

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 6: Zdravotnictví**

## **CD21<sup>low</sup> B lymfocyty v patogenezi poruch thymu - přátelé či nepřátelé?**

**Adam Scholz**

**Hlavní město Praha**

**Praha, 2025**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

**CD21<sup>low</sup> B lymfocyty v patogenezi poruch  
thymu - přátelé či nepřátelé?**

**CD21<sup>low</sup> B lymphocytes in thymic disorders  
pathogenesis - friends or foes?**

**Autoři:** Adam Scholz

**Škola:** Gymnázium, Na Zatlance 1330/11, 15000 Praha 5

**Kraj:** Hlavní město Praha

**Konzultanti:** prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc.

doc. MUDr. Tomáš Milota, Ph.D.

RNDr. Jitka Smetanová, Ph.D.

Praha, 2025

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 27.3.2025 .....Adam Scholz.....

## Poděkování

V první řadě patří můj velký dík prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc. nejen za důvěru a možnost se zapojit do probíhajícího výzkumu, na kterém jsem svou práci postavil, ale i za poskytnutí studijních materiálů, které byly mými podklady od začátku do konce práce na SOČ. Díky jí patří také za revizi, opravu včetně další pomoci se zpracováním mé práce, stejně jako za pomoc s právními náležitostmi spojenými se stáží ve FN Motol.

Můj další obrovský dík patří RNDr. Jitce Smetanové, Ph.D. za to, že mne již ze začátku uvedla do tématu a provedla mě celým výzkumem, s čímž se pojí i to, že mne naučila pracovat s tkání v laboratoři. Dále mě od začátku do konce mé práce podporovala a po celou dobu mou SOČ konzultovala, četla a pomáhala mi ji zpracovávat, případně předělávat.

Při tomto tématu bych rád velmi poděkoval i doc. MUDr. Tomáši Milotovi, Ph.D. nejen za revizi celé mé práce, ale i za odbornou konzultaci zejména po klinické a praktické stránce včetně diskuze okolo statistického hodnocení výsledků.

Jsem rád, že jsem mohl mou SOČ zpracovávat právě pod křídly RNDr. Jitky Smetanové, Ph.D. a doc. MUDr. Tomáše Miloty, Ph.D.

V tuto chvíli musím vyzdvihnout pomoc a oporu Mgr. Pavlíně Damaškové, mé školní garantky a učitelky Gymnázia Na Zatlance, která mi již od začátku pomáhala s celkovou realizací práce. Děkuji za to, že mou SOČ několikrát přečetla a vždy podala velmi cennou zpětnou vazbu.

Další obrovské poděkování patří Mgr. Janu Suchánkovi za pomoc se statistickou analýzou mých výsledků. Díky jeho ochotě s pohotovostí jsem dokázal z grafických znázornění a analýz získat možné maximum, což výrazně obohatilo mou práci.

Za pomoc s korekturou textu děkuji i paní primářce Ústavu klinické imunologie a alergologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze - MUDr. Zuzaně Humlové, Ph.D.

V neposlední řadě bych rád poděkoval i mé učitelce z Gymnázia Na Zatlance - Mgr. Lucii Kratochvílové, Ph.D. za pomoc s počáteční přípravou pro práci na mé SOČ ve FN Motol.

Velmi si vážím ochoty, úsilí a času všech, kteří se na vzniku a vývoji mé SOČ podíleli. Děkuji.

