny. Mezi tyto buňky se řadí neutrofilní a eosinofilní granulocyty, monocyty a z nich se diferencující makrofágy. Makrofágy fagocytují hlavně pozůstatky vlastních zahynulých buněk a podílejí se na obraně proti intracelulárním parazitům. Granulocyty mají význam v obraně proti extracelulárním mikroorganismům a mohou působit okamžitě, makrofágy musí být nejprve aktivovány cytokiny, které jsou sekretovány Th lymfocyty. Do místa zánětu se fagocyty dostávají vlivem chemotaktických faktorů. Pro neutrofilny je hlavní chemotaktickou látkou IL-8 [23], pro monocyty pak MIP- α (Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha) a MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) [7]. Společnými chemotaktickými látkami jsou součástí komplementu C3a a C5a, leukotrien B4, faktor aktivující destičky (PAF) a chemotaktické peptidy z bakteriálních proteinů (fMLP).

1. 3 Imunodeficiencie

Imunodeficiencie jsou poruchy imunitního systému, které vedou ke zvýšené náchylnosti k infekcím. Podle příčiny se dělí na primární a sekundární. Primární imunodeficiencie jsou genetického původu, sekundární jsou získané v průběhu života jedince a jsou důsledkem působení vnějších a vnitřních faktorů s dopadem na imunitní systém [16].

Existuje více než stovka imunodeficiencí. Zde jsou uváděny pouze příklady některých z nich.

1. 3. 1 Primární imunodeficity

Může se jednat o bodové mutace, delece určitého úseku chromozomu a posttranslační poruchy. Genová porucha způsobuje absenci nebo dysfunkci určité molekuly. Postiženou molekulou může být membránový receptor, protein účastnící se přenosu signálu z povrchu buňky do jejího nitra, sekretovaný produkt. Také může jít o poruchu enzymů. Pokud jsou tyto molekuly důležité při diferenciaci imunokompetentních buněk, vedou zmiňované poruchy k absenci celé buněčné linie [16].

1. 3. 1. 1 Těžké kombinované defekty imunity (SCID)

SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) představuje nejzávažnější formu vrozené imunodeficiencie. Nejčastější dělení je podle přítomnosti lymfocytárních subpopulací.

SCID T⁺B⁻

Nejčastějším onemocněním v této skupině je porucha adenosin-deaminázy (ADA). Absence nebo dysfunkce tohoto enzymu vede ke hromadění produktů metabolismu purinů. Ty jsou toxické pro časně prekurzory lymfoidní řady, což způsobuje těžké lymfopenie postihující B, T i NK buňky. U poruchy adenosin-deaminázy se uplatňuje autozomálně recesivní dědičnost [25].

Ostatní formy imunodeficitů se vyznačují chyběním jak T tak i B lymfocytů. Pouze NK buňky jsou zachovány. Příčinou může být deficit enzymů RAG1 (recombination activating gene) a RAG2 [28] zodpovědné za rekombinaci genů

kódujících antigenně specifické receptory B a T buněk (BCR a TCR). Dědí se také autozomálně recesivně.

SCID T^B+

Při tomto deficitu zůstávají zachovány B lymfocyty, T a NK buňky chybí.

Ze sedmdesáti procent se jedná o dědičnost vázanou na X chromozom, ze třiceti o autozomálně recesivní dědičnost. Forma vázaná na X chromozom je způsobena mutací genu kódujícího γ -řetězec receptoru pro interleukin 2 (IL-2), který je však společný i receptorům pro IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 aj. Jedná se tedy o funkční poruchu na úrovni mnoha cytokinů. Příčinou autozomálně recesivních forem může být porucha kinázy JAK-3 (Janusova kináza), chybění povrchové molekuly CD45, absence řetězce α -receptoru pro interleukin 7 (IL-7), případně δ -řetězce molekuly CD3 [27].

Ommenův syndrom

Jde o autozomálně recesivně dědičné onemocnění, kdy je kůže a sliznice střeva infiltrována aktivovanými lymfocyty T oligoklonálního charakteru. Jsou typu Th2 a jejich produkty (IL-4, IL-5) vedou k eozinofilii. Molekulární podstatou onemocnění je snížená aktivita rekombináz RAG1 a RAG2 [18].

DiGeorgeův syndrom

Jedná se o genetické onemocnění způsobené vývojovou poruchou třetí a čtvrté žaberní výchlípkou. To vede k redukci tkáně thymu a tudíž ke snížení počtu T lymfocytů. Porucha je většinou způsobena delecí v oblasti 22. nebo 10. chromozomu [13].

1. 3. 1. 2 Funkční poruchy T lymfocytů

Funkční poruchy T lymfocytů jsou označovány také jako CID (kombinované defekty imunity). Počet T lymfocytů v periferní krvi je normální nebo snížený, T lymfocyty však vykazují různé funkční anomálie. Může se jednat o poruchy v aktivačních drahách lymfocytů T, o poruchy v antigenní prezentaci a poruchy v regulaci aktivace lymfocytů.

Aktivační poruchy T lymfocytů

Spočívají v poruchách molekul zodpovědných za proces aktivace zralých lymfocytů T nebo jejich prekurzorů. Tato onemocnění často provází autoimunitní reakce namířená nejčastěji proti krevním elementům.

Syndrom hyper-IgM



Ilustrace 5:
Pentamer IgM
(www.jdaross.cwc
.net)

Imunodeficiencie se zvýšenými protilátkami typu IgM jsou charakteristické opakujícími se infekcemi spojenými s velmi nízkými hladinami IgG, IgA a IgE, ale normální nebo zvýšenou hladinou IgM. Nejčastější formou syndromu hyper IgM (HIGM) je forma vázaná na X-chromozom. Může být způsobena mutací v molekule CD40 ligand (CD154) exprimovanou aktivovanými CD4 T lymfocyty, nebo mutací v NEMO (nuclear factor κ B essential modulator) spojeným s ektodermální dysplázi [15]. Pokud se jedná

o autozomálně recesivní nebo dominantní dědičnost, molekulární podstatou je zde mutace genu pro enzym AID (activation-induced cytidine deaminase) a genu pro CD40. Další zjištěná mutace je v uracyl-DNA glykosyláze (UNG).

HIGM1- na X-vázaný hyper IgM syndrom typu 1 v důsledku deficitu CD40L je způsoben mutací ligandu T buněk, CD40L (CD154), který interaguje s molekulou CD40 na B buňkách a umožňuje přesmyk syntézy z IgM na ostatní izotypy [24]. Pokud aktivované CD4 T lymfocyty neexprimují CD40L (CD154), lze předpokládat přítomnost HIGM1.

HIGM2-hyper IgM syndrom typu 2 s deficitem enzymu AID je autozomálně recesivní imunodeficiencí. Příčinou je mutace v genu kódující enzym AID [26], který se účastní izotopového přesmyku. HIGM2 je méně častý než HIGM1 a většina pacientů pochází z příbuzenských sňatků.

