

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Denisa Břízová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

POROVNÁNÍ PŘÍSTUPU AKTIVACE T-LYMFOCYTŮ

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková, Ph. D.

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Denisa BŘÍZOVÁ**
Osobní číslo: **Z18B0126P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Porovnání přístupu aktivace T-lymfocytů**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. Základy imunologie. 6. aktualizované vydání. vyd. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
- KREJSEK, Jan. Imunologie člověka. První. Hradec Králové: Garamon s.r.o, 2016. ISBN 978-80.86472-74-4.
- ČIHÁK, Radomír. Anatomie 1. Vydání druhé, upravené a doplněné. Praha: Grada, 2001. ISBN 978-80-247-3817-8.
- SEDLÁČEK, Petr a Petr Říha, 2014. Alogenní transplantace kmenových buněk v léčbě maligních onemocnění krve u dětí. Onkologie. 8(3), 121-123. ISSN 18024475, 18035345.
- BURMESTER, Gerd-Rüdiger a Antonio PEZUTO. Color Atlas of Immunology. vyd. Stuttgart: Thieme, 1998. ISBN 3-13-126741-0.

Vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Miroslava Čedíková, Ph.D.**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

V Plzni dne 29. ledna 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 2. 2021

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Břízová Denisa

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Porovnávání přístupu aktivace T-lymfocytů

Vedoucí práce: MUDr. Miroslava Čedíková Ph.D.

Počet stran – číslované: 43

Počet stran – nečíslované: 17

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 33

Klíčová slova: imunitní systém, T-lymfocyty, GvHD, IncuCyte, CD molekuly

Souhrn:

T-lymfocyty jsou nepostradatelnou částí našeho imunitního systému, zároveň se ale jedná i o typ imunitních buněk, které jsou zodpovědné za vznik reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) po transplantaci krvetvorných buněk. Pokud by bylo předem známo, k jaké míře aktivování T-lymfocytů po transplantaci dojde, bylo by možné efektivněji předcházet či alespoň mírnit projevy této komplikace. Tato bakalářská práce se zabývá tematikou porovnání míry aktivace T-lymfocytů pomocí specifických látek – interleukin 2, interleukin 15, DynaBeads CD3/CD28 a jejich vzájemných kombinací. Průběh aktivace byl sledován v reálném čase na přístroji IncuCyte®. Cílem práce byla identifikace nejvhodnější látky či kombinace látek k aktivaci T-lymfocytů a také zhodnocení, zda je přístroj IncuCyte® vhodný ke sledování a analýze tohoto děje.

Abstract

Surname and name: Břízová Denisa

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Comparison of activation methods of T-lymphocytes

Consultant: MUDr. Miroslava Čedíková Ph.D.

Number of pages – numbered: 43

Number of pages – unnumbered: 17

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 33

Keywords: Immune system, T-lymphocytes, GvHD, IncuCyte, CD molekules

Summary:

T-lymphocytes are an indispensable part of our immune system. At the same time, however, they are also the immune cell type responsible for the development of graft versus host disease, a complication that can occur after transplantation of hematopoietic stem cells. If the rate of activation of T-lymphocytes was known in advance, it would be possible to prevent or moderate the manifestation of this complication. This bachelor's thesis deals with the comparison of T-lymphocytes activation rate by using specific substances – interleukin 2, interleukin 15, DynaBeads CD3/CD28 and their reciprocal combinations. The activation progress was observed in real-time by using the IncuCyte® device. The aim of this thesis was to identify the most suitable substance or the combination of substances to activate the T- lymphocytes and to evaluate whether the IncuCyte® device is convenient to observe and analyze this process.

Předmluva

Bakalářskou práci jsem psala se zájmem o téma. Histologie i imunologie mi přišly zajímavé a hodiny s paní doktorkou Čedíkovou mě vždy bavily. Proto jsem ji poprosila, zda by mi vedla bakalářskou práci a společně jsme vybraly téma. Chtěla jsem pracovat na zajímavém experimentu, který by se dal použít i do klinické praxe. Myslím si, že práce splnila svůj účel a jsem ráda, že jsem si toto téma a paní doktorku vybrala.

Poděkování

Chtěla bych moc poděkovat vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Miroslavě Čedíkové, PhD., za její čas, který vložila do této práce, za poskytování rad a odborných materiálů, za kontrolu práce a také za její trpělivost. Dále bych jí chtěla poděkovat za to, že mi pomohla s prací na experimentu a dovolila mi pracovat v laboratořích Biomedicínského centra v Plzni.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1. IMUNITNÍ SYSTÉM ČLOVĚKA.....	16
1.1 Složky imunitního systému	16
1.1.1 Lymfatické tkáně a orgány	16
1.1.2 Buňky imunitního systému (imunocyty)	19
1.1.3 Molekuly imunitního systému	21
1.2 T – lymfocyty	26
1.2.1 Vývoj T-lymfocytů	26
1.2.2 T buněčný receptor	27
1.2.3 Subtypy T-lymfocytů.....	27
1.3 Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)	30
1.3.1 Typy reakce štěpu proti hostiteli	30
1.3.2 Výskyt reakce štěpu proti hostiteli	31
1.3.3 Patofyziologie reakce štěpu proti hostiteli.....	32
1.3.4 GvHD a rizikové faktory	32
1.3.5 Léčba GvHD.....	33
PRAKTICKÁ ČÁST	35
2 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	35
2.1 Hlavní cíl	35
2.2 Dílčí cíle	35
3 METODIKA PRÁCE	36
3.1 Izolace mononukleárních buněk.....	36
3.2 Rozmrazení buněk	37
3.3 Příprava povrchu destičky	38
3.4 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	38
3.5 Přístroj IncuCyte.....	40
3.6 Stimulace T-lymfocytů	41
3.7 Analýza výsledků	43
4 VÝSLEDKY	44
5 DISKUZE	54
6 ZÁVĚR.....	57

SEZNAM LITERATURY.....	58
------------------------	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 1	47
Graf 2 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 2	47
Graf 3 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 3	48
Graf 4 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 4	48
Graf 5 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 5	49
Graf 6 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 6	49
Graf 7 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 7	50
Graf 8 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 8	50

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Kostní dřev (histologický obrázek)	17
Obrázek 2 - Brzlík (histologický obrázek)	18
Obrázek 3 - Slezina (histologický obrázek)	19
Obrázek 4 - Buňky imunitního systému	20
Obrázek 5 – Příklady CD molekul	22
Obrázek 6 – Imunoglobuliny	23
Obrázek 7 – Příznaky akutní GvHD.....	31
Obrázek 8 – Příznaky chronické GvHD	31
Obrázek 9 – Separace buněk	37
Obrázek 10 – Burkerova komůrka.....	38
Obrázek 11 – Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28.....	39
Obrázek 12 - Schéma přípravy Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28	40
Obrázek 13 - Schéma připravené destičky (dárce 1, 2, 3).....	41
Obrázek 14 - Schéma připravené destičky (dárce 4, 5, 6).....	42
Obrázek 15 - Schéma připravené destičky (dárce 7, 8).....	42
Obrázek 16 - Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte®.....	43
Obrázek 17 - Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® se stimulovanými T-lymfocyty.....	43
Obrázek 18 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 1 (růžová barva), dárce 2 (žlutá barva) a dárce 3 (zelená barva).....	44
Obrázek 19 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 4 (růžová barva), dárce 5 (žlutá barva) a dárce 6 (zelená barva).....	45
Obrázek 20 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 7 (růžová barva) a dárce 8 (žlutá barva)	45
Obrázek 21 - Porovnání aktivace T-lymfocytů v čase 72 hod u kontrolního vzorku (A), dárce 3 (B) a dárce 4 (C).....	51
Obrázek 22 - Konfluence T-lymfocytů v čase 0 a 120 hod.....	52

SEZNAM ZKRATEK

aGvHD	akutní reakce štěpu proti hostiteli
BCR	receptory B lymfocytů
CD molekuly	jednotné označení antigenů molekul na povrchu buněk (cluster of differentiation)
cGvHD	chronická reakce štěpu proti hostiteli
DAMPs	Danger-Damage Associated Molecular Pattern
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FBS	fetální bovinní sérum
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (Graft-versus-host disease)
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN	interferon
Ig	protilátky (imunoglobuliny)
IgA	imunoglobuliny třídy A
IgD	imunoglobuliny třídy D
IgE	imunoglobuliny třídy E
IgG	imunoglobuliny třídy G
IgM	imunoglobuliny třídy M
IL-1 až IL-38	interleukiny 1-38
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility komplex)
MHC gp 1	hlavní histokompatibilní komplex 1. třídy
MHC gp 2	hlavní histokompatibilní komplex 2. třídy
NK buňky	přírozený zabíječ (natural killer cell)
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PRRs	Pattern Recognition Receptors
T _C lymfocyty	cytotoxické T lymfocyty
TCR	receptory T lymfocytů
TGF	transformující růstové faktory

T_H lymfocyty pomocné T lymfocyty
T_{H1} lymfocyty subpopulace pomocných T lymfocytů
T_{H2} lymfocyty subpopulace pomocných T lymfocytů
TNF faktor nekrotizující nádory
T_{REG} lymfocyty regulační T-lymfocyty

ÚVOD

Imunitní systém představuje jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu. Jeho nedílnou součástí jsou T-lymfocyty, které spolupracují s vrozenou imunitou, regulují a řídí diferenciaci B-lymfocytů po stimulaci antigenem, zajišťují specifickou cytotoxickou reaktivitu a podporují fagocytární mechanismy. Zároveň se ale jedná i o typ imunitních buněk, které jsou zodpovědné za vznik reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) po transplantaci krvetvorných buněk. Pokud by bylo předem známo, k jaké míře aktivování T-lymfocytů po transplantaci dojde, bylo by možné efektivněji předcházet či alespoň mírnit projevy GvHD.

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat různé druhy specifických aktivátorů T-lymfocytů a sledovat proces aktivování v reálném čase na přístroji IncuCyte®. Dalším cílem práce bylo zhodnocení, zda je přístroj IncuCyte® vhodný ke sledování a analýze tohoto procesu.

V teoretické části bakalářské práce je uvedena základní charakteristika imunitního systému, podrobněji je zpracována problematika T-lymfocytů, a to i z pohledu reakce štěpu proti hostiteli.

Praktická část se věnuje porovnání efektu různých specifických aktivačních látek a jejich vzájemných kombinací na T-lymfocyty.

TEORETICKÁ ČÁST

1. IMUNITNÍ SYSTÉM ČLOVĚKA

Imunitní systém představuje jeden ze základních homeostatických mechanismů organismu. Mezi jeho hlavní funkce patří ochrana organismu proti škodlivinám zevního i vnitřního prostředí (obranyschopnost), schopnost rozpoznat vlastní struktury od cizích (autotolerance) a také odstraňování starých, poškozených nebo nádorově zmutovaných buněk (imunitní dohled). (Fellnerová a Fellnerová 2015)

1.1 Složky imunitního systému

Reakce imunitního systému jsou výsledkem souhry ve fungování jednotlivých typů imunitních buněk a molekul. Buňky imunitního systému společně s buňkami pojivové tkáně tvoří lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. (Hořejší a Bartůňková 2017)

V prvotním boji proti cizorodým látkám se uplatňuje nespecifická imunitní složka. Tato složka je vrozená a pro aktivaci nepotřebuje předešlý kontakt s antigenem. Na všechny cizorodé antigeny reaguje stejně a velmi rychle. Tvoří ji např. slizniční a kožní bariéry či buňky schopné fagocytózy.

Specifickou imunitu tvoří především protilátky tvořené B-lymfocyty. K tomu, aby specifická imunita fungovala, je zapotřebí předešlý kontakt s antigenem. Při prvním setkání se buňky aktivují a stanou se buňkami paměťovými, které při dalším kontaktu s identickým antigenem působí rychleji a mohutněji. Specifická imunita se rozvíjí až po narození. (Krejsek 2016)

1.1.1 Lymfatické tkáně a orgány

Jedná se o vysoce specializované tkáně, které obsahují velké množství prekurzorů lymfocytů, ale i řadu dalších buněk jako např. makrofágy.

Mezi primární lymfatické orgány řadíme kostní dřeň a brzlík (thymus). Jsou místem vzniku, diferenciací a zrání B a T-lymfocytů. B-lymfocyty vznikají i dozrávají v červené kostní dřeni, T-lymfocyty vznikají v červené kostní dřeni a dozrávají v thymu.

Mezi sekundární lymfatické orgány řadíme slezinu, lymfatické uzliny a slizniční lymfatickou tkáň (MALT – mucosa-associated lymphoid tissue). (Fontana 2014; Hořejší a Bartůňková 2017)

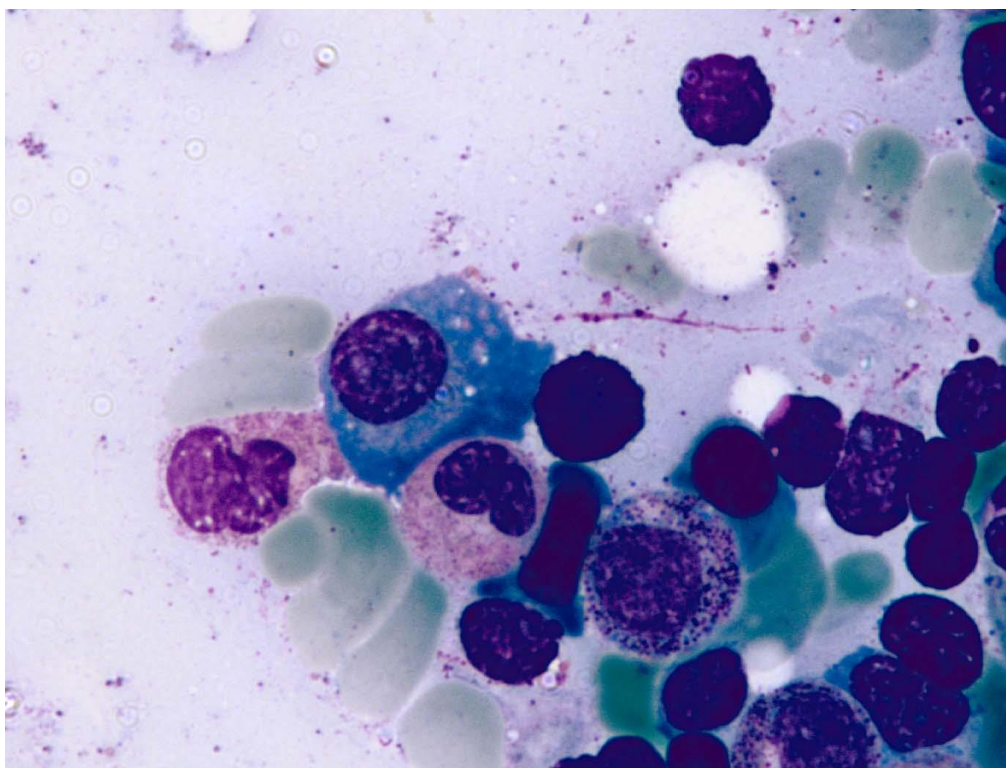
Kostní dřeň

Existují tři druhy kostní dřeně:

- **Červená kostní dřeň** – vzniká v ní většina červených i bílých krvinek a krevních destiček. V okamžiku narození je veškerá kostní dřeň červená, je hustě prostoupena vlásečnicemi. S rostoucím věkem červená kostní dřeň ubývá a je nahrazována žlutou. Červená kostní dřeň zůstává přítomna v plochých kostech, obratlích, pánvi a žebrech.
- **Žlutá kostní dřeň** – vzniká nahrazováním retikulárního vaziva červené dřeně tukovým vazivem. Tento typ se již na krvetvorbě nepodílí. (Čihák 2001)
- **Šedá kostní dřeň** – vzniká ve starším věku ze žluté díky úbytku tukového vaziva. Jedná se o nevratnou změnu a ani v tomto typu neprobíhá krvetvorba.

Na Obrázku 1 je vidět červená kostní dřeň s bohatým zastoupením různých krevních buněk.