## Anotace

CD21<sup>low</sup> B lymfocyty představují dodnes ne příliš prozkoumanou skupinu buněk imunitního systému. Jejich zvýšený počet byl popsán u řady autoimunitních onemocnění, což nepřímo naznačuje, že mohou hrát roli v jejich patogenezi. Dále se ukazuje, že jednou ze stěžejních funkcí této populace buněk je prezentace antigenu, která se uplatňuje nejen při aktivaci imunitní reakce, ale také v průběhu centrální tolerance v primárních lymfoidních orgánech - kostní dřeni a thymu. Patologické stavy brzlíku, jako jsou myasthenia gravis, thymomy nebo například hyperplazie či přítomné cysty, pak mohou negativně ovlivňovat procesy, jež zde probíhají. Hlavním cílem této práce bylo pokusit se blíže objasnit funkci CD21<sup>low</sup> v různých patologiích brzlíku, poněvadž právě thymus se zdá být místem, kde mohou mít silný vliv. Pomocí průtokové cytometrie byla stanovena hladina celkových B lymfocytů v tkáni, přičemž byl kladen důraz na populaci CD21<sup>low</sup> včetně jejich subpopulací. Následně došlo k měření hladiny bazální aktivity těchto buněk pomocí exprese aktivačních markerů CD40, CD80/86 i HLA-DR a k detekci jejich migrace za použití exprese chemokinových receptorů CXCR3 a CCR7. Výsledky ukazují sníženou schopnost CD21<sup>low</sup> B lymfocytů prezentovat antigen, což může přímo souviset se vznikem autoimunitních onemocnění. Dále byly u této skupiny buněk naměřeny vysoké hodnoty exprese CXCR3 společně s CCR7, naznačující jejich migraci do místa zánětu, což otevírá dveře pro další studie zabývající se možnými patologickými procesy. V neposlední řadě byla popsána nerovnováha v zastoupení jednotlivých subpopulací CD21<sup>low</sup> B lymfocytů, to by mohlo znamenat jejich rozdílné role v odlišných patologiích. Hlavním přínosem práce je bližší objasnění chování CD21<sup>low</sup> v myasthenii gravis a thymomech, stejně tak jako podnět k dalšímu zkoumání funkce těchto buněk, poněvadž se zdá, že v různých onemocněních mohou hrát významnou roli. Další výzkum by mohl pomoci blíže porozumět procesu vzniku thymomů a autoimunit, což by mohlo v budoucnu rozšířit obecné znalosti o těchto vzácných, ale závažných chorobách.

## Klíčová slova

Myasthenia gravis; Brzlík; CD21<sup>low</sup> B lymfocyty

## Annotation

CD21<sup>low</sup> B lymphocytes represent a group of cells of the immune system that has not been well studied to date. Their increased values have been described in a number of autoimmune diseases, indirectly suggesting that they may play a role in their pathogenesis. Furthermore, it appears that one of the core functions of this cell population is antigen presentation, which is involved not only in the activation of the immune response but also in the course of central tolerance in the primary lymphoid organs - bone marrow and thymus. Pathological conditions of the thymus, such as myasthenia gravis, thymomas or, for example, hyperplasia or the presence of cysts, can then adversely affect the processes that take place there. The main aim of this work was deeper elucidation of the function of CD21<sup>low</sup> in various thymus pathologies, since the thymus seems to be a site where they can have a significant influence. Using flow cytometry, the level of total B lymphocytes in the tissue was determined, focusing on the CD21<sup>low</sup> population including its subpopulations. Subsequently, the level of basal activation of these cells was measured using the expression of activation markers CD40, CD80/86 and HLA-DR and their migration was detected using the expression of chemokine receptors CXCR3 and CCR7. The results suggest a reduced ability of CD21<sup>low</sup> B lymphocytes to present antigen, which may be directly related to the development of autoimmune diseases. Furthermore, high levels of CXCR3 expression were measured in this group of cells together with CCR7, indicating their migration to the site of inflammation, opening the door for further studies investigating possible pathological processes. Finally, an imbalance in the representation of different subpopulations of CD21<sup>low</sup> B lymphocytes has been described, which could indicate their different roles in various pathologies. The main contribution of this work is the further elucidation of the behavior of CD21<sup>low</sup> in myasthenia gravis and thymomas, as well as to encourage further investigation of the function of these cells, since they seem to play a significant role in different diseases. Additional research could help to understand the process of thymoma and autoimmunity more clearly, which could increase the general knowledge of these rare but serious diseases in the future.