HIGM3-hyper IgM syndrom typu 3 s deficitem CD40 je vzácné autozomálně recesivní onemocnění se zvýšenou hladinou IgM a sníženou hladinou IgG a IgG protilátkovou odpovědí. Tento stav je spojen s absencí molekuly CD40 na B

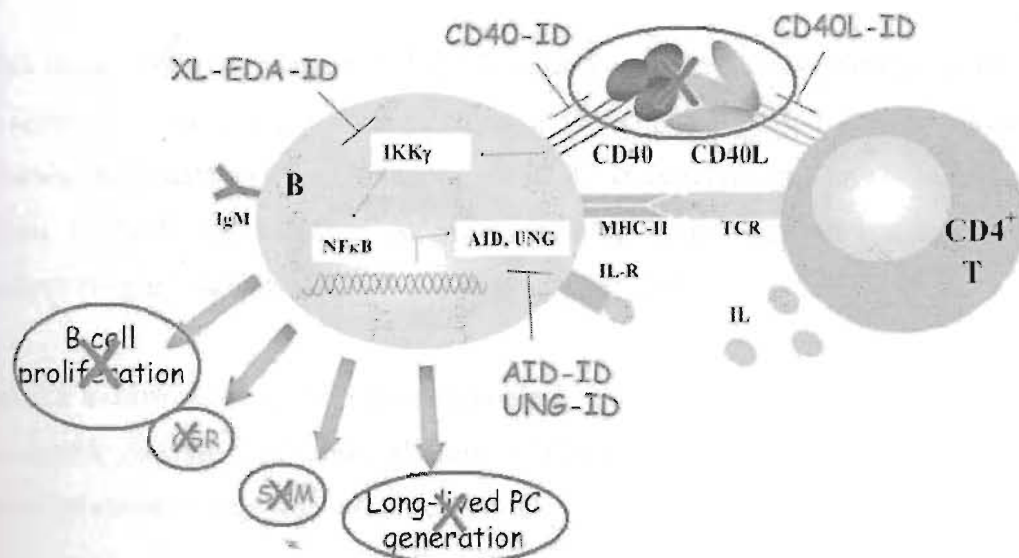
lymfocytech [21].

HIGM4-hyper IgM syndrom typu 4 byl objeven teprve nedávno. Molekulární podstata nebyla definována, klinicky se však projevuje jako HIGM2.

Hyper IgM syndrom v důsledku deficitu UNG (uracyl-DNA glykosylázy) je nově popsána choroba klinicky podobná HIGM2 a HIGM4 [14]

Klinicky se HIGM syndrom manifestuje zvýšenou náchylností jak k bakteriálním, tak virovým a oportunním infekcím. Pacienti trpí v dětství infekcemi dýchacího ústrojí (časté jsou pneumocystové pneumonie) a průjmy parazitem *Cryptosporidium parvum*. Dalšími projevy mohou být nemoci jater způsobené cytomegalovirem (CMV) nebo chronickou infekcí kryptosporidii, dále pacientům hrozí riziko encefalitid. Neutropenie, jako důsledek autoimunitních projevů, může způsobit nekrotizující slizniční záněty v ústech a konečníku. Vyskytují se i sklerotizující cholangitidy a nádory hepatobiliárního traktu [29].

Podle Českého národního registru primárních imunodeficiencí bylo v České republice zachyceno ke 3. lednu 2002 toto onemocnění (HIGM) pouze u tří pacientů, pacient popisovaný v této práci je čtvrtý v pořadí.



Ilustrace 6: Defekty u HIGM (Notarangelo, J Allergy Clin Immunol 2006, 117, 855-64)

Poruchy v antigenní prezentaci

Jedná se o defekty exprese HLA I. nebo II. třídy, které vedou sekundárně k deficitu a dysfunkci CD4, resp. CD8 lymfocytů, v prvním případě i s následnou poruchou tvorby protilátek. Tato skupina onemocnění se označuje také jako *syndrom holých lymfocytů* (BLS- bare lymphocyte syndrome) [19]. Příčinou jsou defekty v transkripčních faktorech regulujících expresi molekul HLA II. třídy. Pacientům chybí téměř úplně CD4 lymfocyty. Porucha v expresi HLA I. třídy je způsobená defektem v transportu peptidů do endoplazmatického retikula. To brání tvorbě stabilních komplexů HLA I. třídy. Tito pacienti mají velmi málo CD8 lymfocytů.

1. 3. 1. 3 Poruchy fagocytózy

Poruchy fagocytárního systému spočívají hlavně v počtu, v adhezivitě a motilitě neutrofilních granulocytů. Postižen může být i mikrobicidní mechanismus. Funkční poruchy postihují i monocytomakrofágový systém [13].

Poruchy v počtu neutrofilů

Těžká kongenitální neutropenie. Jde o kvantitativní poruchu ve vývoji neutrofilů, kdy se v kostní dřeni zastavuje maturace neutrofilů ve stádiu promyelocytů nebo myelocytů. Molekulová podstata spočívá v mutaci genu ELA2 kódující neutrofilní elastázu [9] nebo v genu G-CSFR (granulocyte colony-stimulating factor receptor) u autozomálně recesivně dědičné varianty, Kostmannova syndromu [10].

Cyklická neutropenie. Cyklická neutropenie je charakterizována cyklickým poklesem granulocytů, obvykle v intervalu tří týdnů. U této choroby byly také prokázány mutace neutrofilní elastázy ale v jiné oblasti enzymu.

Poruchy ve funkci fagocytujících buněk

Chronická granulomatózní choroba. Při chronické granulomatózní chorobě je počet leukocytů normální, defektní je však jejich funkce. Jedná se o defekt v enzymovém systému nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfát (NADPH) -oxidázy vázané na membránu fagocytů nebo o defekt v cytozolických faktorech, které jsou nutné k aktivaci tohoto enzymu. To vede k absenci tvorby kyslíkových radikálů, baktericidní schopnost fagocytů je proto snížena. Dysfunkční jsou i další degradační enzymy, které tak nejsou schopny efektivně rozložit pohlcený materiál čímž dochází k akumulaci nestrávených zbytků v těchto buňkách. Postiženy jsou jak granulocyty, tak monocyty a makrofágy. Podle typu deficitní složky NADPH oxidázy se jedná buď o chorobu vázanou na chromozóm X, nebo o onemocnění dědičné autozomálně recesivně [1].

Defekt adhezivních molekul (LAD). LAD I syndrom (lekocyte adhesion deficiency) je defekt leukocytárních integrinů a je projevem dysfunkce neutrofilů způsobené poruchou jejich adhezivity. Granulocyty nejsou schopny adherovat k endoteliím, a tedy opustit krevní řečiště a dostat se do místa zánětu. Defekt je způsoben mutací genu pro $\beta 2$ podjednotku integrinových molekul CD11/CD18 [8].