Obrázek 1 - Kostní dřeň (histologický obrázek)



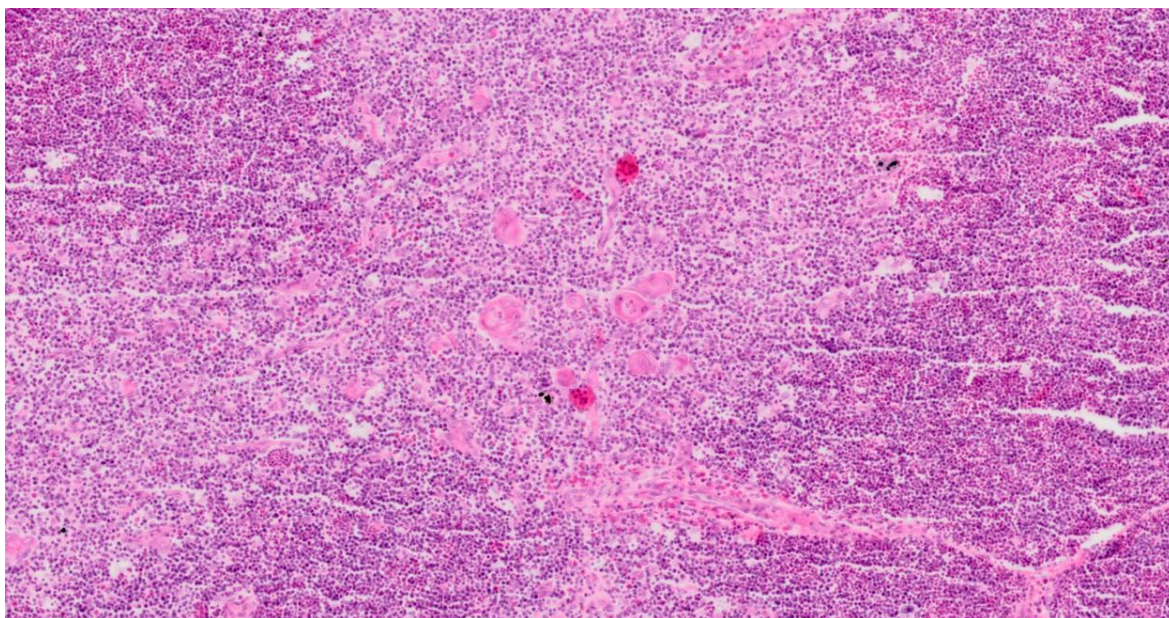
Zdroj: Vlastní

Brzlík

Brzlík (thymus) je plně vyvinutý a funkční již při narození, v pubertě je jeho tkáň postupně nahrazována tukovou tkání a vazivem, podléhá tedy involuci. Na povrchu thymu se nachází vazivové pouzdro (capsula), z něj vybíhají pruhy tkáně do vlastního parenchymu. Tato vazivová septa ho dělí na jednotlivé nepravé lalůčky. V pouzdru i v septech se nachází krevní a lymfatické cévy a nervy. Lalůček je rozdělen na 2 zóny, a to na kůru (cortex), což je část bohatá na malé lymfocyty, a na dřev (medulla), která je tvořena velkými lymfocyty a je bohatší na retikulární buňky. (Fontana 2014) Histologickou stavbu sleziny ilustruje Obrázek 2.

V thymu probíhá regulace tvorby, dozrávání a diferenciací T-lymfocytů. Jsou zde eliminovány jejich defektní a autoreaktivní klony.

Obrázek 2 - Brzlík (histologický obrázek)



Zdroj: Vlastní

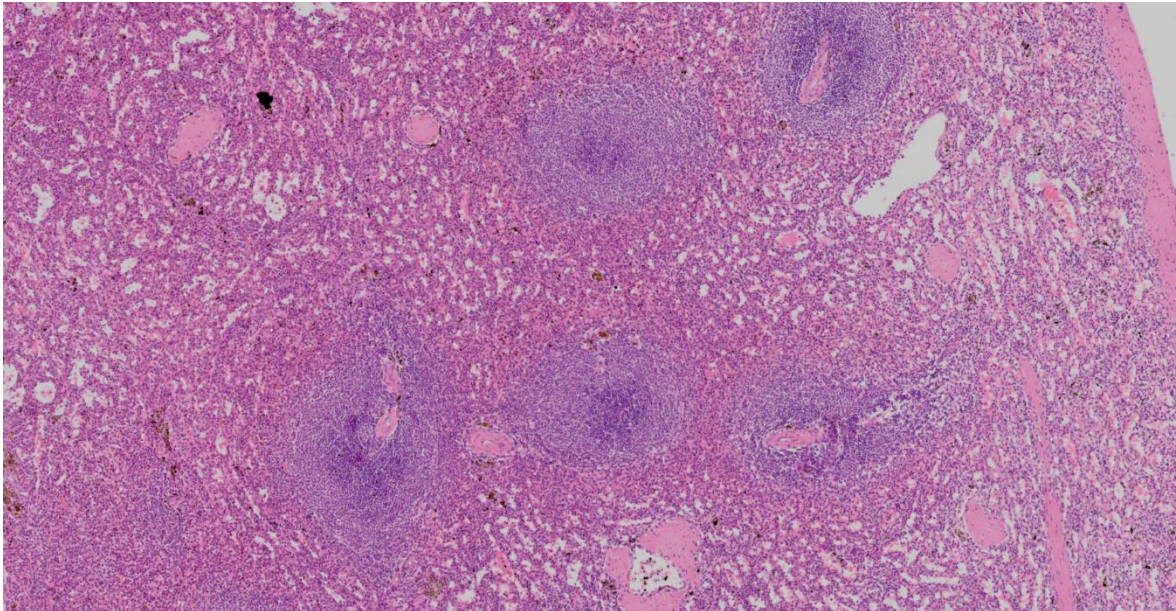
Slezina

Slezina je největším lymfatickým orgánem lidského těla. Na povrchu je kryta vazivovým pouzdem, které je ještě pokryto serózou. Parenchym sleziny je rozdělen na bílou a červenou pulpu. Bílá pulpa je tvořena provazci lymfatické tkáně. Červená pulpa je tvořena sinusoidami a Billrothovými provazci. Mezi červenou a bílou pulpou nalezneme marginální

zónu bohatou na makrofágy. (Fontana 2014) Histologickou stavbu sleziny ilustruje Obrázek 3.

Nejdůležitější funkcí sleziny je tvorba lymfocytů a destrukce erytrocytů, slouží zároveň i jako krevní rezervoár.

Obrázek 3 - Slezina (histologický obrázek)



Zdroj: Vlastní

Lymfatické uzliny

Lymfatické uzliny se nachází v průběhu lymfatických cév. Jedná se o opouzdřený orgán sloužící jako “filtr“ lymfy. Na povrchu je kůra s B-lymfocyty a dendritickými buňkami. Uvnitř je uzlina tvořena dření s B-lymfocyty, makrofágy a plazmatickými buňkami. Mezi kůrou a dření je parakortikální zóna s hojným množstvím T-lymfocytů. (Fontana 2014)

1.1.2 Buňky imunitního systému (imunocyty)

Jednu ze základních částí imunitního systému tvoří bílé krvinky (leukocyty). Vznikají z hematopoetické kmenové buňky v kostní dřeni. Z této buňky se diferencuje lymfoidní či myeloidní progenitor (Obrázek 4).

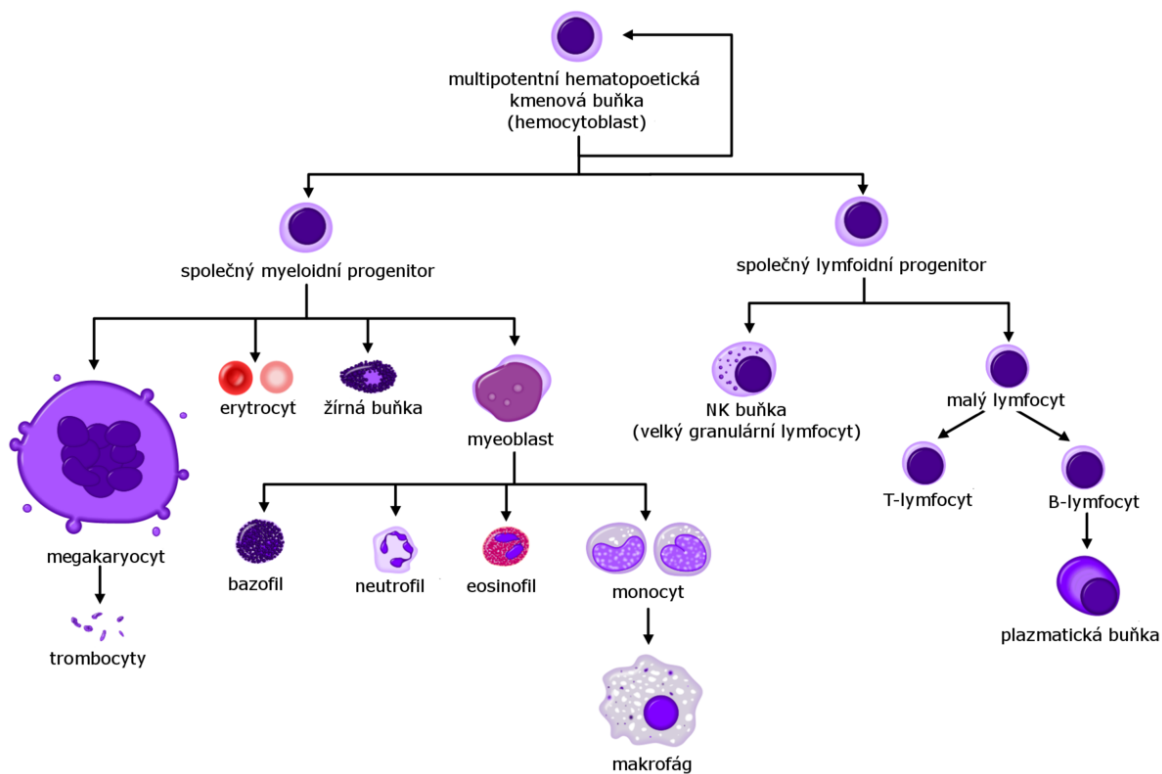
Z myeloidní linie se diferencují monocyty (cirkulují v krvi, ve tkáních se mění na makrofágy) a granulocyty (neutrofilů, bazofilů a eosinofilů). Dále sem patří dendritické

buňky a žírné buňky (mastocyty). Všechny tyto buňky jsou součástí nespecifické části imunitního systému, většina z nich je schopna fagocytózy a jsou producenty různých cytokinů. Dendritické buňky, makrofágy i monocyty dokáží na svém povrchu prezentovat antigen pro T lymfocyty, a proto jsou součástí i antigeně specifické imunity. Z myeloidní linie pochází také erythrocyty a trombocyty, ty ale už nepatří k imunitnímu systému.

Z lymfoidní linie jsou odvozeny NK buňky, B a T lymfocyty. Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a poté v sekundárních lymfatických orgánech, kde dochází k setkání s antigenem a dokončení jejich diferenciaci. Posledním stádiem ve vývoji B lymfocytů je plazmatická buňka, která je schopna produkce protilátek. T lymfocyty se vyvíjejí v brzlíku, kde vznikají nejprve prekurzory pomocných T buněk (T_H) a prekurzory cytotoxických T buněk (T_C). Tyto prekurzory se diferencují na zralé efektorové buňky po setkání s antigenem na povrchu antigen prezentujících buněk (APC).

Část B a T lymfocytů aktivují sekundární odpověď, která je mnohem rychlejší a efektivnější než primární. Sekundární odpověď zajišťují tzv. paměťovými lymfocyty, které tvoří naši imunologickou paměť. (Hořejší a Bartůňková 2017)

Obrázek 4 - Buňky imunitního systému



Zdroj: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Hematopoeza.png>

1.1.3 Molekuly imunitního systému

Jedná se o heterogenní skupinu látek glykoproteinové povahy nacházející se v imunitních tkáních a buňkách, která se uplatňuje při nespecifických i specifických imunitních reakcích. Vyskytují se na membránách buněk (receptory, MHC molekuly), nebo i volně v tělních tekutinách (protilátky, cytokiny). Mezi hlavní funkce těchto molekul patří zprostředkování komunikace mezi imunocyty, signalizace přítomnosti nežádoucích buněk a účast v imunitních reakcích. (Fellnerová a Fellnerová 2015)

Některé z molekul imunitního systému budou popsány v následujících kapitolách.

CD molekuly

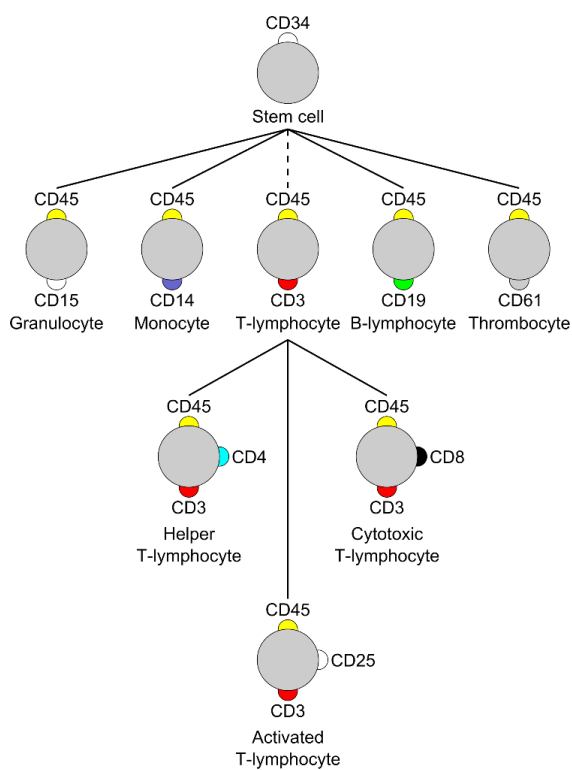
CD (cluster designation, cluster of differentiation) je jednotné označení molekul na povrchu buněk, které mají stejný epitop (antigenní determinantu). Tyto molekuly zastávají různé funkce, např. se jedná o receptory, adhezivní molekuly či chemokiny. Podle toho, zda buňka obsahuje příslušnou CD molekulu, se označuje jako CD⁺, nebo CD⁻. (Burmester a Pezuto 2003)

Příklady CD molekul:

- CD1 – u dendritických buněk
- CD4 – na pomocných T_H lymfocytech
- CD8 – na cytotoxických T_C lymfocytech
- CD28 – u regulačních T lymfocytů (T_{REG})

Další příklady CD molekul zobrazuje Obrázek 5.

Obrázek 5 – Příklady CD molekul



Zdroj:

https://cs.wikipedia.org/wiki/Diferencia%C4%8Dn%C3%AD_skupina#/media/Soubor:Cluster_of_differentiation.svg

Receptory leukocytů

Jedná se o membránové glykoproteiny, které po navázání specifické molekuly (ligandu) spouští imunitní odpověď. Receptory mohou být vázané na membránu, nebo jsou volně rozptýlené v cytoplazmě. Z hlediska specifity rozlišujeme dvě základní skupiny receptorů.

První skupinu tvoří tzv. nespecifické receptory vrozené imunity - PRRs (Pattern Recognition Receptors), jenž rozeznávají tzv. PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), určité molekuly nacházející se u patogenů. Takovým receptorem je například manózový receptor, který detekuje cukerné zbytky ve stěně bakterií. Dále PRR rozpoznává např. molekuly přítomné na vlastních, ale poškozených buňkách = tzv. DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern).

Druhou skupinu zastupují specifické receptory adaptivní imunity, které se vyznačují vysokou variabilitou. Řadíme sem receptory B lymfocytů (BCR) a T lymfocytů (TCR). (Hořejší a Bartůňková 2017)

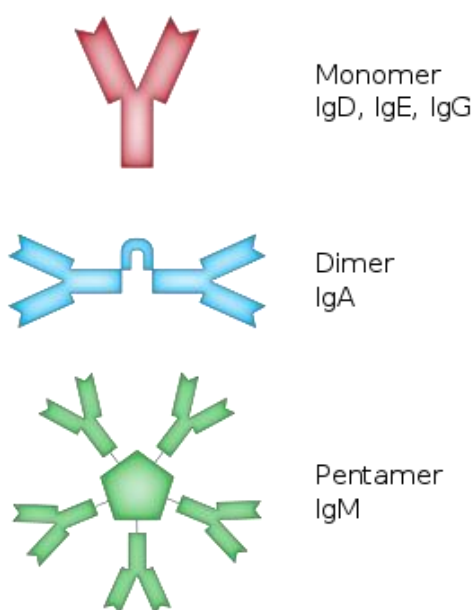
Protilátky (imunoglobuliny)

Protilátky jsou vytvářeny plazmatickými buňkami. Jedná se o glykoproteiny, jejichž hlavním cílem je zneškodnění cizorodé molekuly. Protilátky tyto cizorodé molekuly rozpoznají a označí je pro další složky imunitního systému.

Molekula imunoglobulinu je složena ze dvou lehkých (krátkých) polypeptidických řetězců a ze dvou těžkých (dlouhých) polypeptidických řetězců. Lehké řetězce jsou typu kappa nebo lambda. Těžkých řetězců existuje pět typů a to α , δ , ϵ , γ a μ . Podle typu těžkého řetězce rozdělujeme protilátky do pěti izotypů na IgA, IgG, IgD, IgE, a IgM. Obrázek 6 ukazuje strukturu jednotlivých imunoglobulinů.