## Keywords

Myasthenia gravis; Thymus; CD21<sup>low</sup> B lymphocytes

## Seznam zkratek a značek

- **AChR** = Acetylcholinové receptory, z angl. Acetylcholine Receptors
- **AChR-MG** = Myasthenia gravis s protilátkami proti acetylcholinovým receptorům
- **APC** = Antigen prezentující buňka, z angl. Antigen-presenting cell
- **BCR** = Specifické B-buněčné receptory, z angl. B-cell receptor
- **Breg** = Regulační B lymfocyty
- **DAMP** = Molekuly asociované s nebezpečím, z angl. Damage-associated molecular pattern
- **Ig** = Protilátka, Imunoglobulin
- **IL** = Interleukin
- **ILC** = Přirozené lymfoidní buňky, z angl. Innate Lymphoid Cells
- **LRP4** = Lipoprotein-related protein 4
- **LRP4-MG** = Myasthenia gravis s protilátkami proti lipoprotein-related proteinu 4
- **MFI** = Střední hodnota intenzity fluorescence, z angl. mean fluorescence intensity
- **MG** = Myasthenia gravis
- **MHC gp** = MHC glykoprotein
- **MuSK** = Svalově specifická tyrozin kináza, z angl. Muscle-specific Tyrosine Kinase
- **MuSK-MG** = Myasthenia gravis s protilátkami proti svalově specifické tyrozin kináze
- **NK** = Přirození zabíječi, z angl. Natural Killers
- **NKT** = Přirození zabíječi T lymfocyty, z angl. Natural Killers T-lymphocytes
- **PAMP** = Molekuly asociované s patogeny, z angl. Pathogen-associated molecular pattern
- **PBS** = Fosfátový pufr, z angl. Phosphate-buffered saline
- **PRR** = Receptory rozpoznávající vzory, z angl. Pattern recognition receptors
- **Tc** = Cytotoxické T lymfocyty, z angl. Cytotoxic T cell
- **TCR** = Specifické T-buněčné receptory, z angl. T-cell receptor
- **Th** = Pomocné T lymfocyty, z angl. T helper cell
- **Treg** = Regulační T lymfocyty

# Obsah

|          |                                                           |           |
|----------|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod.....</b>                                          | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>Teoretická část.....</b>                               | <b>11</b> |
| 2.1      | Základní funkce a charakteristika imunitního systému..... | 11        |
| 2.1.1    | Hlavní složky imunitního systému.....                     | 11        |
| 2.2      | Nespecifická (vrozená) imunita.....                       | 15        |
| 2.2.1    | Buňky nespecifického imunitního systému.....              | 15        |
| 2.3      | Specifická (adaptivní, získaná) imunita.....              | 16        |
| 2.3.1    | Humorální imunita.....                                    | 17        |
| 2.3.2    | Buněčná imunita.....                                      | 18        |
| 2.4      | Poruchy funkce imunitního systému.....                    | 22        |
| 2.4.1    | Imunodeficiency.....                                      | 22        |
| 2.4.2    | Alergie.....                                              | 23        |
| 2.4.3    | Autoinflatorní onemocnění.....                            | 23        |
| 2.4.4    | Autoimunitní onemocnění.....                              | 24        |
| 2.5      | Myasthenia gravis.....                                    | 26        |
| 2.5.1    | Patogeneze.....                                           | 28        |
| 2.5.2    | Role thymu v myasthenii gravis.....                       | 29        |
| 2.5.3    | Epidemiologie.....                                        | 29        |
| 2.5.4    | Klinický obraz.....                                       | 30        |
| 2.5.5    | Léčba.....                                                | 30        |
| <b>3</b> | <b>Cíle práce.....</b>                                    | <b>31</b> |
| <b>4</b> | <b>Praktická část.....</b>                                | <b>32</b> |
| 4.1      | Metodika.....                                             | 32        |
| 4.1.1    | Laboratorní zpracování.....                               | 32        |

|          |                                                                     |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.2    | Statistické zpracování.....                                         | 33        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky.....</b>                                                | <b>34</b> |
| 5.1      | Výsledky měření jednotlivých B lymfocytárních populací.....         | 35        |
| 5.2      | Výsledky pro aktivační markery B lymfocytů.....                     | 38        |
| 5.3      | Výsledky pro aktivační markery CD21 <sup>low</sup> - CD40.....      | 40        |
| 5.4      | Výsledky pro aktivační markery CD21 <sup>low</sup> - CD80/86.....   | 41        |
| 5.5      | Výsledky pro aktivační markery CD21 <sup>low</sup> - HLA-DR.....    | 42        |
| 5.6      | Výsledky pro chemokinové receptory CD21 <sup>low</sup> - CCR7.....  | 43        |
| 5.7      | Výsledky pro chemokinové receptory CD21 <sup>low</sup> - CXCR3..... | 44        |
| <b>6</b> | <b>Závěr.....</b>                                                   | <b>45</b> |
| <b>7</b> | <b>Diskuze.....</b>                                                 | <b>46</b> |
| <b>8</b> | <b>Bibliografie.....</b>                                            | <b>49</b> |
| <b>9</b> | <b>Seznam a zdroje použitých obrázků a tabulek.....</b>             | <b>54</b> |
| 9.1      | Seznam a zdroje použitých obrázků.....                              | 54        |
| 9.2      | Seznam použitých tabulek.....                                       | 56        |