LAD II syndrom vzniká v důsledku nedostatku sialyl-Lewis-x molekuly, ligandu pro selektiny [11].

Humorální imunodeficiencie

CVID-běžná variabilní imunodeficiencie. CVID je heterogenní skupinou onemocnění, která je charakterizována sníženou schopností produkce protilátek, zejména tříd IgG a IgA. Příčinou onemocnění je porucha v poslední fázi zrání B lymfocytů v plazmatické buňky spojené s produkcí protilátek nebo s izotopovým přesmykem z IgM na IgG. Jsou však prokazovány i různé funkční poruchy lymfocytů T. Variantou tohoto onemocnění je selektivní deficit IgA. U několika pacientů byla již objevena molekulová podstata tohoto onemocnění. Byly zjištěny mutace v TACI (transmembrane activator and

calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), ICOS (inducible T cell costimulator gene) a v molekule CD19 [5].

1. 3. 2 Sekundární imunodeficity

Sekundární imunodeficiency jsou ve srovnání s primárními imunodeficiencemi relativně častější. Mohou být způsobeny poškozením přirozených obranných mechanismů (například rozsáhlé popáleniny, poranění a toxická poškození kůže a sliznic, chronická zánětlivá onemocnění kůže a sliznic, polytraumata) i jednotlivých složek imunitního systému. Nejčastější příčinou sekundární imunodeficiency ve světovém měřítku je podvýživa, druhou nejčastější imunodeficiencí je pak infekce virem HIV.

V našich podmínkách převažují příčiny sekundárních imunodeficiencí imunosupresivní a cytostatická léčba, stavy po transplantaci kostní dřeně, stavy po virových infekcích a chronické infekce, poruchy přirozených bariér (popáleniny, poškození, poranění a chronická zánětlivá onemocnění kůže a sliznic), metabolické choroby, poruchy výživy a nádorová onemocnění [16].

1. 4 Možnosti stanovení

1. 4. 1 Izolace buněk

Pro řadu testů buněčné imunity je potřeba izolovat krevní buňky z plné krve. Existuje řada metod, jak jednotlivé druhy bílých krvinek oddělit. Metody se mezi sebou liší provedením a také časovou a finanční náročností .

1. 4. 1. 1 Gradientová centrifugace

Izolace buněk pomocí gradientové centrifugace je založena na oddělení buněk podle rozdílů v jejich hustotě. Krev odebraná do zkumavky s heparinem se navrství na vrstvu separační tekutiny (Ficoll- Hypaque). V separační tekutině o určité hustotě jsou zadrženy všechny buňky, které jsou lehčí nebo stejné hustoty. Buňky s vyšší hustotou procházejí separační tekutinou a dostávají se pod její hladinu. Po navrstvení separační tekutiny se celá zkumavka centrifuguje. Po centrifugaci dojde k typickému rozdělení buněk, kdy monocyty a lymfocyty tvoří prstenec na povrchu Ficoll- Hypaque (mají nižší hustotu), erytrocyty a granulocyty se nacházejí pod vrstvou Ficoll- Hypaque.

Tato metoda patří mezi základní imunologické techniky a běžně se používá pro přípravu buněk k funkčním testům [20].

1. 4. 1. 2 Izolace T lymfocytů pomocí rozet

T lymfocyty exprimují na cytoplazmatické membráně adhezivní molekulu CD2, která se váže na glykoprotein na ovčích erytrocytech. Vazba erytrocytu je realizována ligandou CD58. T lymfocyty tak vytváří s ovčími erytrocyty rozety. Pro získání T lymfocytů se periferní krev s ovčími erytrocyty kultivuje spolu s neuraminidázou. Neuraminidáza rozdělí krevní elementy na rozetující populaci (T lymfocyty) a na populaci nerozetující (ostatní buňky). Tyto populace jsou od sebe odděleny pomocí gradientové centrifugace [3].

Tato metoda se v dnešní době užívá jen zřídka.

1. 4. 1. 3 Imunomagnetická selekce buněk

Tato separace je založena na expresi různých povrchových antigenů. Separace se rozděluje na pozitivní a negativní. Při pozitivní separaci jsou vybírány buňky, které na svém povrchu vystavují určitou molekulu. Při negativní selekci jsou odstraněny všechny buňky ze studované populace kromě studované populace na základě exprese povrchových molekul.

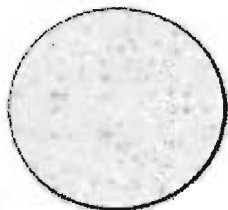
Princip metody spočívá v použití mikroskopických částic (kuličky z polyakrylu) s magnetickými vlastnostmi (immunobeads) které jsou potaženy požadovanou protilátkou. Po inkubaci s buněčnou populací, kdy dojde k navázání magnetické částice se specifickou protilátkou na povrchový antigen, jsou buňky umístěny do magnetického pole. Zde jsou buňky s navázanou protilátkou zachyceny a ostatní buňky volně procházejí. Navázané magnetické částice lze z buněk odstranit. Imunomagnetická selekce může být použita pro izolaci jakéhokoli buněčného typu [3].

1. 4. 2 Blastická transformace (proliferace lymfocytů)

Metoda je velmi přínosná pro diagnostiku závažných vrozených imunodeficiencí a pro sledování rozvoje funkce štetu po transplantaci kostní dřeně.

Proliferace T lymfocytů je nutná pro normální průběh imunitní reakce. Spouští se aktivací TCR komplexem antigenu a molekulami HLA systému I. nebo II. třídy. Aktivace TCR vede ke spuštění intracelulárních signalizačních cest. Výsledkem je například produkce cytokinů, uvolnění cytotoxických granul. Proliferační aktivita T buněk se hodnotí pomocí jejich stimulace. Ke stimulaci se používají antigeny aktivující paměťové buňky vytvořené po očkování (tuberkulin, tetanický toxoid), mitogeny (PHA-fytohemaglutinin, PWM-pokeweek- mitogen) nebo protilátkou proti molekule CD3, která je součástí komplexu TCR. Po uplynutí doby kultivace je k buňkám přidán ^3H - thymidin a kultivace pokračuje. Včlenění ^3H - thymidinu detekuje syntézu DNA. Radioaktivita obsažená v jednotlivých buňkách je detekována detektorem pro beta-záření. To umožňuje hodnotit proliferační aktivitu lymfocytů [3].