Základem všech imunochemických reakcí je interakce mezi protilátkou (imunoglobulinem) a antigenem. Antigen se váže místem zvaným epitop na místo imunoglobulinu, které se označuje jako paratop. Společně tvoří protilátkově-antigenní komplexy, tzv. imunokomplexy. (Nydegger 1998)

Obrázek 6 – Imunoglobuliny



Zdroj: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Protil%C3%A1tka#/media/Soubor:Mono-und-Polymere.svg>

MHC proteiny

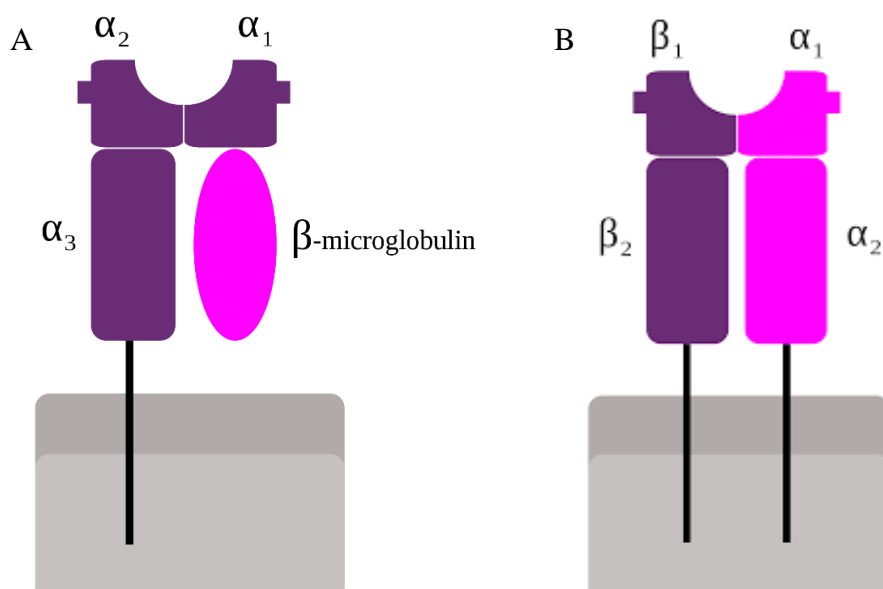
MHC proteiny (Major Histocompatibility Complex) jsou systémem rozeznávající cizorodé látky od vlastních struktur. U lidí je soubor genů, které rozeznávají povrchové molekuly umístěné v plazmatické membráně buněk, nazýván HLA (Human Leucocyte Antigen).

Rozlišujeme 2 třídy MHC glykoproteinů. MHC I. třídy najdeme na všech jaderných buňkách organismu. MHC II. třídy jsou přítomny na buňkách prezentující antigen (např. dendritické buňky, monocyty, makrofágy). (Choo 2007)

MHC I. třídy se skládají ze dvou nekovalentně asociovaných polypeptidových řetězců (α a β). Transmembránový řetězec α je složen ze tří podjednotek (α_1 , α_2 , α_3) (Obrázek 7A). Peptidy se vážou do místa mezi doménami α_1 a α_2 . (Bjorkman a Parham 1990)

MHC II. třídy jsou také složeny ze dvou nekovalentně asociovaných polypeptidových řetězců α a β . Oba transmembránové řetězce se skládají ze dvou podjednotek (Obrázek 7B). Vazebné místo pro peptidy se vytváří mezi podjednotkami α_1 a β_1 . (Engelhard 1994)

Obrázek 7 – Struktura MHC proteinů. A) MHC I. třídy, B) MHC II. třídy.



Zdroj:

https://cs.wikipedia.org/wiki/MHC_glykoprotein_I._1%C5%99%C3%ADdy#/media/Soubor:MHC_Class_1.svg a https://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:MHC_Class_2.svg

Komplement

Komplement je tvořen proteiny, které spolu kooperují a ovlivňují další imunitní mechanismy. Hlavní složky komplementu se označují C1 – C9. Vzniklé proteinové fragmenty po aktivaci jsou označovány malými písmeny. Menší fragment písmenem “a“ a větší fragment písmenem “b“. (Kopecký 2006)

Hlavní funkcí komplementového systému je opsonizace (proces, kdy je látka označena a určena k fagocytóze), chemotaxe (pohyb vyvolaný chemickými změnami okolí) a osmotická lýza. (Štefánek 2011)

Cytokiny

Cytokiny jsou proteiny umožňující vzájemnou komunikaci buněk lidského těla. Tyto signály podporují zrání, růst, diferenciaci nebo např. i apoptózu buněk. V těle se vyskytují v mizivých koncentracích. K jejich detekci se nejčastěji užívá ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). (Trebichavský 2013) Cytokiny často působí v kaskádě (ovlivňují se navzájem). Jejich způsob sekrece může být autokrinní (působí na buňku, která ho produkuje), parakrinní (na jiné buňky v těsné blízkosti) nebo i endokrinní (na vzdálené tkáni).

Klasifikace cytokinů

Cytokiny rozdělujeme do několika skupin.

- Interleukiny (IL-1 až IL-38) – regulují vývoj a aktivaci leukocytů.
- Chemokiny (IL-8) – cytokiny s chemotaktickou aktivitou.
- Interferony (IFN- α , $-\beta$, $-\gamma$) – regulátory imunity, jsou součástí antivirových obranných mechanismů.
- Transformující růstové faktory (TGF- α , $-\beta$).
- Faktory nekrotizující nádory (TNF- α , $-\beta$ – indukují apoptózu; TNF- γ – působí regulačně).
- Jiné růstové faktory (SCF, EPO, FGF, NGF). (Hořejší a Bartůňková 2017)

Cytokin může působit pouze na buňky, u nichž je pro něj přítomen receptor. Receptory jsou složeny z několika podjednotek (obvykle 2 – vazebná a signalizační podjednotka). (Turner et al. 2014)

1.2 T – lymfocyty

T-lymfocyty tvoří klíčovou populaci imunitních buněk, která kontroluje a řídí naprostou většinu funkcí imunitního systému. Jedná se o buňky přijímající podněty a informace od vrozené imunity, s níž následně spolupracují. Dále regulují a řídí diferenciaci B-lymfocytů po jejich stimulaci antigenem, zajišťují specifickou cytotoxickou reaktivitu a podporují fagocytární mechanismy. (Krejsek 2016)

1.2.1 Vývoj T-lymfocytů

Prekurzory T-lymfocytů se tvoří již intrauterinně v játrech a následně v kostní dřeni plodu. Selektce nezralých T-lymfocytů probíhá v brzlíku (thymus). Zde jsou těmto nezralým lymfocytům předkládány antigeny na epiteliálních buňkách. Pokud buňky nereagují na antigen, reagují příliš agresivně nebo reagují na tělu vlastní částice, jsou ihned likvidovány (toto se týká asi 95 % nezralých T-lymfocytů). Zbylé buňky putují do krevního řečiště a jsou vedeny do sekundárních lymfatických orgánů, kde se setkávají se specifickými antigeny.

Nezralý T-lymfocyt v thymu se označuje jako tzv. pro-thymocyt. Ten dále podléhá diferenciaci. Vzniká z něj časný thymocyt, který je dvojitě negativní - nenesení ani molekulu CD4, ani CD8 (CD4⁻, CD8⁻), naopak má přítomné znaky CD2 a CD7. Dochází i k vývoji TCR (T-buněčného receptoru). Následně v procesu genového přeskupení přechází thymocyt do stádia pozitivní obou koreceptorů CD4 a CD8 (CD4⁺ a CD8⁺). V další fázi vývoje prochází buňka tzv. pozitivní a negativní selekcí. Selektce probíhá současně s diferenciací T lymfocytu z dvojitě pozitivních (CD4⁺ CD8⁺) na CD4⁺CD8⁻, tedy pomocné, nebo CD4⁻CD8⁺ - cytotoxické T lymfocyty. (Krejsek 2016)

Když se T-lymfocyt dostane do krevního oběhu, podléhá další diferenciaci. Zde se setkává s antigenem a z naivní buňky se stane paměťová buňka, pro kterou je charakteristická prezentace antigenu CD45RO a CD29. (Burmester a Pezuto 2003)

Selektce T-lymfocytů v brzlíku

V brzlíku přicházejí T-lymfocyty do kontaktu s epiteliálními buňkami. Přežití buňky závisí na interakci mezi TCR a MHC molekulami na povrchu epiteliálních buněk. Pozitivní selektce je taková selektce, při které TCR nereaguje s HLA antigeny na povrchu antigen-prezentujících buněk. Tyto lymfocyty nejsou vpuštěny do oběhu a ihned podléhají apoptóze.

Naopak při negativní selekci se TCR váže příliš silně s komplexy HLA, jedná se o tzv. autoreaktivní klony. Tyto T-lymfocyty jsou také zničeny. (Burmester a Pezuto 2003)

1.2.2 T buněčný receptor

TCR je heterodimer, který se skládá z dvou transmembránových polypeptidových řetězců. Vyskytuje se ve formě TCR $\alpha\beta$, a ve formě TCR $\gamma\delta$. Většina buněk (až 98 %) má TCR s řetězcem alfa a beta.

TCR je kódován třemi genovými komplexy a to TCR- α (na chromozomu 14), TCR- β (na chromozomu 7) a TCR- γ (na chromozomu 7). Genový komplex TCR- α obsahuje tři oblasti: variabilní (V), spojovací (J) a konstantní (C). Variabilní a spojovací oblast je tvořena desítkami genů, zatímco konstantní oblast má pouze jeden gen. V komplexu TCR- β nalezneme navíc segment D.

Základní diverzita TCR receptorů vzniká na podkladě náhodných kombinací genových segmentů V, D a J a také náhodným vkládáním nukleotidů mezi tyto úseky. (Mak et al. 2014; Krejsek 2016)

1.2.3 Subtypy T-lymfocytů

U člověka se nachází více typů T-lymfocytů. Jejich funkce je dána rozdílnou produkcí CD molekul (viz 1.2.1), dále také rozdílným spektrem produkovaných cytokinů, tkáňovou lokalizací, četností a životností. (Fellnerová a Fellnerová 2015)

Pomocné CD4⁺ T-lymfocyty

Pomocné T-lymfocyty podporují diferenciaci B-lymfocytů v plazmatické buňky, které následně produkují protilátky proti proteinovým antigenům. Podporují také makrofágy v jejich schopnostech ve fagocytóze, řídí cytotoxickou aktivitu cytotoxických (CD8⁺) T lymfocytů, zajišťují migraci neutrofilů, bazofilů a eosinofilů do místa zánětu. (Krejsek 2016) Populace T_H-lymfocytů není homogenní a existuje řada funkčně odlišných buněčných typů. (Krejsek 2016)

T_{H1}-lymfocyty

T_{H1}-lymfocyty podporují funkci makrofágů, cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů a NK buněk. K tomu, aby se z naivního T_H-lymfocytu stal specifický (T_{H1}) lymfocyt, dochází vlivem speciálního cytokinového prostředí s přítomností IL-12, IL-18 a INF γ . (Krejsek 2016)

Jedná se také o podtyp, který hraje důležitou roli při odmítnutí transplantátu.

T_{H2}-lymfocyty

Tento podtyp má úlohu v modulaci tvorby protilátek. Hlavním cytokinem potřebným pro jejich diferenciaci je IL-4.

Tento podtyp T-lymfocytů je fyziologickou obranou proti mnohobuněčným parazitům, především helmintům. Patologicky se účastní alergické reakce. (Litzman 2015; Krejsek 2016)

T_{H17}-lymfocyty

Tyto lymfocyty se diferencují pod vlivem TGF- β a IL-6. Mají význam v obraně proti bakteriálním a houbovým patogenům. Jsou také spojovány se vznikem některých autoimunitních onemocnění. (Litzman 2015)

Dalšími podtypy T_H lymfocytů jsou např. T_{H22}, T_{H9} nebo regulační lymfocyty. (Krejsek 2016)

Cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty

Hlavní úlohou cytotoxických lymfocytů je apoptotická likvidace nádorových, stresovaných a intracelulárními parazity infikovaných buněk. Ke své aktivaci vyžadují cytokiny, které produkují pomocné T-lymfocyty. Cytotoxický T-lymfocyt reaguje na peptidové antigeny prezentované v kontextu s molekulou HLA I. třídy. Celý proces likvidace patologické buňky se skládá z rozpoznání cílové buňky – specifického antigenu, aktivace T_C-lymfocytu, exocytózy proapoptotických molekul (granula s perforiny, granzymy), odpoutání T_C-lymfocytu od cílové buňky a zániku cílové buňky. (Krejsek 2016)

Paměťové T-lymfocyty

Vytvoření imunologické paměti je jedním ze základních rysů specifické imunity. Díky vytvořené paměti dochází při opakovaném kontaktu s patologickým podnětem k vyvolání rychlejší a účinnější imunitní odpovědi. Této vlastnosti našeho imunitního systému je využíváno při vakcinaci. (Youngblood et al. 2017)

Nejvíce paměťových T-lymfocytů je vytvořeno v první dekádě života, kdy je lidský organismus nejvímavější k infekcím. Na konci druhé dekády života tvoří paměťové lymfocyty asi 35% z celkového počtu T-lymfocytů. (Krejsek 2016)

T-lymfocyty exprimující TCR $\gamma\delta$

TCR receptor je u těchto T-lymfocytů tvořen řetězci γ a δ . Jedná se o populaci, která je v periferní krvi minoritně zastoupena (pouze 5 % z T-lymfocytů), dále tento typ buněk nacházíme ve střevní sliznici, kůži, slezině a lymfatických uzlinách.

Jedná se o typ buněk, který je schopen podporovat tkáňové makrofágy, NK buňky, neutrofilní granulocyty a dendritické buňky.

Mají významnou roli v protinádorovém dozoru, při infekci *Mycobacterium tuberculosis* a *Plasmodium falciparum*, ale zároveň jsou sdruženy s patogenezi některých autoimunit. (Pamplona a Silva-Santos 2021; Kabelitz et al. 2020; Dunne et al. 2020)

NKT lymfocyty

Jedná se o malou populaci T-lymfocytů, které nesou na svém povrchu molekuly specifické pro T-lymfocyty i NK buňky. Jejich funkce je aktivační, regulační, ale mají i protinádorovou reaktivitu. (Krejsek 2016)

1.3 Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)

Reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease, GvHD) je jednou z hlavních komplikací při transplantaci krvetvorných buněk. Dochází při ní k imunologické reakci buněk transplantátu proti svému hostiteli. Hlavní podíl na jejím vzniku mají T-lymfocyty z darované kostní dřeně v kombinaci s oslabením imunitního systému příjemce vlivem imunosupresivní léčby. Pravděpodobnost výskytu této reakce se zvyšuje s počtem odlišností v HLA systému mezi dárcem a příjemcem transplantátu. Rozlišuje se akutní (aGvHD) a chronická (cGvHD) forma této reakce. (Mayer et al. 2007)

1.3.1 Typy reakce štěpu proti hostiteli

Akutní reakce štěpu proti hostiteli

Jedná se o reakci, která vznikne do 100. dne od alogenní transplantace. Nejčastěji bývá postižena kůže, játra či trávicí systém. Na kůži bývá nejčastěji přítomen erytém (zarudnutí) a exantém, a to zejména na dlaních, chodidlech, ale také na trupu či končetinách. Na kůži se mohou objevovat i puchýře a v závažných případech může docházet až k odlupování kůže. Při postižení gastrointestinálního traktu pacient pociťuje nevolnost, zvrací, má průjem a ztrácí chuť k jídlu. (Shlomchik 2007)

Na Obrázku 7 jsou souhrnně zobrazeny příznaky akutní GvHD.

Chronická reakce štěpu proti hostiteli

Chronická reakce nastává po uplynutí více jak 100 dní od transplantace. Dochází při ní k postižení zejména kůže, kloubů, úst a očí. Tato forma GvHD se může podobat některým autoimunitním onemocněním jako např. eozinofilní fasciitidě, sklerodermii či jinému kožnímu onemocnění, Sjögrenovu syndromu apod. Mohou být přítomny suché sliznice, spojivky, chronické kožní či jaterní změny. Akutní a chronická reakce mohou v sebe navzájem přecházet. (Shlomchik 2007)

Na Obrázku 8 jsou souhrnně zobrazeny příznaky chronické GvHD.