# 1 Úvod

Imunitní systém lidí představuje složitou síť tvořenou orgány, buňkami a proteiny, jehož primární funkcí je udržení rovnovážného stavu organismu tzv. homeostázy, dále obrana před nebezpečím, které představují především patogenní mikroorganismy, ale také tělu vlastní struktury - například nádorové buňky. Má ale také řadu regulačních funkcí včetně významných interakcí s dalšími orgánovými systémy, jako je nervový nebo endokrinní systém. Rozdělujeme ho na dva hlavní pilíře - vrozený a adaptivní, přičemž oba dva jsou tvořeny jak buněčnou, tak i humorální složkou. S poruchou imunitního systému je spojena řada patologických stavů organismu, zahrnující například imunodeficiency, autoimunitní, alergická či nádorová onemocnění [1,2,5].

Ve své SOČ jsem se zabýval výzkumem konkrétní skupiny buněk, která v imunologii představuje jakousi neprobádanou část populací B lymfocytů - CD21<sup>low</sup>. O této kategorii je momentálně dostupné jen velmi omezené množství poznatků, ovšem lze s jistotou říci, že jejich zastoupení je zvýšené v řadě autoimunit [36,37,38]. Vědci se ale stále nedokáží shodnout, zda jsou pro člověka neškodné nebo zdali představují jakéhosi nepřítele, tedy původce řady vážných onemocnění.

Tuto subpopulaci jsem zkoumal v kontextu patologií thymu - myasthenie gravis s přidruženým thymomem, poněvadž vznik a souvislost těchto onemocnění stále není zcela objasněn.

Má práce se snaží roli těchto buněk přiblížit, blíže jí porozumět a podat podněty k dalšímu výzkumu, poněvadž pochopení jejich funkce by mohlo znamenat zásadní impuls pro porozumění vzniku autoimunitních chorob - vzácných, ale velmi vážných onemocnění. Na základě výsledků je totiž zřejmý přímý vliv CD21<sup>low</sup> B lymfocytů na různé patologické procesy v lidském těle.

Do jisté míry jsem byl limitován velmi nízkým počtem dat, který byl způsoben nízkou incidencí tohoto onemocnění. Především kombinace myasthenie gravis a thymomu je velmi vzácná. Pro budoucí bádání a případné ověření poznatků této práce je nutné značně rozšířit zkoumaný vzorek pacientů.

## **2 Teoretická část**

### **2.1 Základní funkce a charakteristika imunitního systému**

Mezi základní funkce imunitního systému patří ochrana před patogenními mikroorganismy zahrnující viry, bakterie nebo plísně, dále udržení homeostázy a ochrana vlastních buněk a tkání před efektorovými mechanismy imunitních buněk a jimi secernovanými molekulami. V souvislosti s funkcemi imunitního systému se setkáváme s následujícími pojmy:

#### **Obranyschopnost**

Můžeme ji vysvětlit jako schopnost rozpoznávat a ochránit organismus proti patogenním mikroorganismům - virům, bakteriím, houbám, jejich toxickým produktům i jiným cizorodým nebo nebezpečným makromolekulám. Porucha těchto mechanismů, a to jak vrozených, tak získaných, vede k rozvoji imunodeficiencí spojených především se zvýšenou vnímavostí k infekcím [1,7].

#### **Autotolerance**

Pod tímto pojmem rozumíme rozpoznávání vlastních tkání, buněk a udržování tolerance vůči nim. Schopnost autotolerance tak představuje ochranu vlastních struktur před poškozením akcelerovanou imunitní reakcí. V případě narušení těchto mechanismů může docházet k rozvoji autoimunitních (přehnaná reakce na vlastní antigeny - tzv. autoantigeny) nebo alergických onemocnění (přehnaná reakce na antigeny zevního prostředí, které u zdravých jedinců nevyvolávají imunitní reakci - tzv. alergenů) [1].