1. 4. 3 ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay)



Ilustrace 7:
ELISPOT
(www.immusystems.de)

ELISPOT je metoda pro detekci a analýzu jednotlivých buněk produkujících specifické protilátky nebo cytokiny. Principem metody je vazba cytokinu produkovaného určitou buňkou na protilátku vázanou na destičce. Dno mikrotitrační destičky tvoří PVDF (polyvinylidene fluoride) membrána nebo membrána nitrocelulózová. Tato membrána je potažena primární specifickou protilátkou. Pro úspěšné provedení ELISPOTu je nutná specifická stimulace studovaných buněk správným stimulem. Cytokin (nebo jiná látka) produkovaný z aktivované buňky je zachycen navázanou protilátkou na povrchu PVDF membrány. Po inkubaci jsou buňky lyzovány a odmyty. Přidá se biotinem značená druhá protilátka proti testovanému cytokinu a barevný substrát s peroxidem vodíku. Tak se zvýrazní místo, kde buňka produkovala detekovaný cytokin [3].

1. 4. 4 Stanovení aktivity cytotoxických buněk

Tento test stanovuje cytotoxickou aktivitu buněk, které jsou schopné likvidovat cílové buňky. Jedná se o NK buňky a cytotoxické T lymfocyty. Pro provedení cytotoxického testu je zapotřebí buněčná linie citlivá vůči těmto buňkám. Buněčnými liniemi mohou být buňky infikované virem, nádorové buňky.

Buněčná linie se inkubuje v přítomnosti radioaktivního izotopu chrómu. Radioaktivní chróm vstoupí do buněk. Promytím se odstraní nenasazený radioaktivní chróm. Testované buňky jsou smíchány ve vhodném poměru s buňkami testovanými. Při inkubaci dochází k cytotoxické likvidaci cílových buněk a uvolnění radioaktivního chrómu. Míra uvolnění radioaktivního chrómu je úměrná míře působení cytotoxických buněk [20].

1. 4. 5 Fagocytóza

Fagocytóza je schopnost buněk zvaných fagocyty rozpoznat v těle cizorodou částici a pohltit ji. Případně ji i usmrtit a degraduje, pokud se jedná o živý mikroorganismus.

Vyšetření fagocytózy se obvykle omezuje pouze na vyšetření fáze pohlcení (ingesce).

Pro sledování ingesce se používá hydroxyethylmetakrylátové partikule jako substrát. Suspenze částic se inkubuje s plnou krví. Po inkubaci se zhotoví nátěr na podložní skličko, které se pak fixuje a barví. Následuje odečítání ve světelném mikroskopu. Jako pozitivní buňky se označují ty, které obsahují tři a více partikul [3].

1. 4. 6 Baktericidní test

Tento test zahrnuje všechny fáze fagocytárního děje až po usmrcení pohlceného mikroorganismu. Proto substrátem musí být živý mikroorganismus. Nejčastěji se používá *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* nebo pseudomonády. Test se hodnotí podle použitého substrátu. U kvasinek lze hodnotit mikroskopicky vitálním barvením trypanovou modří po lýze fagocytů (usmrcené kvasinky jsou modré, živé zůstávají bílé, protože trypanovou modř eliminují). U stafylokoků se provádí očkování na plotny a počítání narostlých kolonií. Pro vyhodnocení přežívajících buněk lze také použít průtokovou cytometrii [3].

1. 4. 7 Testy oxidačního metabolismu



Ilustrace 8: Výsledek testu oxidačního vzplanutí (www.cgmh.org.tw)

Podle použitého substrátu se tyto testy označují jako NBT (nitroblue-tetrazolium chlorid) a INT (iod-nitroblue-tetrazoliová sůl). Tyto metody posuzují kyslíkový metabolismus granulocytů. Zjišťuje se schopnost redukce bezbarvé tetrazoliové soli na barevné formazány. Do nitra buňky se dostává nebarevná forma substrátu, která se díky oxidačním pochodům redukuje na nerozpustný tmavě modrý formazán. V optickém mikroskopu se pak odečítají granulocyty, které zredukovaly rozpuštěnou nebarevnou formu barvičky. Touto metodou se testuje, zda granulocyty nemají sníženou schopnost fagocytózy nebo méně efektivní mikrobicidní systém [3].

1. 4. 8. Chemiluminiscence

Buňky při fagocytóze uvolňují určitá světelná kvanta, která se projevují chemiluminiscencí fagocytů. Měření chemiluminiscenční aktivity fagocytů je nejvýhodnější metodou pro kvantitativní sledování oxidačního vzplanutí fagocytů. Při oxidačním vzplanutí se tvoří vysoce reaktivní kyslíkové metabolity. Během tohoto procesu vznikají elektronově excitované stavy, které emitují fotony. Tato emise se projevuje chemiluminiscencí fagocytů.

Chemiluminiscence se vyvolá přidáním stimulu, který aktivuje fagocyty. Jako stimulační látka je používán phorbol-myristát-acetát (PMA) nebo zymozan. Pro zesílení přirozené chemiluminiscenční aktivity slouží látky zvané luminofory (luminol, lucigenin). Intenzita chemiluminiscence se pak vyhodnocuje na chemiluminiscenčním přístroji [3].

1. 4. 9 Imunohistochemické metody

Cílem imunohistochemických metod je znázornění lokalizace určité molekuly v buňkách a tkáních pomocí specifických protilátek. Detekce je založena na specifické vazbě antigen-protilátka. Tato vazba musí být vizualizována. Pro vizualizaci výsledku se používají dvě metody: přímá a nepřímá. Přímá metoda je jednokroková, kdy primární značená protilátka reaguje přímo s daným antigenem. V nepřímé metodě se nejprve váže neznačená primární protilátka na antigen. Ve druhém kroku dochází k vazbě značené sekundární protilátky na primární protilátku navázanou na antigen [3].

1. 4. 10 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metodou pro analýzu buněk v suspenzi. Je to technologie, která současně měří a analyzuje četné fyzikální charakteristiky jednotlivých partikulí. Většinou se jedná o buněčnou suspenzi rozptýlenou v laminárně proudící tekutině. Analýzou se zjišťuje velikost a počet buněk, přítomnost granul v cytoplazmě, exprese povrchových či cytoplazmatických molekul. Tyto údaje se stanovují použitím opticko-elektronickým systémem jako odpověď jak buňky rozptýlí laserový paprsek a vyzáří excitované světlo.

Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů: laminárně proudící tekutiny, optiky a elektroniky. Laminárně proudící tekutina přenáší buňky k laserovému paprsku. Optický systém zahrnuje laser, který ozařuje částice v proudící tekutině, a optické filtry řídící výsledný signál k příslušným detektorům. Elektronický systém převádí zachycené světelné signály na signály elektronické, které pak mohou být zpracovány počítačem.