Obrázek 7 – Příznaky akutní GvHD

PŘÍZNAKY AKUTNÍ GvHD	
KŮŽE <ul style="list-style-type: none">- vyrážka- puchýře	ŽALUDEK <ul style="list-style-type: none">- nevolnost, která nepřechází- zvracení- bez chuti k jídlu- pocit přesycení
JÁTRA <ul style="list-style-type: none">- žloutenka- tmavá moč- svědění na břiše a nohou- bolest břicha	ZAŽIVÁNÍ <ul style="list-style-type: none">- průjem- plynatost, nafouklé břicho- krev ve stolici- nepřecházející bolest břicha

Zdroj: Vlastní

Obrázek 8 – Příznaky chronické GvHD

PŘÍZNAKY CHRONICKÉ GvHD	
KŮŽE A NEHTY <ul style="list-style-type: none">- slabá kůže- lámající se nehty- vyrážka- svědění- padání vlasů	ÚSTA A RTY <ul style="list-style-type: none">- popraskané rty- bolest
SVALY <ul style="list-style-type: none">- bolest svalů, křeče- bolest kloubů	PLÍCE <ul style="list-style-type: none">- kašel- bolest v krku- problémy s dýcháním
OČI <ul style="list-style-type: none">- suchost očí- svědivost očí- rozostřené vidění	TRÁVICÍ SYSTÉM <ul style="list-style-type: none">- nevolnost a zvracení- průjem- křeče a bolest žaludku
	GENITÁLIE <ul style="list-style-type: none">- vyrážka, bolest- bolestivý pohlavní styk

Zdroj: Vlastní

1.3.2 Výskyt reakce štěpu proti hostiteli

U transplantací od příbuzných dárců se GvHD rozvine asi v 26 – 34 % případů. U nepříbuzných dárců je reakce častější a vyskytuje se v 42 – 52 % případů. Reakce se objevuje průměrně po 21 – 25 dnech od transplantace. (Adam 2008)

1.3.3 Patofyziologie reakce štěpu proti hostiteli

Akutní GvHD

Akutní GvHD započne aktivací dárcovských T lymfocytů aloantigeny hostitele. Úvodním krokem je vyplavení prozánětlivých cytokinů IL-1 a TNF- α způsobené tkáňovým poškozením vlivem předtransplantační přípravy (chemoterapie). Cytokinové prostředí aktivuje příjemcovy antigen prezentující buňky a spustí kaskádu aktivací dalších buněk (NK-buňky, makrofágy). Aktivované makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny, které zpětně aktivují T-lymfocyty a NK buňky. Tím se zvyšuje množství cytokinů produkovaných především T_{H1} lymfocyty.

Aktivované CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty a NK buňky napadají přímo buňky příjemce. (Hromadníková 2001)

Chronická GvHD

Akutní i chronická GvHD postihuje stejné orgány, patofyziologickým mechanismem se ale odlišují. Zatímco pro aGvHD je charakteristická nekróza tkání, u cGvHD dominuje fibróza. Rozdíl je viditelný především u kožního postižení. U akutní formy probíhá nekróza epidermiálních buněk bazální vrstvy s minimálním lymfoidním infiltrátem v dermis. Pro chronickou formu je typická dermální fibróza a hojný lymfocytární a plazmocytární infiltrát. U cGvHD je klíčová role T_{H2} subpopulace, u které nedochází k navození tolerance. Jsou tedy nadále schopné rozpoznávat aloantigeny příjemce. (Hromadníková 2001)

T-lymfocyty jsou za normálních okolností diferencovány v thymu. Thymus ale může být v důsledku aGvHD poškozen, a tak nemůže proběhnout negativní selekce u autoreaktivních T-lymfocytů. Chronická GvHD a symptomy této formy vznikají v důsledku aloreaktivních T_{H2}-lymfocytů dárce, které produkují ve zvýšených koncentracích IL-4, IL-5 a IL-10. Zvýšená koncentrace IL-5 způsobuje eozinofilii typickou pro cGvHD, IL-4 stimuluje B-lymfocyty k tvorbě autoprotilátek, stimuluje i žírné buňky, které způsobují kožní změny podobné sklerodermii. (Hromadníková 2001)

1.3.4 GvHD a rizikové faktory

Výskyt GvHD závisí na shodě v antigenech HLA, počtu T-lymfocytů ve štěpu, věku pacienta, prevenci vzniku GvHD a také na pohlaví dárce nebo příjemce. Nejdůležitějším faktorem při výběru správného dárce je shoda v antigenech HLA.

To, že u starších pacientů se GvHD vyskytuje více, je vysvětlováno involucí thymu, ve kterém probíhá diferenciací T-lymfocytů. Poškozené tkáně starších pacientů se hojí pomaleji než u mladších jedinců.

Z dárcovství se doporučuje vyloučit jedince aloimunizované v důsledku transfúzí.

Pokud je dárkyní štěpu žena a příjemcem muž, je vyšší pravděpodobnost vzniku GvHD v důsledku rozpoznání pohlavně specifického minoritního histokompatibilního antigenu (H-Y). (Hromadníková 2001)

Hlavním kritériem pro výběr správného dárce je shoda v antigenech hlavního histokompatibilního systému dárce a příjemce. Jelikož se HLA dědí po rodičích, potomek má jeden haplotyp od otce a jeden od matky, je zde vyšší pravděpodobnost nálezu dárce v rodině – mají stejnou skupinu HLA genů.

Před transplantací se stanovuje:

- test k typizaci HLA dárce a příjemce – zahrnuje vyšetření HLA alel, které probíhá buď metodou serologickou, nebo DNA analýzou;
- screening HLA protilátek u příjemce, které by byly zaměřeny proti dárcovskému orgánu či tkáni;
- lymfocytární crossmatch s dárcovskými lymfocyty – tento test pomáhá zjistit, zda má potenciální příjemce protilátky namířené proti antigenům na povrchu dárcovských lymfocytů. Provádí se smícháním séra potenciálního příjemce s bílými krvinkami dárce.

Pokud příjemce tvoří protilátky proti HLA antigenům dárce, zvyšuje se pravděpodobnost odmítnutí (rejekce) transplantátu. (Flowers et al. 2011)

1.3.5 Léčba GvHD

Pacientovi je po transplantaci preventivně, především k navození imunotolerance, podáván cyklosporin A a methotrexát. Tato imunosupresiva se užívají obvykle 6-8 měsíců a pokud se neobjeví žádné příznaky GvHD, cyklosporin se vysadí. (Shlomchik 2007)

Pokud se u pacienta objeví projevy akutní reakce štěpu proti hostiteli, podávají se jako první kortikosteroidy. Ty ale nemusí být u některých typů GvHD účinné. Takové typy GvHD jsou označovány jako tzv. steroid rezistentní. Steroid rezistentní typ je léčebně komplikovanější a je doprovázen vyšší mortalitou. (Shlomchik 2007)

Pacientovi s chronickou reakcí štěpu proti hostiteli bývá podávána dlouhodobá dávka imunosupresiv, které zvyšují náchylnost ke vzniku bakteriálních i mykotických infekcí.

U rozvinuté reakce štěpu proti hostiteli se používá velmi agresivní léčba kombinací methotrexátu, kortikosteroidů a antithymocytárního globulinu. (Raida et al. 2007)

PRAKTICKÁ ČÁST

2 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

2.1 Hlavní cíl

Cílem naší práce bylo sledování aktivace T-lymfocytů v reálném čase pomocí přístroje IncuCyte® a posouzení vhodnosti přístroje IncuCyte® ke sledování tohoto děje.

2.2 Dílčí cíle

1. Porovnat různé druhy specifických aktivačních látek pro T-lymfocyty a také jejich vzájemné kombinace.
2. Určit látku s nejvyšším potenciálem ke specifické aktivaci T-lymfocytů a k využití pro navazující studie.
3. Stanovit potřebnou délku vystavení buněk aktivační látce.

3 METODIKA PRÁCE

3.1 Izolace mononukleárních buněk

Krev zdravých dárců byla odebrána do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Se vzorkem bylo pracováno v laminárním boxu, který umožňuje práci ve sterilním prostředí.

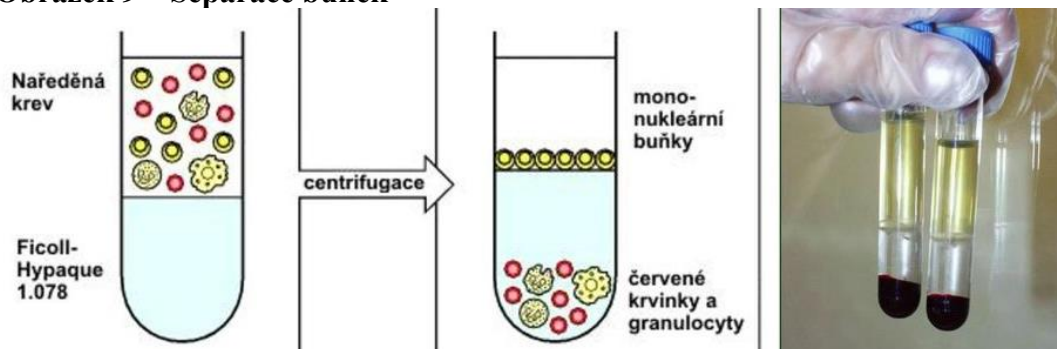
K oddělení jednotlivých typů krevních buněk do nezávislých vrstev bylo použito separační médium Ficoll-Paque, které funguje na principu hustotního gradientu (Obrázek 9).

Ficoll byl připraven do zkumavek o objemu 15 ml, do kterých bylo napipetováno po 6 ml separačního média Ficoll-Paque. Získaná plná venózní krev byla naředěna v poměru 1:1 s fosfátovým pufrům (PBS). Takto naředěná krev byla velmi pomalu navrstvena na připravený Ficoll-Paque tak, aby se krev s médiem nsmíchala. Poměr separačního média a krve byl 1:1 (6 ml krve bylo navrstveno na 6 ml připraveného média Ficoll-Paque). Takto připravené zkumavky byly dány do centrifugy a centrifugovány 30 minut při rychlosti 300g s rychlostí rozjezdu a brzdění na nule.

Pro jednodušší separaci buněk mohou být použity speciální separační zkumavky s přepážkou, která odděluje zkumavku na dvě komory. Spodní komora obsahuje separační médium, do horní komory se pipetuje vzorek krve. Díky těmto separačním zkumavkám je předcházeno riziku smíchání média a krve a tím se zvyšuje množství a životaschopnost izolovaných buněk. (GE Healthcare, 2010)

Po centrifugaci byly zkumavky přeneseny zpět do laminárního boxu a sérologickou pipetou byl odebrán bílý prstenec obsahující mononukleární buňky, který byl přenesen do nové zkumavky o objemu 50 ml. Objem v této zkumavce byl doplněn na 30 ml PBS a zkumavka byla opět centrifugována - rychlost 480g, čas 10 minut, stupeň rozjezdu a brzdy 9 (maximum).

Obrázek 9 – Separace buněk



Zdroj: <https://docplayer.cz/12831932-Metody-separace-bunek-funkcni-testy-lymfocytu-rndr-jan-lastovicka-csc-rndr-daniela-rozkova-phd-ustav-imunologie-2.html>

Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a získaná peleta buněk byla rozvolněna v 1 ml rozvolňovacího média (60 % albumin + 40 % PBS). Vzorek byl následně doplněn o kryomedium (0,5 ml vzorku v rozvolňovacím médiu bylo smícháno s 0,5 ml kryomédia - 40 % albumin + 40 % PBS + 20% DMSO) a vložen do mrazáku na teplotu -96°C . Takto bylo postupně zpracováno a připraveno všech 8 vzorků, které byly použity v navazující části experimentu.

3.2 Rozmrazení buněk

Poté, co bylo nashromážděno 8 vzorků mononukleárních buněk, bylo přikročeno k další fázi experimentu. Pro experiment byla potřeba všech těchto 8 vzorků rozmrazit.

Před začátkem rozmrazování buněk byla připravena vodní lázeň, která byla vytemperována na 37°C . V laminárním boxu bylo připraveno 8 zkumavek (v počtu odpovídajícím rozmrazovaným vzorkům), do každé zkumavky bylo dáno 5 ml vytemperovaného kultivačního média (na 37°C) určeného pro T-lymfocyty. Bylo používáno RPMI médium suplementované fetálním bovinním sérem (10 %, FBS) a antibiotiky (1 %, streptomycin a penicilin).

Zamrazené alikvóty s buňkami byly vyndány z mrazáku a vloženy do vodní lázně. Po rozmrazení jejich obsahu byly přeneseny do pracovního boxu. Do každé zkumavky s buňkami byl přidán 1 ml vytemperovaného média z připravených 15 ml zkumavek. Následně byl celý obsah alikvótů přenesen do připravených 15 ml zkumavek ke zbývajcímu vytemperovanému médiu. Zkumavky byly následně centrifugovány při rychlosti 360g po dobu 6 minut. Buňky byly centrifugovány kvůli oddělení média, ve kterém byly zamrazeny, jelikož jeho součástí je i toxický dimethylsulfoxid (DMSO).

Po stočení buněk byl odstraněn veškerý supernatant nad buněčnou peletou a ta byla rozvolněna v 2 ml kultivačního média vytemperovaného na 37°C. Pomocí Burkerovy komůrky (Obrázek 10) byla spočítána koncentrace buněk a upravena do finální koncentrace 250 000 buněk/ml média. S touto koncentrací buněk bylo připraveno 10 ml média.

Obrázek 10 – Burkerova komůrka



Zdroj: <https://www.p-lab.cz/komurka-pocitaci-a-skla>

3.3 Příprava povrchu destičky

Pro samotný experiment v přístroji IncuCyte® (bude popsán dále) bylo potřeba upravit povrch kultivačních destiček, a to pomocí Poly-L-lysinu (SigmaAldrich, Missouri, USA). Tato úprava umožní, aby buňky k povrchu destičky lépe přisedly a mohly být za pomoci přístroje IncuCyte® snímány.

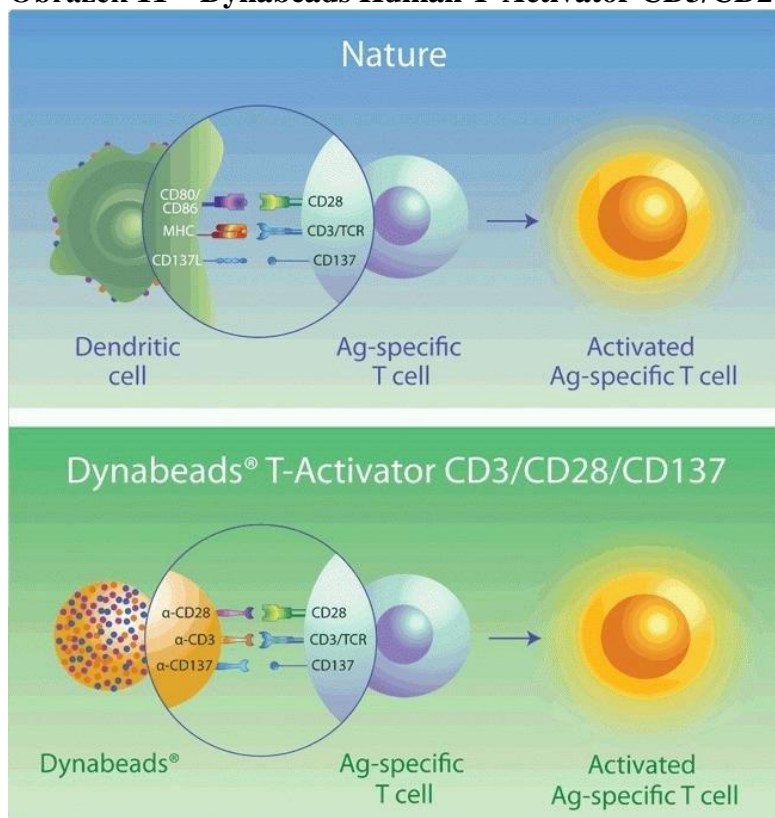
Povrch 96 jamkové destičky byl ošetřen Poly-L-lysinem v množství 50 μ l/jamka (koncentrace 5 mg/ml). Po 10 minutách byla přebytečná tekutina odsáta a povrch destičky byl ponechán 60 minut v laminárním boxu, aby došlo k jeho vyschnutí. Tímto způsobem byly připraveny 3 destičky, které byly použity v experimentu.

3.4 Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28

Dynabeads CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) je lidský aktivátor CD4⁺ nebo CD8⁺ T-lymfocytů T-lymfocytů. Jedná se o magnetické kuličky o

velikosti 4,5 μm , které mají na svém povrchu monoklonální protilátky proti molekulám CD3 a CD28 antigenům, které se vyskytují na T-lymfocytech. Obě protilátky jsou třídy IgG a napodobují stimulaci s APC (antigen prezentující buňky). Mechanismus funkce znázorňuje Obrázek 11.