K tomuto úkolu je využíváno několik fyziologických mechanismů, ty jsou popsány v sekci Hlavní složky imunitního systému - centrální a periferní tolerance (níže).

#### **Imunitní dohled**

Slouží k rozeznání a odstraňování nefunkčních buněk, kterými mohou být například staré, mutované nebo jinak poškozené buňky [1,7].

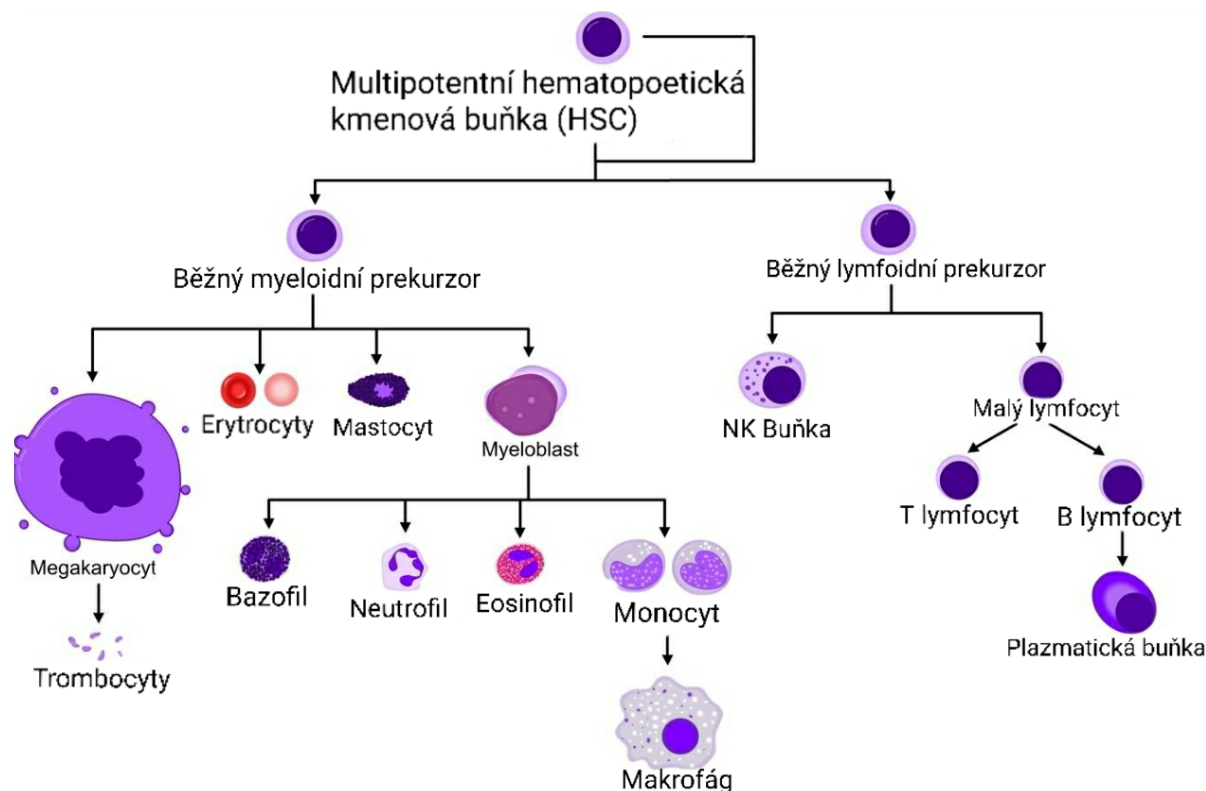
Tato funkce je důležitá především při počátcích nádorového bujení, které může být včasné zastaveno.

#### **2.1.1 Hlavní složky imunitního systému**

Součástí imunitního systému jsou kromě buněk i orgány, jež rozdělujeme na centrální a periferní.

## Centrální lymfatické orgány

Mezi centrální lymfatické orgány řadíme kostní dřeň a thymus, tedy orgány, kde dochází k diferenciaci a zrání buněk imunitního systému. Všechny buněčné složky (lymfoidní i myeloidní linie) imunitního systému se diferencují v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky, viz Obrázek 1. Jediné, které dozrávají mimo kostní dřeň až v thymu, jsou prekurzory T-lymfocytů [1,2].