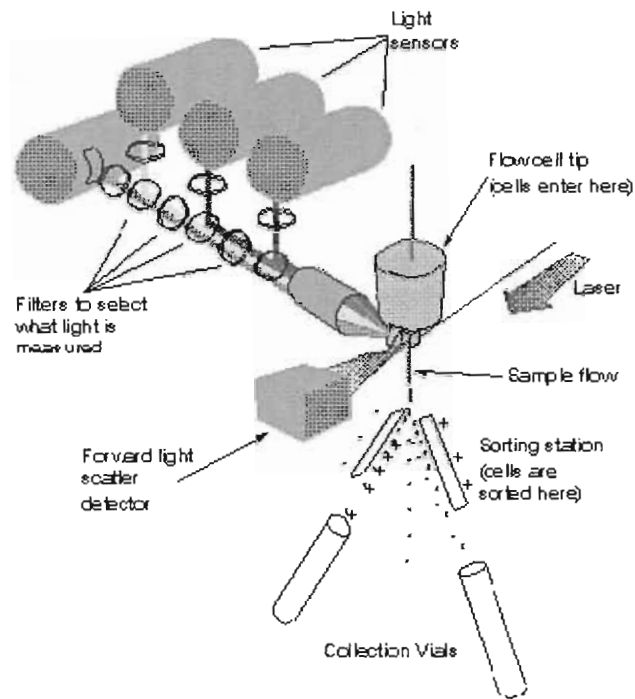
Buněčná suspenze se označí monoklonálními protilátkami s navázanou fluorescenční molekulou-fluorochromem. Molekuly monoklonálních protilátek se specificky váží na antigeny vyšetřovaných buněk. V průtokovém cytometru je analyzovaná buněčná suspenze rozptýlená v laminárně proudící tekutině. Unášené buňky jsou následně vypuzovány přetlakem z kalibrované trysky, která zajišťuje, že z otvoru vytéká tenký proud suspenze, v němž jsou buňky seřazené za sebou.

Pro správnou analýzu není vhodné, aby se dvě buňky ocitly vedle sebe. Tento proud protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že se od ní laserové světlo odrazí a rozptýlí. Laserový paprsek zároveň způsobí excitaci fluorochromů navázaných na částicích. Vyzáří se tak ještě excitované světlo. Unášené buňky jsou detekovány několika senzory. Senzory zjišťují počet buněk, proměřují velikost, která se vyjadřuje jako FSC (Forward Scatter-rozpyl světla) a jejich kompaktnost buněčného povrchu, přítomnost granul v cytoplazmě, optické vlastnosti cytoplazmy a jádra. Tyto údaje zaznamenává SSC (Side Scatter-odražené světlo). Pro proměření intenzity fluorescence jsou užívány fluorescenční kanály. Korelací FSC a SSC lze rozlišit typy buněk v heterogenní populaci, například rozlišit subpopulace leukocytů.

Analyzovaná je nativní leukocytární suspenze. Získaná data z analýzy jsou vyhodnocena v počítači. První informací o analyzované buněčné suspenzi nám poskytuje *scattergram*. *Scattergram* je závislost mezi velikostí parametru FS a velikostí parametru SS. Elektronicky lze označit jen část buněk a uzavřít ji do zóny-gatu. Tato část buněk se stává pro další vyhodnocování jedinou, ostatní buňky jsou z hodnocení vyloučeny.

Hodnocené vzorky jsou označené monoklonálními protilátkami s navázanou fluorescenční molekulou-fluorochromem. Nejčastěji se jedná o FITC (fluorescein izothiokyanát), který emituje světlo v zelené oblasti, a o PE (phycoerythrin), který emituje světlo v červené oblasti. Dalšími používanými fluorochromy jsou například

APC (allophykokyanin), ECD (energy-coupled dye), peridin-chlorophyl (PerCP), iododicarboxykyanin (Cy5) [3][20].



Ilustrace 9: Princip průtokové cytometrie
(<http://meds.queensu.ca>)

2. Cíle práce

1. Zavedení nové metody – detekce povrchově vázané molekuly CD40 L (CD154), vyšetření zdravých dárců.
2. Sledování stavu buněčné imunity u pacienta s hyper IgM syndromem.
3. Vyšetření pacientů s CVID, u kterých může být deficit CD154 příčinou hypogamaglobulinémie.

3. Metody

3. 1 Použité reagensie:

RPMI 1640+ - kultivační roztok, CAMBREX, Belgie

PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, stimulační látka, koncentrace 2mg/ml

IM – Ionomycin, stimulační látka, koncentrace 100mg/ml

PBS – phosphate buffer saline, fyziologický roztok s fosfátovým bufferem, složení: NaCl, Na₂PHO₄·12H₂O, KCl, KH₂PO₄, připravuje se v laboratoři

Lyzační činidlo – složení: NH₄Cl, NaHCO₃, EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), připravuje se v laboratoři

3. 2 Stanovení CD154-CD40 ligand

Metoda je založena na expresi povrchové molekuly CD154 na stimulovaných

T lymfocytech. Proto je nutné před samotným měřením průtokovou cytometrií buňky stimulovat.

1. 0,5ml heparinizované krve bylo naředěno 10ml roztokem RPMI 1640+.
2. Byla použita 24 jamková kultivační deska -pro každého pacienta bylo potřeba 8 jamek-4 jamky pro nestimulovanou a 4 jamky pro stimulovanou krev.
3. Do každé jamky bylo napipetováno 1ml naředěné krve.
4. Do prvních jamek nebylo přidáno nic, do dalších 4 jamek se přidaly 2μl PMA a 5μl IM..
5. Inkubace probíhala 4 hodiny při 37°C v atmosféře CO₂ .
6. Po inkubaci byla stáhnutá zvlášť stimulovanou a nestimulovanou krev do dvou 10ml zkumavek.
7. Krev byla naředěna 1:1 RPMI 1640+.
8. Naředěná krev byla centrifugována (2000ot/10min).
9. Po centrifugaci se krev slila a naředila 10ml RPMI 1640+.
10. Naředěná krev byla podruhé stočena (2000ot/10min).
11. Po druhém stočení byla krev slita na co nejmenší objem, ale ne do sucha.

12. Byly připraveny 2 sady zkumavek- pro stimulovanou a nestimulovanou krev:
69 FITC/3 PE/8 APC-kontrola aktivace, 3 FITC/154 PE/8 APC, každá po 5 μ l.
13. Do připravených zkumavek bylo napipetováno 50 μ l krve.
14. Inkubace probíhala 15 minut ve tmě.
15. Lýza: bylo přidáno 1,5ml lyzačního činidla.
16. Inkubace probíhala 15 minut ve tmě.
17. Zlyzovaná krev byla stočena (1200ot/5min) a následně slita.
18. K zůstatku bylo přidáno 200 μ l PBS.
19. Připravený vzorek byl měřen na průtokovém cytometru.

3. 3 Přístroje

Průtokový cytometr – FACS Calibur, Becton Dickinson, USA



Ilustrace 10: FACS Calibur

4. Výsledky a diskuze

4. 1 Zavedení metody stanovení CD154-CD40 ligand

Metoda je převzata z Ústavu imunologie v Ústí nad Labem a její použití bylo zavedeno do podmínek laboratoře v Ústavu imunologie v Motole. Metoda byla ověřena s použitím vzorků od pacienta s prokázaným hyper IgM syndromem na podkladě deficitu CD40L. Dalšími vyšetřovanými byli pacienti s CVID.