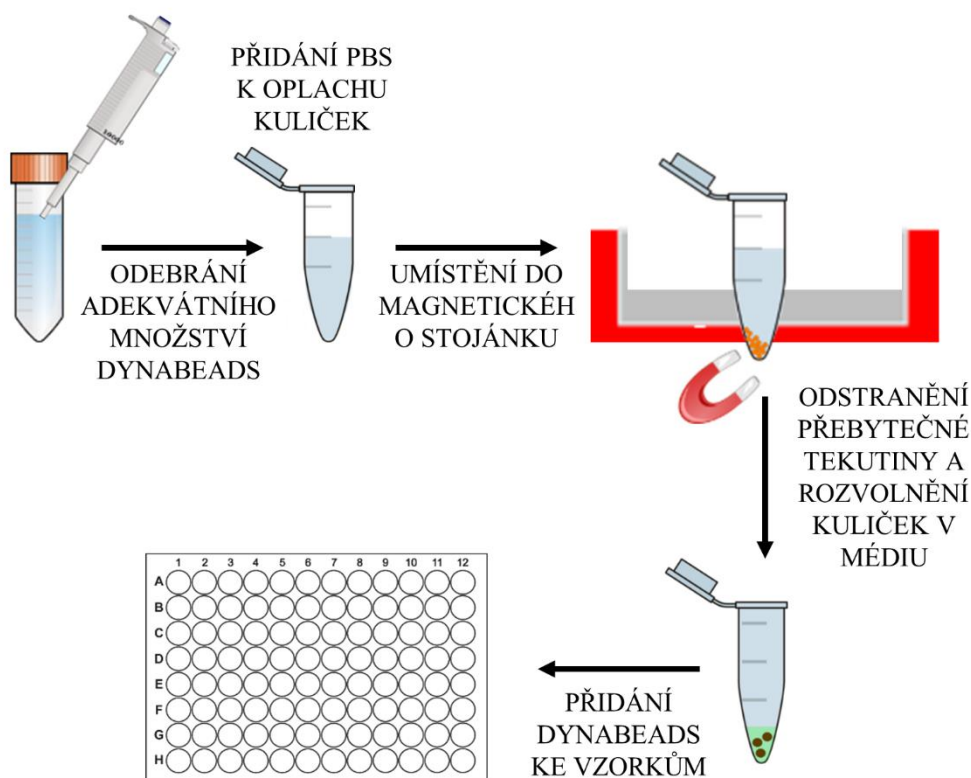
Obrázek 11 – Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28



Zdroj: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11162D#/11162D>

Příprava tohoto aktivátoru probíhala dle firemního manuálu. Ze zásobní lahvičky bylo odebráno a přeneseno do zkumavky adekvátní množství Dynabeads, k nim byl přidán 1 ml PBS a vzniklá suspenze byla důkladně promíchána. Následně byla zkumavka umístěna do magnetického stojánku, kde došlo k oddělení Dynabeads od zbylé tekutiny, která byla ze zkumavky odpipetována. Poté byla zkumavka vyndána ze stojánku, bylo přidáno 100 μl kultivačního média a Dynabeads byly rozpipetovány v adekvátním množství do připravených destiček ke vzorkům. Schéma přípravy zobrazuje Obrázek 12.

Obrázek 12 - Schéma přípravy Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28



Zdroj: Vlastní

3.5 Přístroj IncuCyte

Monitorovací systém IncuCyte® (IncuCyte Live-Cell Analysis System, Essen BioScience, Ltd., Velká Británie) umožňuje monitorování buněk v reálném čase. V přístroji je možné sledovat jak neadherentní typy buněčných kultur, tak adherentní. Buňky vložené do přístroje, který funguje zároveň jako inkubátor, jsou v pravidelných intervalech foceny. Tato monitorace může probíhat minuty, hodiny, dny, ale i týdny či měsíce. Přístroj IncuCyte® dokáže najednou zpracovávat data až z 6 kultivačních nádob či mikrotitračních destiček. Pomocí integrovaného analytického softwaru je možná následná analýza změn počtu buněk, konfluence, jejich morfologie, a to jak v přirozeném prostředí (bez vnějšího zásahu), tak po vnějším zásahu např. pomocí farmaka, toxické látky, fyzikálního ovlivnění apod. Kromě získaných dat je dále možný export získaných fotografií či celých videosekvencí.

3.6 Stimulace T-lymfocytů

Pro stimulaci T lymfocytů byly použity následující látky a jejich vzájemné kombinace:

- interleukin 2 (IL-2) – použitá koncentrace 150 IU/ml
- interleukin 15 (IL-15) – použitá koncentrace 150 IU/ml
- Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 – použitá koncentrace 6,25 μ M
- IL-2 + IL-15 – použitá koncentrace každého z interleukinů 150 IU/ml
- IL-2 + Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 – použitá koncentrace interleukinu 150 IU/ml a 6,25 μ M u Dynabeads
- IL15 + Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 – použitá koncentrace interleukinu 150 IU/ml a 6,25 μ M u Dynabeads
- IL-2 + IL-15 + Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 – použitá koncentrace u obou interleukinů 150 IU/ml a 6,25 μ M u Dynabeads

Celý experiment byl zpracován v duplikátech. Schéma připravených destiček znázorňuje Obrázek 13, 14 a 15. Takto připravené destičky byly umístěny do přístroje IncuCyte®, kde byl povrch každé jamky každé 2 hodiny naskenován a uložen k následnému vyhodnocení.

Obrázek 13 - Schéma připravené destičky (dárce 1, 2, 3)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well	Dynabeads 6,25 μ M DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 1 (1) 25K / well			
C												
D		DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well	Dynabeads 6,25 μ M DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 2 (1) 25K / well			
E												
F		DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well	Dynabeads 6,25 μ M DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 3 (1) 25K / well			
G												
H												

Zdroj: Vlastní

Obrázek 14 - Schéma připravené destičky (dárce 4, 5, 6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well	Dynabeads 6.25 µM DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 4 (1) 25K / well			
C												
D		DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well	Dynabeads 6.25 µM DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 5 (1) 25K / well			
E												
F		DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well	Dynabeads 6.25 µM DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 6 (1) 25K / well			
G												
H							ČISTÉ MÉDIUM					

Zdroj: Vlastní

Obrázek 15 - Schéma připravené destičky (dárce 7, 8)

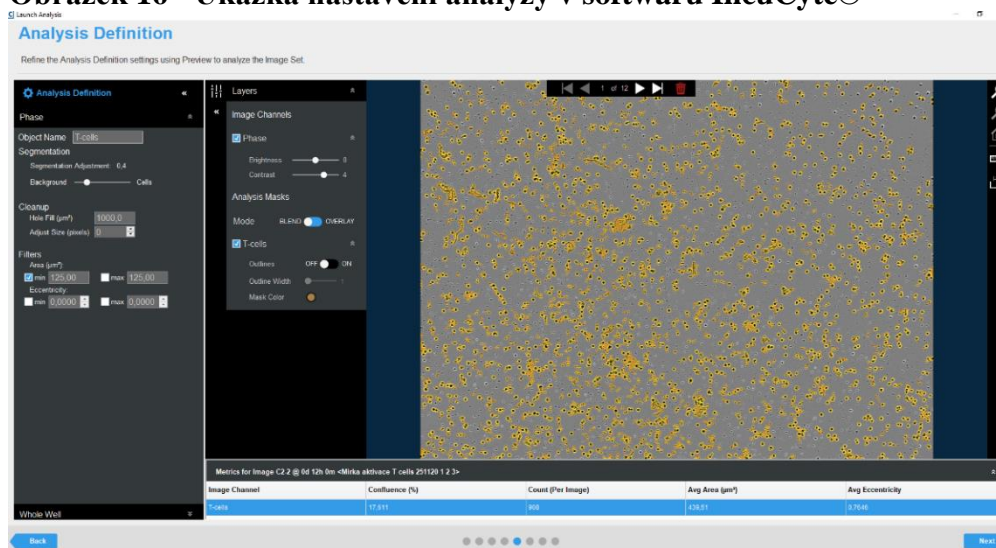
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well	Dynabeads 6.25 µM DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 7 (1) 25K / well			
C												
D		DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-2 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-15 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well	Dynabeads 6.25 µM DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-2 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well	IL-2 + IL-15 + Dynabeads 150 IU/ml DÁRCE 8 (1) 25K / well			
E												
F												
G												
H							ČISTÉ MÉDIUM					

Zdroj: Vlastní

3.7 Analýza výsledků

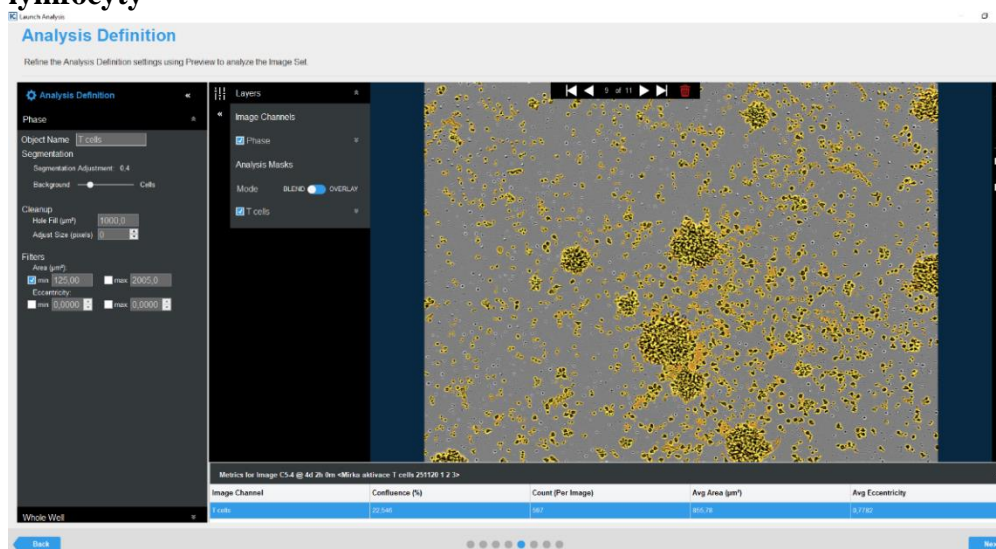
Po 120 hodinách byl pokus ukončen. Destičky byly vyndány z přístroje IncuCyte® a získaná data byla pomocí softwaru IncuCyte® analyzována. V softwaru byly nastaveny parametry tak, aby software dokázal rozpoznat T-lymfocyty, identifikoval jejich počet a plochu. Z těchto parametrů následně stanovil konfluenci buněk (%). Ukázka nastavení analyzačního softwaru je uvedena na Obrázku 16 a 17.

Obrázek 16 - Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte®



Zdroj: Vlastní

Obrázek 17 - Ukázka nastavení analýzy v softwaru IncuCyte® se stimulovanými T-lymfocyty

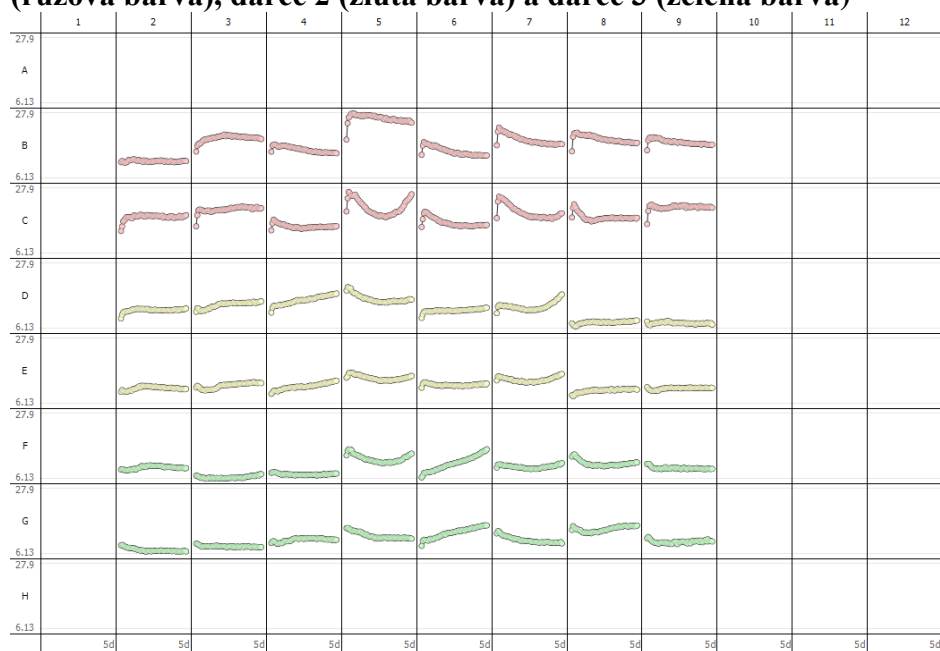


Zdroj: Vlastní

4 VÝSLEDKY

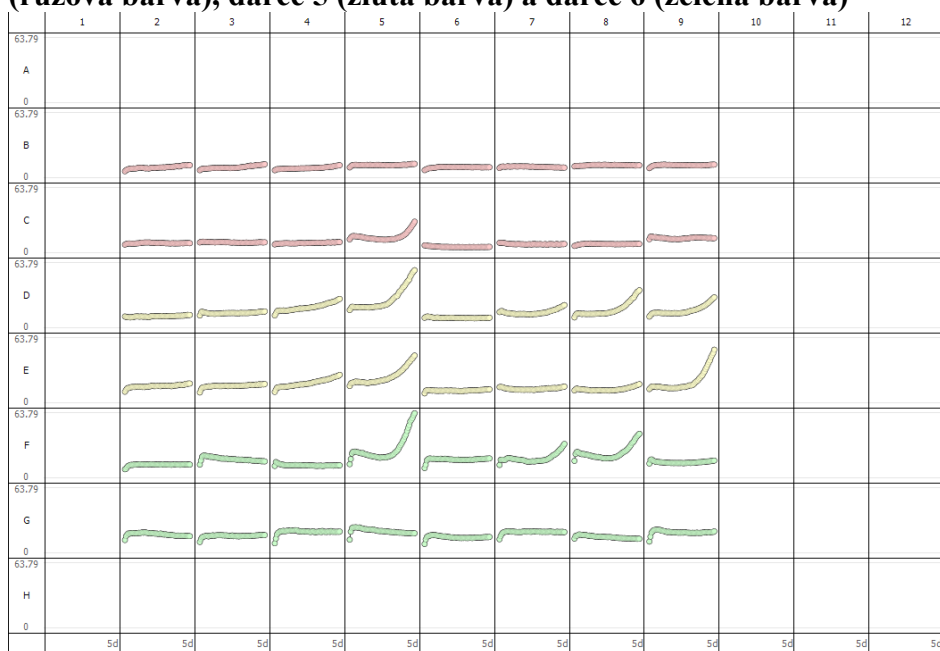
Při experimentu bylo 8 vzorků T-lymfocytů od různých dárců vystaveno 7 typům stimulace. T-lymfocyty byly ponechány v prostředí konkrétní látky po dobu 120 hodin. Každý vzorek byl zpracován v dubletu. Po ukončení pokusu byla analyzována míra konfluence buněk v závislosti na čase. Získaná data byla zpracována do grafů. Na Obrázku 18, 19 a 20 je vidět změna konfluence v průběhu času u jednotlivých vzorků T-lymfocytů a v jednotlivých prostředí (plánky jednotlivých destiček zobrazovaly obrázky 13, 14 a 15).