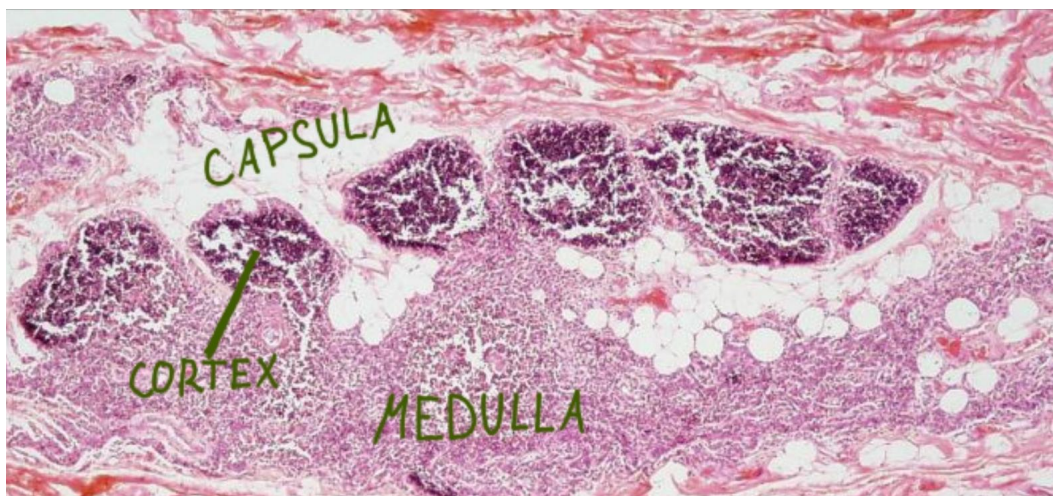
Obrázek 1: Schéma vývoje krevních buněk a buněk imunitního systému (1)

## Thymus

Thymus (brzlík) představuje především v dětství velmi důležitý primární lymfatický orgán lokalizovaný v horním hrudníku, a to těsně za hrudní kostí. Makroskopicky se jedná o orgán měkký, pružný, šedo červeného zbarvení, pyramidového, lehce zploštělého tvaru, rozdělený do dvou laloků - levý (větší) a pravý. Je funkční již od narození, kdy má váhu přibližně 16g, přičemž nejvyšší hmotnosti dosahuje v pubertě. Následně dochází ke ztrátě jeho hmotnosti a k nahrazování v tukovou tkáň (proces tukové involuce) (viz Obrázek 3 níže) [10,11,12,13].

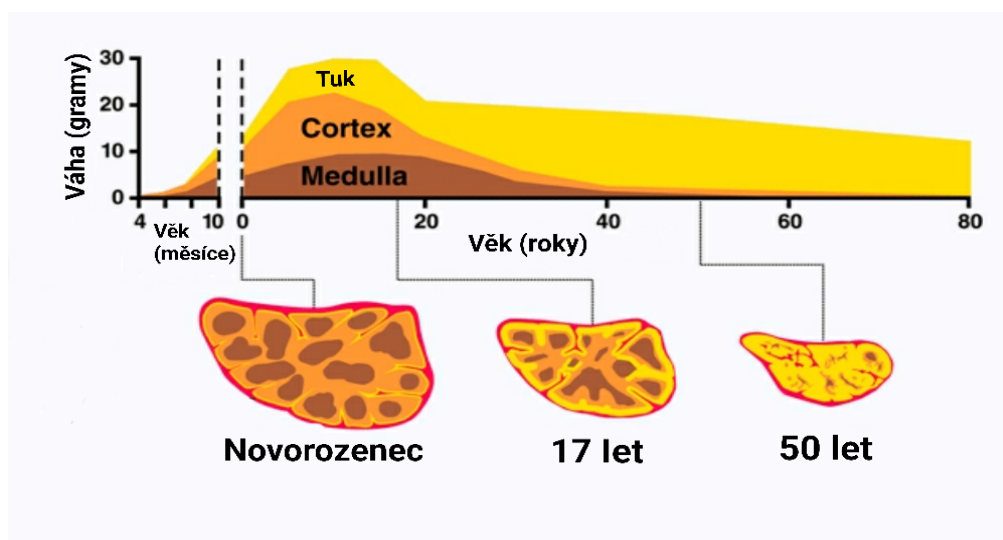
Mikroskopicky je složen z vazivové složky, parenchymu, která se dále dělí na kůru (cortex) a dřeň (medulla), přičemž na povrchu najdeme vazivové pouzdro (capsula) (viz Obrázek 2 níže). Orgán je bohatě prostoupen cévy i nervy. Medulla je charakteristická výskytem Hassalových tělísek - tvoří je odumírající epiteliální retikulární buňky, jejich počet i velikost se zvyšuje s věkem, produkují interleukiny (IL) IL-4, IL-7 podílející se na dozrávání T lymfocytů. Další významnou součástí brzlíku je hematothymická bariéra - zabraňuje kontaktu