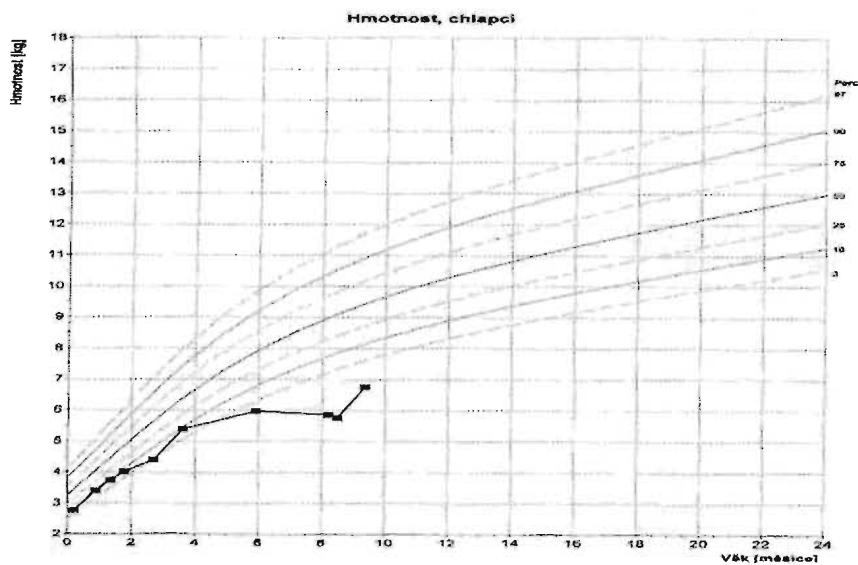
Jedná se o metodu semikvantitativní, tj. výsledek měření může být ovlivněn koncentrací stimulačních látek, dobou kultivace. Při jejich změně se změní také procentuelní počet naměřených buněk s CD154 u téhož vzorku. Proto je nutné provádět vyšetření zároveň se zdravou kontrolou.

Výsledek vyšetření vypovídá o přítomnosti či nepřítomnosti povrchové molekuly CD154 a slouží při stanovení diagnózy hyper-IgM syndromu. Pro potvrzení této diagnózy je ještě třeba provést molekulárně genetickou analýzu.

Stanovení CD154 pomocí průtokové cytometrie je rychlé, relativně levné a lze jej provádět i v menších laboratořích.

4. 2 Vyšetření pacienta O.Z.P.

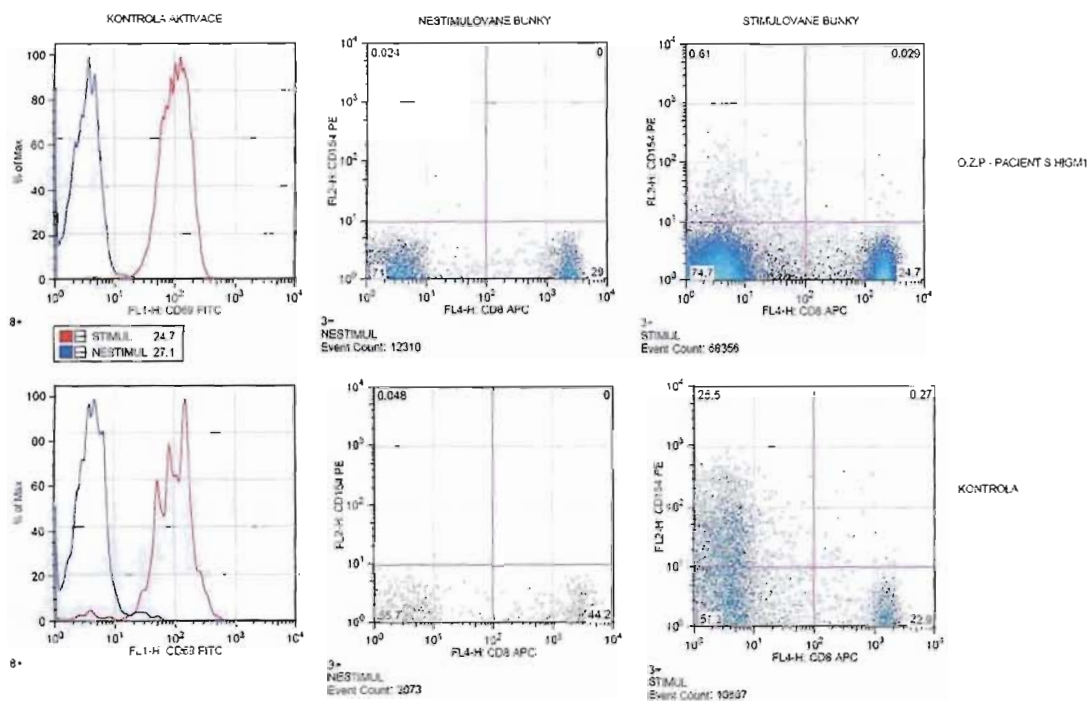
Pacient O.Z.P. je devítiměsíční kojeneček, který byl hospitalizovaný pro dušnost na Pediatrické klinice v Motole. O.Z.P. od dvou měsíců špatně prospíval, ve třech měsících se u něho objevila zvětšená uzlina v podpaží a následně byla provedena její punkce. Ve čtyřech měsících byl O.Z.P. léčen na suchý kašel. O.Z.P. trpí chronicky řídkými žlutozelenou stolicí. V osmi měsících u něj byla nalezena kvasinková infekce v ústech.