Obrázek 18 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 1 (růžová barva), dárce 2 (žlutá barva) a dárce 3 (zelená barva)



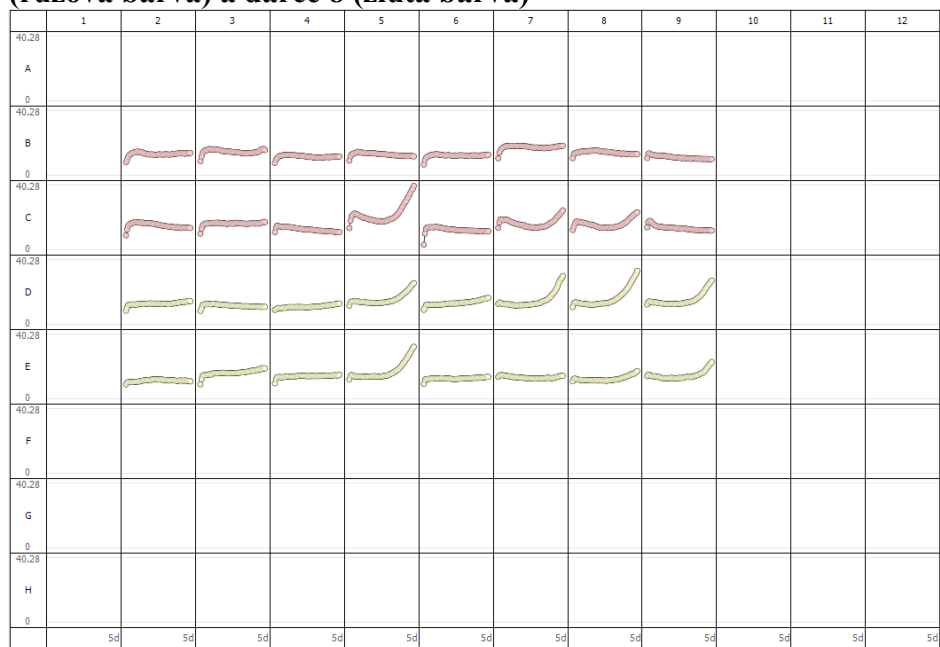
Zdroj: Vlastní

Obrázek 19 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 4 (růžová barva), dárce 5 (žlutá barva) a dárce 6 (zelená barva)



Zdroj: Vlastní

Obrázek 20 - Záznam změny konfluence T-lymfocytů v průběhu 120 hodin u dárce 7 (růžová barva) a dárce 8 (žlutá barva)



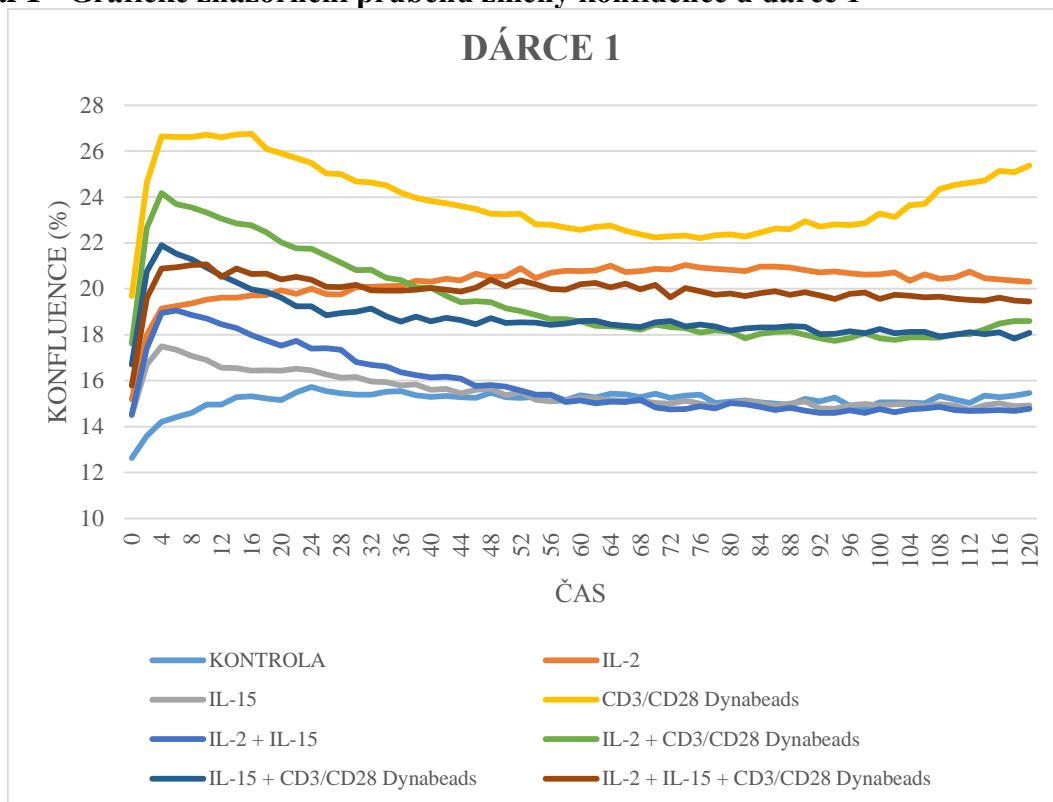
Zdroj: Vlastní

Hodnoty z obou jamek u každého typu stimulace byly zprůměrovány a graficky zpracovány. Průběh změny konfluency T-lymfocytů v průběhu času je znázorněn na následujících grafech. U dárců 1, 4, 5, 6, 7 a 8 je vidět, že nejvyššího stupně stimulace bylo dosaženo v jamkách, kde byla použita samostatná látka CD3/CD28 Dynabeads. U dárců 2 a 3 docházelo naopak podle grafu k poklesu konfluency. Po podrobné analýze záznamu vývoje konfluency u těchto vzorků bylo ale zjištěno, že i zde došlo k nejvyšší aktivaci T-lymfocytů v prostředí samostatně působících Dynabeads. Z obrazového záznamu, který přístroj IncuCyte® po celou dobu experimentu zaznamenával, bylo patrné, že u těchto vzorků došlo k rychlému shluknutí T-lymfocytů, což vedlo v grafickém zpracování k poklesu křivky. Ve skutečnosti ale byly T lymfocyty při těchto podmínkách opět nejvíce aktivovány. Tato skutečnost je vidět na Obrázku 21, kde je vidět míra aktivace v čase 72 hod ve vzorku bez aktivační látky (21A), s aktivační látkou Dynabeads u dárce 3 (21B) a u dárce 4 (21C).

K aktivaci T-lymfocytů došlo i ve vzorcích, kde byly Dynabeads kombinovány s IL-2, s IL-15 či s oběma interleukiny, zde již byla ale aktivace nižší než ve vzorcích, kde byly Dynabeads přítomny samostatně. Porovnání vzhledu jamek u všech aktivačních látek v čase 0 a 120 hodin u vybraného dárce (dárce 5) je patrné z Obrázku 22.

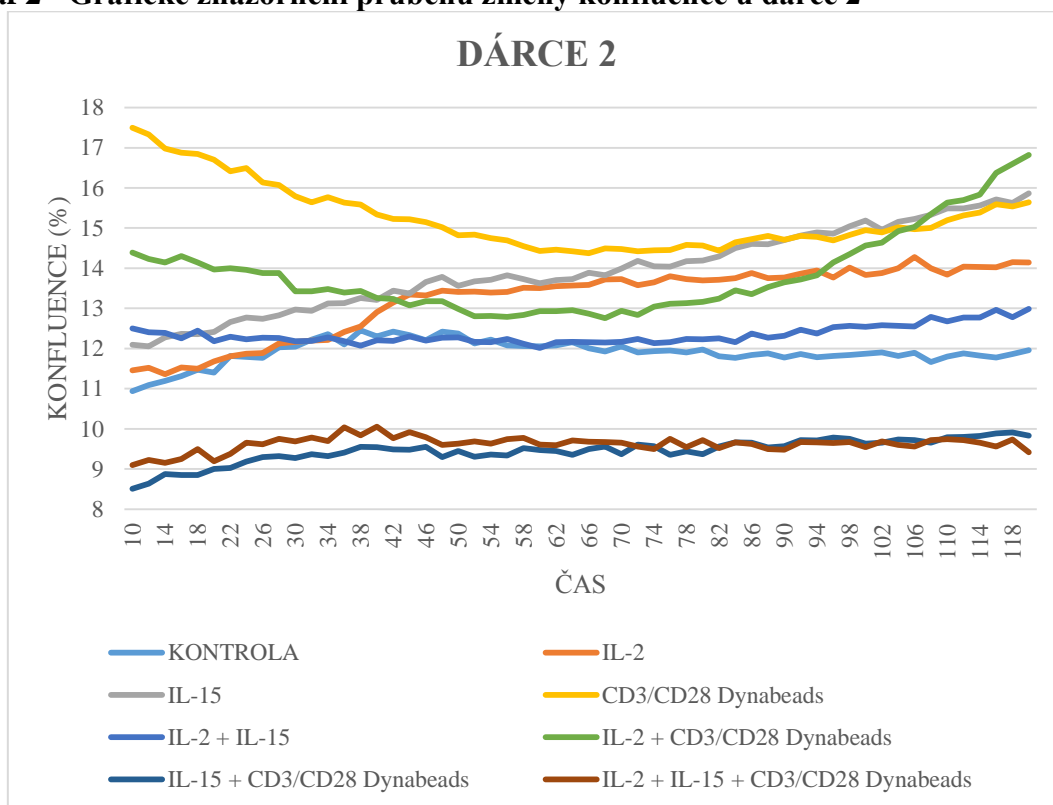
Čas, kdy došlo k aktivaci T-lymfocytů, byl u jednotlivých dárců individuální a pohyboval se v rozmezí několika hodin (př. u dárce 1), až do času 4 dní (př. dárce 4). U žádného ze vzorků nebyla potřeba delší doba na aktivaci.

Graf 1 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 1



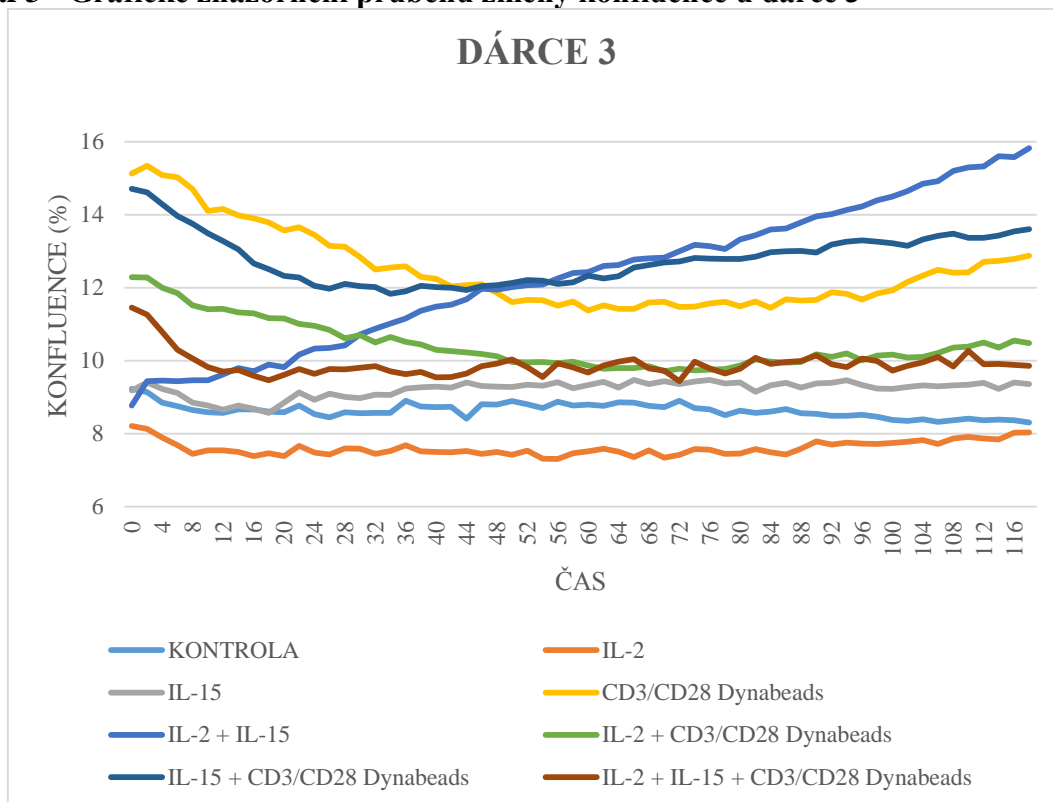
Zdroj: Vlastní

Graf 2 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 2



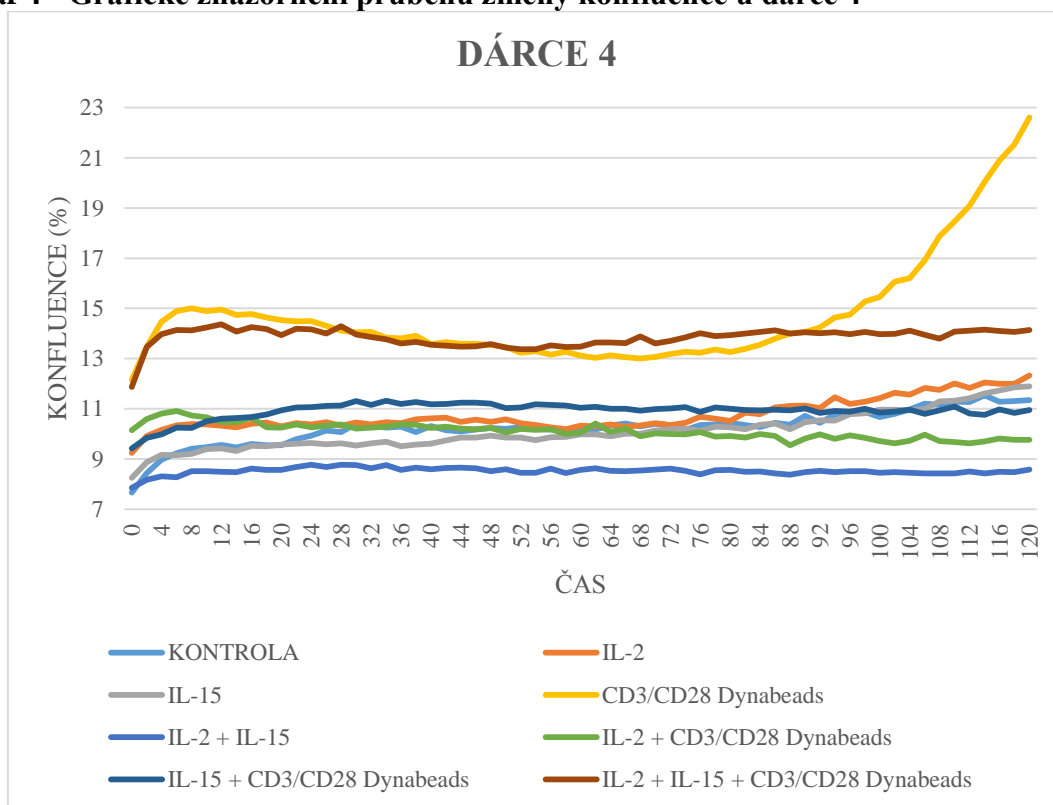
Zdroj: Vlastní

Graf 3 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 3



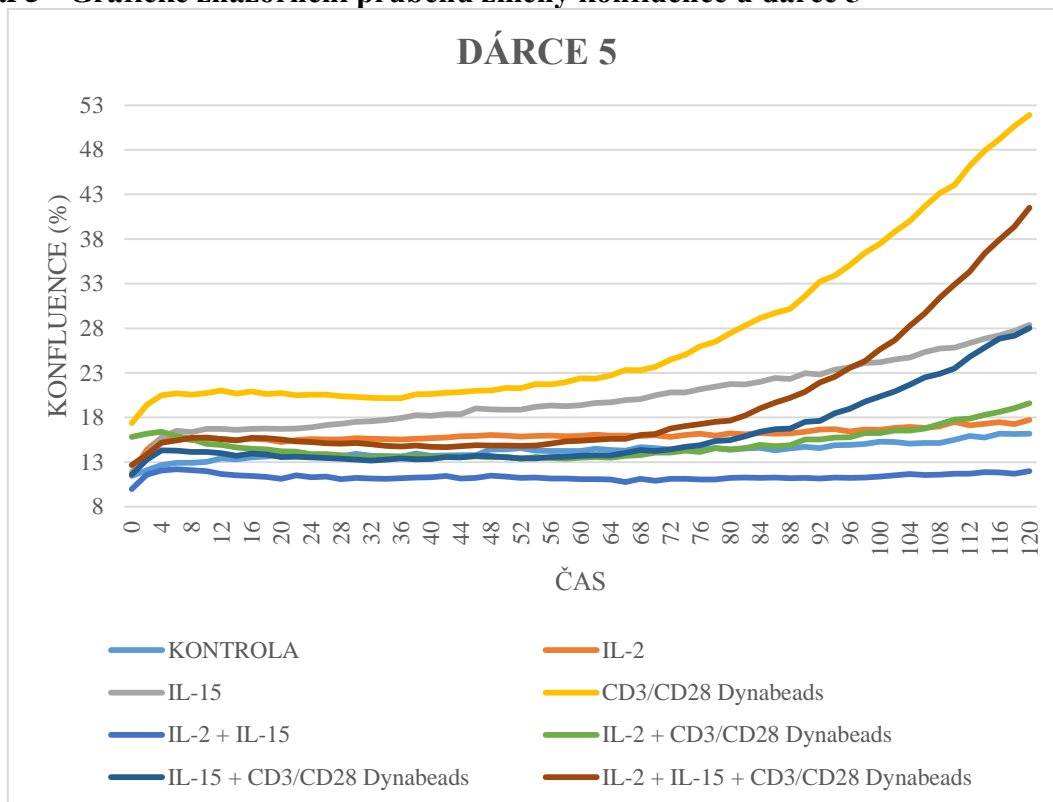
Zdroj: Vlastní

Graf 4 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 4



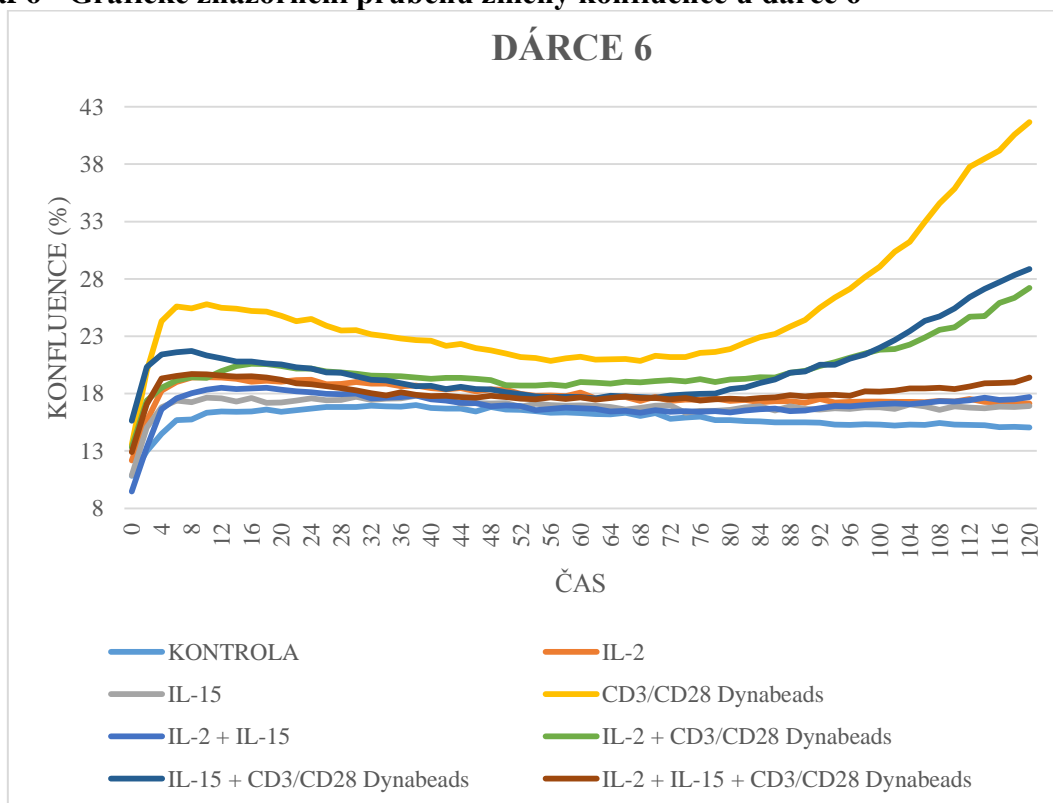
Zdroj: Vlastní

Graf 5 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 5



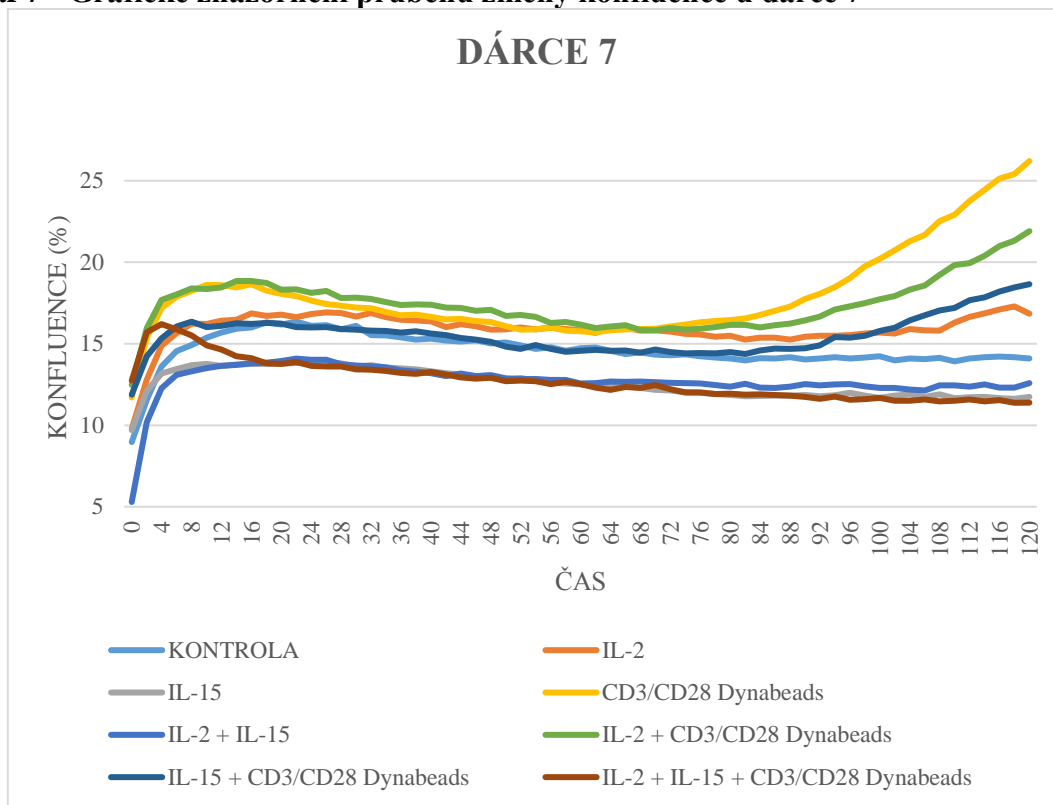
Zdroj: Vlastní

Graf 6 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 6



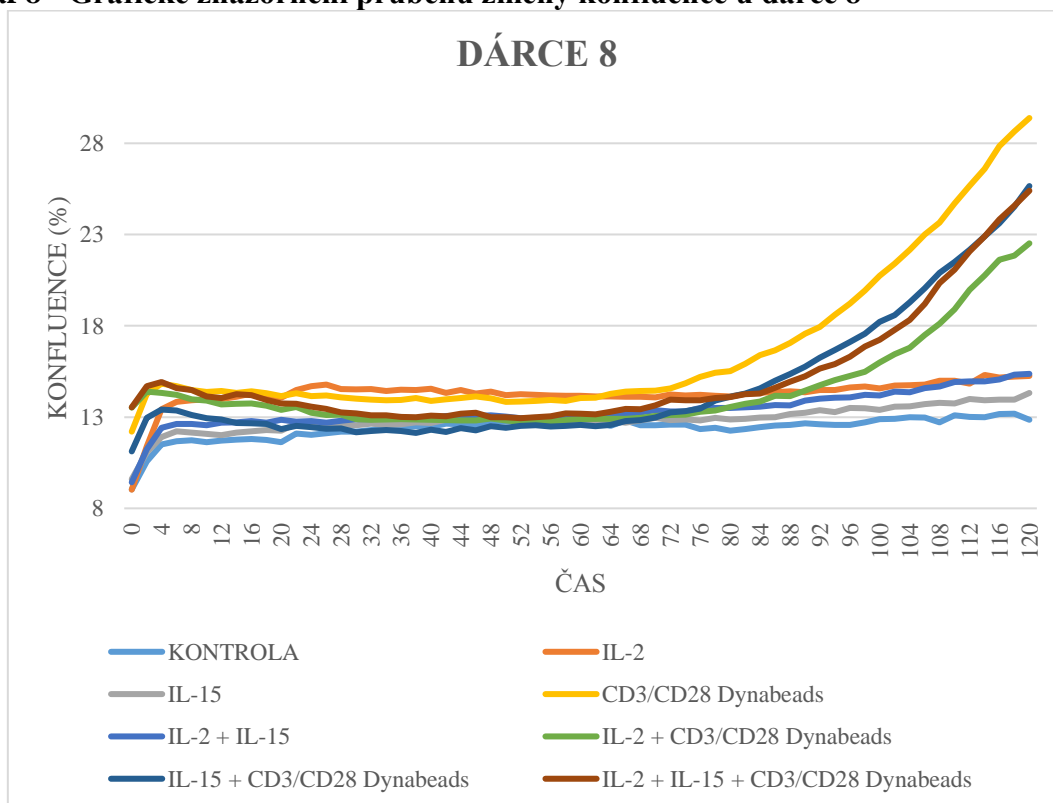
Zdroj: Vlastní

Graf 7 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 7



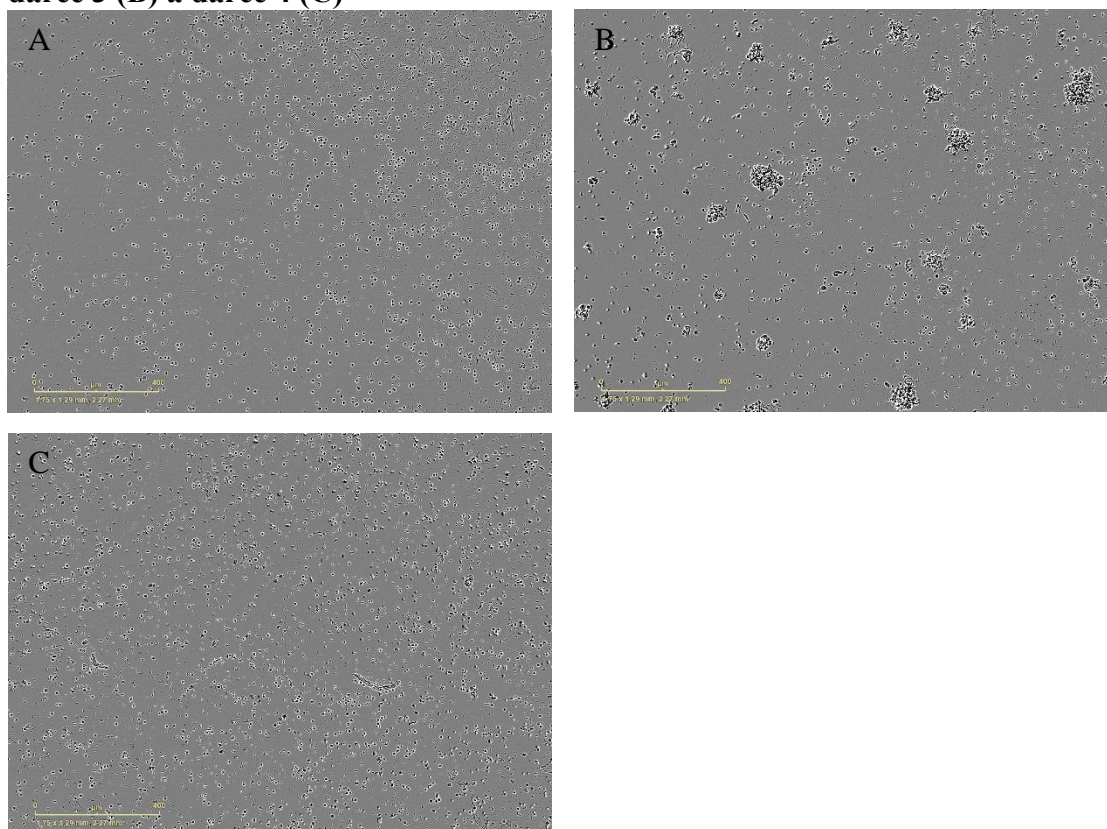
Zdroj: Vlastní

Graf 8 - Grafické znázornění průběhu změny konfluence u dárce 8



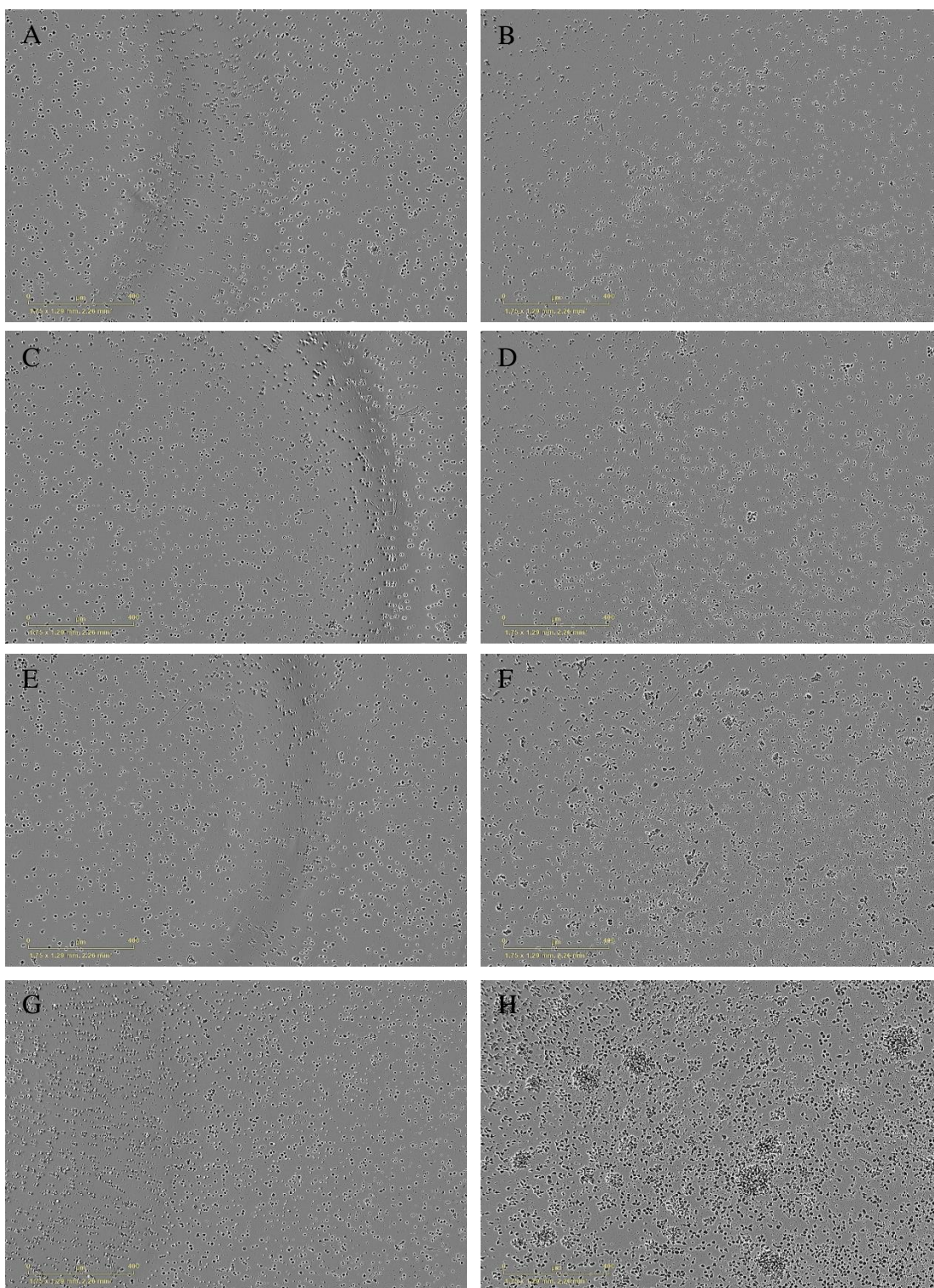
Zdroj: Vlastní

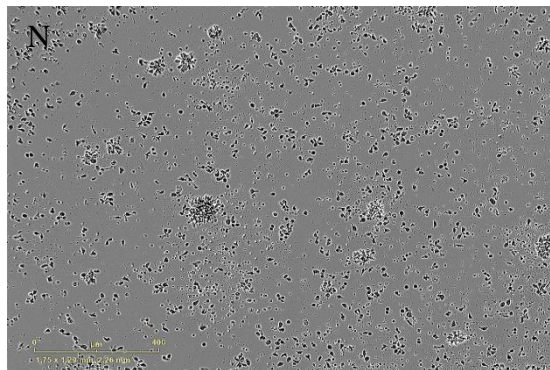
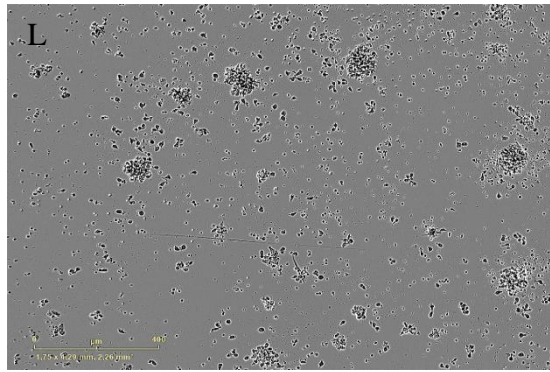
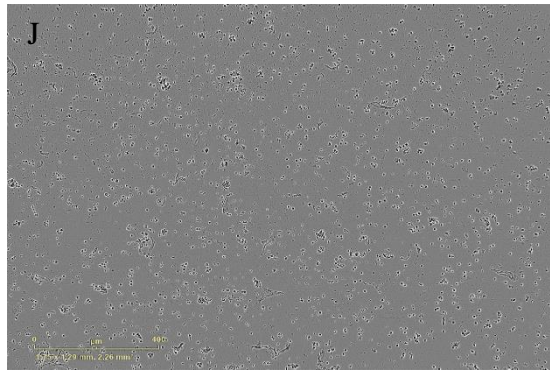
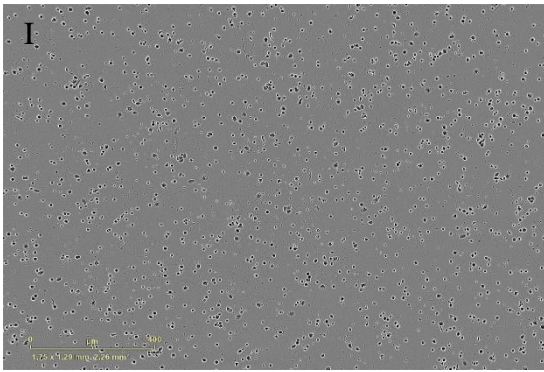
Obrázek 21 - Porovnání aktivace T-lymfocytů v čase 72 hod u kontrolního vzorku (A), dárce 3 (B) a dárce 4 (C)



Zdroj: Vlastní

Obrázek 22 - Konfluence T-lymfocytů v čase 0 a 120 hod.
Kontrolní vzorek (A, B), s IL-2 (C, D), s IL-15 (E, F), s Dynabeads (G, H), s IL-2 + IL-15 (I, J), s IL-2 + Dynabeads (K, L), s IL-15 + Dynabeads (M, N) a s IL-2 + IL-15 + Dynabeads (O, P).