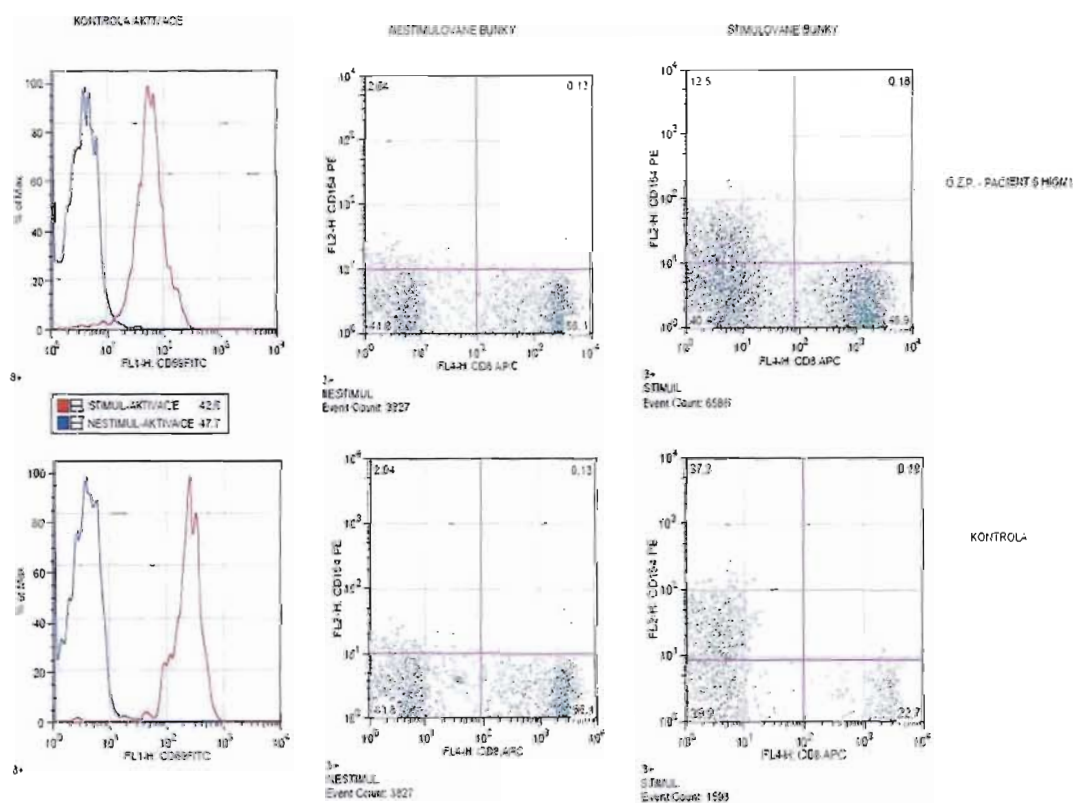
Ilustrace II: Váhový graf OZP

Při laboratorních vyšetření byl zjištěn zvýšený počet leukocytů, nízká hladina c-reaktivního proteinu, nízké hladiny IgG a IgA, zvýšená hladina IgM. Počet lymfocytů a výsledky funkčních testů (blastická transformace, fagocytóza, NBT) byly v normě. Detekce CD40L na stimulovaných T lymfocytech byla prakticky nulová. Výsledky vyšetření svědčily pro X-vázaný hyper IgM syndrom. Diagnóza byla potvrzena molekulárně genetickým testem.

O.Z.P. se dne 9.2.2007 podrobil transplantaci kostní dřeně a jeho klinický stav se postupně upravuje k normě.



Ilustrace 12: Vyšetření pacienta O.Z.P. průtokovou cytometrií před transplantací, 26.1.2007



Ilustrace 13: Výsledky vyšetření pacienta O.Z.P. průtokovou cytometrií po transplantaci, 12.3.2007

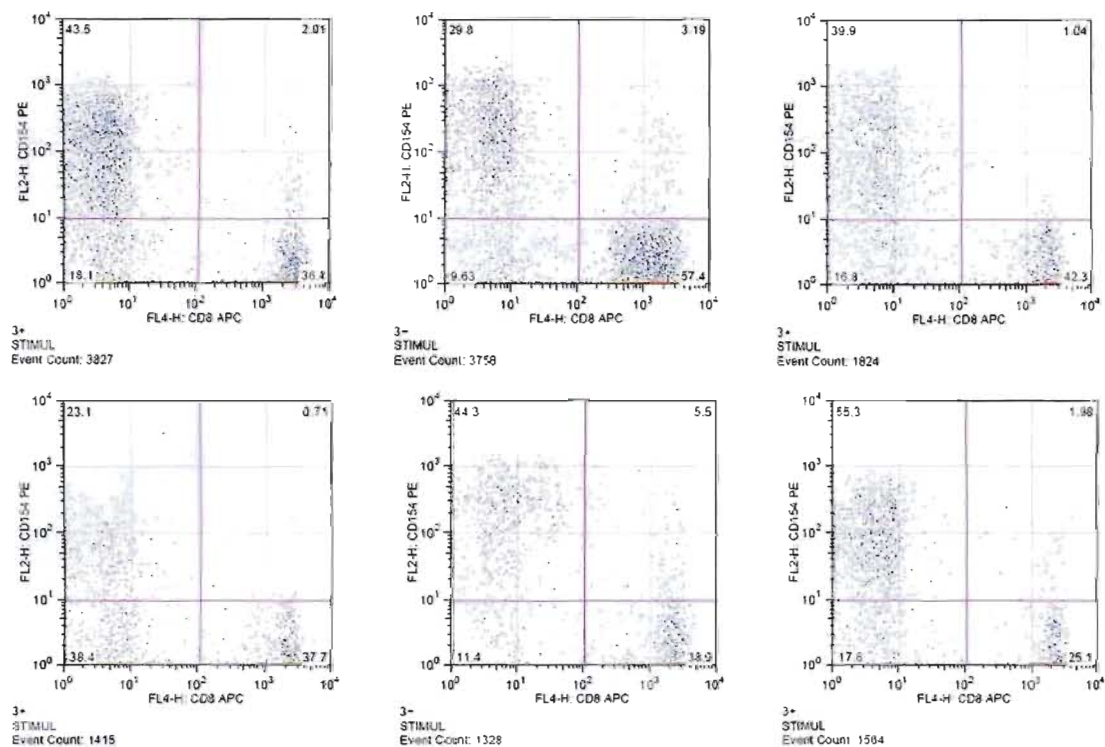
Pro vyšetření průtokovou cytometrií je nutné použít zdravé kontroly. První graf výsledků vyšetření pacienta O.Z.P. průtokovou cytometrií značí kontrolu aktivace T lymfocytů. Na ose Y je vynesena počet proměřených buněk, na ose X pak množství povrchových molekul. Modrá křivka odpovídá nestimulované krvi, červená křivka krvi stimulované. Posun červeného píku doprava odráží větší expresi povrchových molekul po stimulaci. Plocha následujících dvou grafů je křížem rozdělena na čtyři kvadranty. Vyšetřované buňky s povrchovým znakem CD154 se nacházejí v levém horním kvadrantu (tj. CD4+ T lymfocyty), pokud je krev stimulovaná. Výsledky vyšetření pacienta O.Z.P.

před transplantací udávají necelé 1% (0,61%) aktivovaných T lymfocytů se znakem CD154 z 68 356 buněk, jak udává *Event Count*. U kontrolního vzorku bylo aktivovaných T lymfocytů s CD154 25,5% z 10 507 buněk.

Po transplantaci kostní dřeně počet aktivovaných T buněk s CD154 stoupl na 12,5% z 6 586 buněk. U vyšetřované kontroly bylo z 1 598 buněk 37,7% aktivovaných T lymfocytů.

Z provedeného testu na detekci CD154 je patrné, že jsou u něho přítomny T lymfocyty exprimující tuto molekulu. Pokud nedojde k neočekávaným komplikacím, je pacient kauzálně vyléčen.

4. 3 Vyšetření pacientů s CVID



Ilustrace 14: Výsledky vyšetření pacientů s CVID ze dne 12.3.2007

Bylo vyšetřeno 6 pacientů s CVID, u kterých bylo podezření, že příčinou jejich nízkých hodnot protilátek může být deficit CD154. Buňky s molekulou CD154 se vyskytují v levém horním kvadrantu. Vyšetření ukázalo, že u všech šesti pacientů byly přítomny buňky s touto molekulou, takže příčina nízkých hodnot protilátek je jiná než z důvodu deficitu buněk s CD154.

Naměřené hodnoty:

- pacient č.1: 43,5%
- pacient č.2: 29,8%
- pacient č.3: 39,9%
- pacient č.4: 23,1%
- pacient č.5: 44,3%
- pacient č.6: 55,3%

Nejnižší naměřená hodnota buněk s CD154 je 23,1%, nejvyšší pak 55,3%.
Průměrná hodnota je 39,32%.

5. Závěr

Metoda stanovení CD154-CD40 L byla úspěšně zavedena do laboratoře Ústavu imunologie, kde se bude dále využívat. Díky této metodě je možné sledovat obnovu imunitního systému pacienta O.Z.P. po transplantaci kostní dřeně. Metoda umožňuje objasnění nízkých hladin protilátek u pacientů s CVID, pokud je možnou příčinou deficit povrchové molekuly CD154, a případně záchyt dalšího případu ojedinělého onemocnění HIGM.

Seznam použité literatury

- [1] Assari T:Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of C.*Med Immunol* 5:4 (2006)
- [2] Bachmann MF, Hunziker L, Zinkernagel RM, Storni T, Kopf M.:Maintenance of memory CTL responses by T helper cells and CD40-CD40 ligand.:*Eur J Immunol* 34:2, 317-26 (2004)
- [3] Bartůňková J,Paulík M a kol.:*Vyšetřovací metody v imunologii*. První vydání, GRADA, Praha, 2005.
- [4] Bernstein RM, Mills FC, Mitchell M, Max EE:Complex mechanisms for inhibition of immunoglobulin gene expression in a ge.*Mol Immunol* 41:1, 63-72 (2004)
- [5] Blanco-Quiros A, Solis-Sanchez P, Garrote-Adrados JA, Arranz-Sanz E:Common variable immunodeficiency. Old questions are getting clearer.*Allergol Immunopathol* 34:6, 263-75 (2006)
- [6] Blom B, Spits H.:Development of human lymphoid cells.*Annu Rev Immunol* 24:287-320 (2006)
- [7] Brueckmann M, Hoffmann U, De Rossi L, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ,:Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein.*Cytokine* 26:3, 106-13 (2004)
- [8] Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA:Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects inv.*Curr Opin Hematol* 9:1, 30-5 (2002)
- [9] Carlsson G, Aprikyan AA, Ericson KG, Stein S, Makaryan V, Dale DC, Nordensk:Neutrophil elastase and granulocyte colony-stimulating factor receptor muta.*Haematologica* 91:5, 589-95 (2006)
- [10] Donini M, Fontana S, Savoldi G, Vermi W, Tassone L, Gentili F, Zenaro E, Fe:G-CSF treatment of Severe Congenital Neutropenia reverses neutropenia but d.*Blood* 20, (2007)
- [11] Etzioni A:Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance.*Cell Adhes Commun* 2:3, 257-60 (1994)
- [12] Hombach A, Kohler H, Rappl G, Abken H:Human CD4+ T cells lyse target cells

- via granzyme/perforin upon circumventi. *J Immunol.* 177:8, 5668-75 (2006)
- [13] Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie*. druhé vydání, TRITON, Praha, 2002.
- [14] Imai K, Catalan N, Plebani A, Marodi L, Sanal O, Kumaki S, Nagendran V, Woo: Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency. *J Clin Invest* 112:1, 136-42 (2003)
- [15] Jain A, Ma CA, Lopez-Granados E, Means G, Brady W, Orange JS, Liu S, Hollan: Specific NEMO mutations impair CD40-mediated c-Rel activation and B cell te. *J Clin Invest* 114:11, 1593-602 (2004)
- [16] Janda A, Šedivá A, Bartůňková J: *Imunodeficiency*. druhé vydání, GRADA, Praha, 2007.
- [17] Johansson MH, Hoglund P: The dynamics of natural killer cell tolerance. *Semin Cancer Biol.* 16:5, 393-403 (2006)
- [18] Kato M, Kimura H, Seki M, Shimada A, Hayashi Y, Morio T, Kumaki S, Ishida Y: Omenn syndrome--review of several phenotypes of Omenn syndrome and RAG1/RAG. *Allergol Int* 55:2, 115-9 (2006)
- [19] Krawczyk M, Reith W: Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified. *Tissue Antigens* 67:3, 183-97 (2006)
- [20] Krejsek J, Kopec O: *Klinická imunologie*. první vydání, NUCLEUS HK, Hradec Králové, 2004.
- [21] Lougaris V, Badolato R, Ferrari S, Plebani A: Hyper immunoglobulin M syndrome due to CD40 deficiency: clinical, molecular. *Immunol Rev* 203:, 48-66 (2005)
- [22] Manzotti CN, Liu MK, Burke F, Dussably L, Zheng Y, Sansom DM.: Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses o. *Eur J Immunol* 36:6, 1413-22 (2006)
- [23] Modi WS, Dean M, Seunanz HN, Mukaida N, Matsushima K, O'Brien SJ: Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene. *Hum Genet* 84:2, 185-7 (1990)
- [24] Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, Durandy A: Defects of class-switch recombination. *Allergy Clin Immunol* 117:4, 855-64 (2006)
- [25] Ozdemir O: Severe combined immune deficiency in an adenosine deaminase-deficient patient. *Allergy Asthma Proc* 27:2, 172-4 (2006)

- [26] Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveil:Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal. *Cell* 102:5, 565-75 (2000)
- [27] Roberts JL, Lengi A, Brown SM, Chen M, Zhou YJ, O'Shea JJ, Buckley RH:Janus kinase 3 (JAK3) deficiency: clinical, immunologic, and molecular anal. *Blood* 103:6, 2009-16 (2004)
- [28] Sobacchi C, Marrella V, Rucci F, Vezzoni P, Villa A:RAG-dependent primary immunodeficiencies. *Hum Mutat* 27:12, 1174-84 (2006)
- [29] Stiehm ER, Ochs HD. Winkelstein JA: *Immunological Disorders in Infants & Children*. 2004.
- [30] Suri-Payer E, Fritzsching B.:Regulatory T cells in experimental autoimmune disease.. *Springer Semin Immunopathol* 28:1, 3-16 (2006)
- [31] Wang HY, Wang RF.:Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 14, (2007)