Zdroj: Vlastní

5 DISKUZE

V této bakalářské práci jsme se zabývali tématem T-lymfocytů, jejich funkcí v organismu a v praktické části jejich aktivací a monitorováním tohoto děje v reálném čase pomocí přístroje IncuCyte®. Cílem bylo zjistit, která látka, případně která kombinace látek, dokáže aktivovat buňky nejlépe a po jakém čase je aktivace nejvýraznější. Detekce aktivace T-lymfocytů je jedním z klíčových vyšetření v laboratořích klinické imunologie a hematonekologie.

K aktivaci byly použity IL-2, IL-15, Dynabeads CD3/CD28 a jejich vzájemné kombinace.

IL-2 i IL-15 jsou silné působící mitogeny, ale odlišně ovlivňují růst T-buněk i jejich morfologii. Interleukin 2 a 15 aktivují proliferaci T-lymfocytů přes gama a beta řetěz a také přes alfa podjednotku, která poskytuje vysokou afinitu vazby na cytokiny. (Schluns a Lefrançois 2003; He et al. 1997) V dřívějších studiích se ukázalo, že IL-2, nazývaný jako růstový faktor, má schopnost současně indukovat progresi buněčného cyklu a zvyšovat velikost buněk. V prostředí s IL-15 dochází také k aktivaci T-lymfocytů, ale buňky bývají v porovnání s těmi vystavenými IL-2 menší. (Cornish et al. 2006) Tato rozdílnost je nejspíše dána rozdílnou schopností těchto dvou cytokinů udržovat povrchové hladiny aminokyselinové transportní podjednotky CD98. IL-2 v porovnání s IL-15 dokáže vyvolat vysoké hladiny exprese CD98 a absorbovat aminokyseliny až v dvojnásobném množství. To se promítne do významného rozdílu ve velikosti dceřiných buněk a jejich množství. (Cornish et al. 2006) Tato skutečnost mohla ovlivnit i naše výsledky, jelikož pomocí přístroje IncuCyte® byla měřena konfluence buněk, ale nezohledňoval se jejich počet.

Každý interleukin sice působí odlišně, ale dohromady spolu kooperují. IL-2 napomáhá k produkci T_C-lymfocytů, kontroluje přežití T_{REG}-lymfocytů a udržuje jejich vzájemnou toleranci a expanzi (Cornish et al. 2006). IL-15 je zásadní pro vývoj NK buněk (Colucci et al. 2003) a paměťových CD8⁺ T-lymfocytů. (Klonowski a Lefrançois 2005)

Odlišné účinky interleukinů se musí brát v úvahu při jejich výběru v imunoterapii. IL-2 je užitečný pro krátkodobou expanzi silných efektorových buněk, ale je méně cenný pro pacienty, u kterých je potřeba dlouhodobě zvýšit množství aktivovaných T-lymfocytů. Pod jeho vlivem je výrazně podporována syntéza proteinů, a to ve větší míře než je potřeba pro

jejich mitózu, což je z krátkodobého pohledu výhodné, ale zároveň je spotřebováváno velké množství energie, což může u buněk vést k vyčerpání a apoptóze. Z dlouhodobého hlediska je tedy výhodnější aktivace skrze IL-15, u kterého více odpovídá úroveň syntézy proteinů úrovni mitózy. (Cornish et al. 2006)

Aktivace T-lymfocytů pomocí Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 se nepoužívá dlouho. Dříve se užíval především phytohemagglutinin (PHA), což je rostlinný lektin získávaný z luštěniny *Phaseolus vulgaris*. Dynabeads jsou magnetické kuličky o velikosti 4,5 µm, které mají na svém povrchu monoklonální protilátky proti molekulám CD3 a CD28 antigenům, jež se vyskytují na T-lymfocytech. Obě protilátky jsou třídy IgG a napodobují stimulaci s antigen prezentujícími buňkami. Jedná se tedy o specifický mechanismus aktivace T-buněk a zároveň proces jejich aktivace nejvíce napodobuje fyziologický mechanismus aktivace. Molekula CD3 zajistí počáteční aktivační signál, proliferace závisí na kostimulačním signálu obvykle s molekulou CD28. (Trickett a Kwan 2003)

Z našich výsledků je patrné, že nejlepší aktivace dosáhly T-lymfocyty v prostředí s Dynabeads. Tato skutečnost je dána již výše zmíněným specifickým mechanismem aktivace. Doba, při které došlo k aktivaci buněk, byla u jednotlivých dárců individuální a pohybovala se od několika hodin až po 4 dny. V případných navazujících studiích je tedy nutné počítat s dlouhodobým sledováním aktivace T-lymfocytů, a to v čase minimálně 96 hodin.

Jedním z našich dalších cílů bylo zjistit, zda je přístroj IncuCyte® vhodný ke sledování procesu aktivace T-lymfocytů a měl by potenciál k dalšímu využití. Tento přístroj se ukázal jako vhodný, i když ne zcela dokonalý. Nevýhodou v našem experimentu bylo, že přístroj měřil pouze plochu, kterou T-lymfocyty zabíraly. U některých vzorků došlo ale vlivem aktivace buněk k jejich shluknutí, což přístroj vyhodnocoval jako pokles konfluence, a tedy pokles aktivace, což ale neodpovídalo skutečnosti. Na druhou stranu přístroj umožňuje kompletní zpětné prohlédnutí experimentu, a tedy identifikaci této případné chyby a její odstranění.

Monitorování aktivace T-lymfocytů má i potenciální využití v klinické praxi. V této práci jsme se v teoretické části zmiňovali o problematice reakce štěpu proti hostiteli. Hlavní podíl na jejím vzniku mají T-lymfocyty z darované kostní dřeně v kombinaci s oslabením imunitního systému příjemce vlivem imunosupresivní léčby. (Mayer et al. 2007) U pacientů, kteří podstupují transplantaci, bychom za pomoci přístroje IncuCyte® mohli

zjistit, zda jsou T-lymfocyty dostatečně imunosuprimované a dokázali bychom určit možné riziko a intenzitu rozvoje GvHD. V praxi se zatím sledování aktivace T-lymfocytů při GvHD neuplatňuje.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem “Porovnávání přístupů aktivace T-lymfocytů “ je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části byly zpracovány základy o imunitním systému člověka s důrazem na T-lymfocyty. Dále byla zpracována problematika reakce štěpu proti hostiteli.

V praktické části byly porovnávány látky s potenciálem aktivace T-lymfocytů. K aktivaci byly použity IL-2, IL-15, Dynabeads CD3/CD28 a jejich vzájemné kombinace. Jako nejvhodnější se ukázal specifický aktivátor Dynabeads CD3/CD28. T-lymfocyty by měly být dané látce vystaveny alespoň 96 hodin.

Přístroj IncuCyte je i přes některé zmíněné nedostatky vhodným typem přístroje pro tento typ experimentu.

V navazujících studiích by bylo zajímavé pracovat s T-lymfocyty od pacientů, u kterých je riziko vzniku GvHD, a tím práci propojit s klinikou..

SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk, 2008. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2502-4.

BJORKMAN, P. J. a P. PARHAM, 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annual Review of Biochemistry* [online]. **59**, 253–288. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.001345

BURMESTER, Gerd-Rüdiger a Antonio PEZUTO, 2003. *Color Atlas of Immunology*. 1998. vyd. Stuttgart: Thieme. ISBN 3-13-126741-0.

COLUCCI, Francesco, Michael A. CALIGIURI a James P. DI SANTO, 2003. What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews. Immunology* [online]. **3**(5), 413–425. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1088

CORNISH, Georgina H., Linda V. SINCLAIR a Doreen A. CANTRELL, 2006. Differential regulation of T-cell growth by IL-2 and IL-15. *Blood* [online]. **108**(2), 600–608. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2005-12-4827

ČIHÁK, Radomír, 2001. *Anatomie I*. Vydání druhé, upravené a doplněné. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3817-8.

DUNNE, Margaret R., Greg BYRNE, Fernando G. CHIRDO a Conleth FEIGHERY, 2020. Coeliac Disease Pathogenesis: The Uncertainties of a Well-Known Immune Mediated Disorder. *Frontiers in Immunology* [online]. **11**, 1374. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.01374

ENGELHARD, V. H., 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annual Review of Immunology* [online]. **12**, 181–207. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001145

FELLNEROVÁ, I. a A. FELLNEROVÁ, 2015. *T lymfocyty a látková imunita* [online]. 2015. Dostupné z: https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie_pdf/6_T_lymfocyty_a_bunecn_a_imunita_2015_11_text.pdf

FLOWERS, Mary E. D., Yoshihiro INAMOTO, Paul A. CARPENTER, Stephanie J. LEE, Hans-Peter KIEM, Effie W. PETERSDORF, Shalini E. PEREIRA, Richard A. NASH, Marco MIELCAREK, Matthew L. FERRO, Edus H. WARREN, Jean E. SANDERS, Rainer F. STORB, Frederick R. APPELBAUM, Barry E. STORER a Paul J. MARTIN, 2011. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* [online]. **117**(11), 3214–3219. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-08-302109

FONTANA, Josef, 2014. *Funkce buněk a lidského těla* [online]. B.m.: 3. Lékařská fakulta v Praze [vid. 2021-03-07]. Dostupné z: <https://books.apple.com/cz/book/funkce-bun%C4%9Bk-a-lidsk%C3%A9ho-t%C4%9Bla/id804153219>

GE HEALTHCARE, 2010. Properties of mononuclear cells isolated by the Ficoll-Paque method. *Sigma-Aldrich* [online] [vid. 2020-12-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/isolation-of-mononuclear-cells/properties-of-isolated-cells.html>

HE, Y. W., H. NAKAJIMA, W. J. LEONARD, B. ADKINS a T. R. MALEK, 1997. The common gamma-chain of cytokine receptors regulates intrathymic T cell development at multiple stages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. **158**(6), 2592–2599. ISSN 0022-1767.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ, 2017. *Základy imunologie*. 2017. vyd. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. 6., aktualizované vydání. ISBN 978-80-7553-250-3.

HROMADNÍKOVÁ, Ilona, 2001. *Nové poznatky v patogenezi reakce štěpu proti hostiteli - Zdraví.Euro.cz* [online] [vid. 2020-06-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nove-poznatky-v-patogenezi-reakce-stepu-proti-hostiteli-135738>

CHOO, Sung Yoon, 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* [online]. **48**(1), 11–23. ISSN 0513-5796. Dostupné z: doi:10.3349/ymj.2007.48.1.11

KABELITZ, Dieter, Ruben SERRANO, Léonce KOUAKANOU, Christian PETERS a Shirin KALYAN, 2020. Cancer immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells: many paths ahead of us. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. **17**(9), 925–939. ISSN 2042-0226. Dostupné z: doi:10.1038/s41423-020-0504-x

KLONOWSKI, Kimberly D. a Leo LEFRANÇOIS, 2005. The CD8 memory T cell subsystem: integration of homeostatic signaling during migration. *Seminars in Immunology* [online]. **17**(3), 219–229. ISSN 1044-5323. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2005.02.004

KOPECKÝ, 2006. *Články a informace z různých oblastí lékařství - Imunologie - Komplement* [online] [vid. 2020-01-31]. Dostupné z: <https://biology.estranky.cz/clanky/imunologie/komplement.html>

KREJSEK, Jan, 2016. *Imunologie člověka*. první. Hradec Králové: Garamon s. r. o. ISBN 978-80-86472-74-4.

LITZMAN, Jiří, 2015. Mechanismy specifické buněčné imunity. 44.

MAK, Tak W., Mary E. SAUNDERS a Bradley D. JETT, ed., 2014. Chapter 8 - The T Cell Receptor: Proteins and Genes. In: Tak W. MAK, Mary E. SAUNDERS a Bradley D. JETT, ed. *Primer to the Immune Response (Second Edition)* [online]. Boston: Academic Cell, s. 181–196 [vid. 2020-09-11]. ISBN 978-0-12-385245-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385245-8.00008-X

MAYER, J., P. CETKOVSKÝ a M. KREJČÍ, 2007. Steroid-rezistentní akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). *Steroid-rezistentní akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD)* [online] [vid. 2020-05-25]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/transfuzehematologie-dnes/2007-4/steroid-rezistentni-akutni-reakce-stepu-proti-hostiteli-gvhd-2226>

NYDEGGER, Urs E., 1998. Immune Complexes. In: Peter J. DELVES, ed. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* [online]. Oxford: Elsevier, s. 1220–1225 [vid. 2020-02-26]. ISBN 978-0-12-226765-9. Dostupné z: doi:10.1006/rwei.1999.0317

PAMPLONA, Ana a Bruno SILVA-SANTOS, 2021. $\gamma\delta$ T cells in malaria: a double-edged sword. *The FEBS journal* [online]. **288**(4), 1118–1129. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/febs.15494

RAIDA, Luděk, Tomáš PAPAŽÍK, Edgar FABER a Karel INDRÁK, 2007. *Alogenni transplantace krvetvorných kmenových buněk v léčbě rekurentních a refrakterních maligních lymfomů* » *Linkos.cz* [online] [vid. 2020-09-11]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/alogeni-transplantace-krvetvornych-kmenovych-bunek-v-lecbe-rekurentnich-a-refra/>

SHLOMCHIK, Warren D., 2007. Graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology* [online]. **7**(5), 340–352. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri2000

SCHLUNS, Kimberly S. a Leo LEFRANÇOIS, 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews. Immunology* [online]. **3**(4), 269–279. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri1052

ŠTEFÁNEK, Jiří, 2011. *Chemotaxe | Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online] [vid. 2020-01-31]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=chemotaxe>

TREBICHA VSKÝ, Ilja, 2013. Cytokiny a biologická léčba. 3.

TRICKETT, Annette a Yiu Lam KWAN, 2003. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods* [online]. **275**(1–2), 251–255. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-1759(03)00010-3

TURNER, Mark D., Belinda NEDJAI, Tara HURST a Daniel J. PENNINGTON, 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1843**(11), 2563–2582. ISSN 0167-4889. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014

YOUNGBLOOD, Ben, J. Scott HALE, Haydn T. KISSICK, Eunseon AHN, Xiaojin XU, Andreas WIELAND, Koichi ARAKI, Erin E. WEST, Hazem E. GHONEIM, Yiping FAN, Pranay DOGRA, Carl W. DAVIS, Bogumila T. KONIECZNY, Rustom ANTIA, Xiaodong CHENG a Rafi AHMED, 2017. Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* [online]. **552**(7685), 404–409. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature25144