vyvíjejících se lymfocytů s antigeny v krvi, čímž je umožněna jejich nerušená tvorba [10,11,12,13].



Obrázek 2: Řez brzlíkem (2)

Stěžejním úkolem thymu je regulace tvorby, dozrávání a diferenciací T lymfocytů, čímž představuje klíčového hráče v procesu ustanovení autotolerance vůči vlastním strukturám a tkáním. Mimo to tvoří množství hormonů, například thymosiny, thymulin, kterými ovlivňuje funkci ostatních orgánů imunitního i neuroendokrinního systému. Zmiňované činnosti po jeho atrofii přebírají periferní lymfatické orgány [10,11,12,13].



Obrázek 3: Vývoj hmotnosti brzlíku v životě jedince a proces tukové involuce (3)

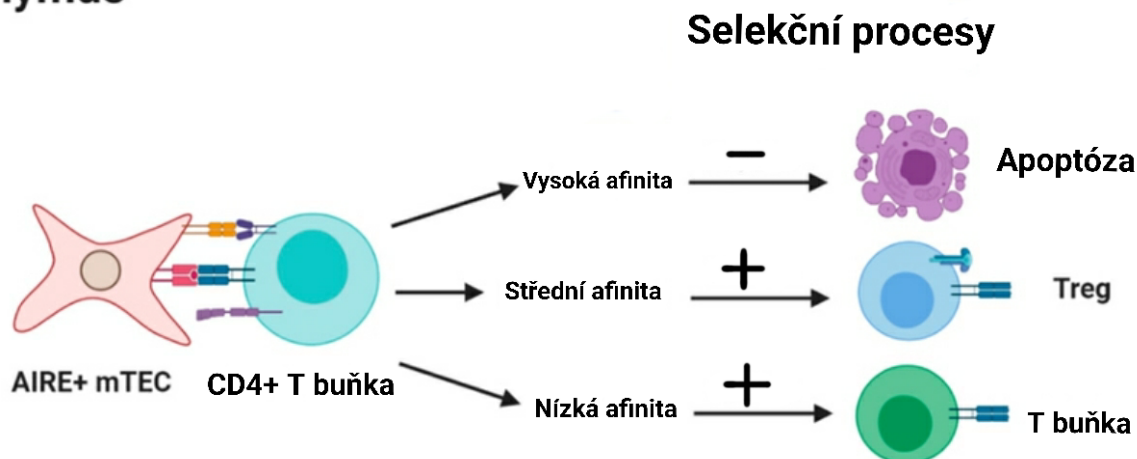
### Centrální tolerance

Tento typ tolerance se pro každý typ imunokompetentních buněk ustanovuje jinak - pro T lymfocyty v thymu (viz Obrázek 4 níže) a pro B lymfocyty v kostní dřeni [1].

Zde je ovšem důležité doplnit, že v thymu jsou na epiteliálních medulárních buňkách (negativní selekce) exprimovány tkáňově specifické antigeny, a to pomocí transkripčního

faktoru AIRE, jež reguluje thymovou expresi těchto konkrétních antigenů. Jeho porucha způsobí selhání centrální tolerance - vznik autoimunitního polyglandulárního syndromu [1].

## Thymus



Obrázek 4: Schéma průběhu selekce v thymu (4)

Tento mechanismus úzce spolupracuje s periferní tolerancí. Treg totiž operují přímo v dané tkáni nebo v regionálních uzlinách [1].

## Periferní lymfatické orgány

Mezi periferní lymfatické orgány patří slezina, lymfatické uzliny a slizniční lymfatická tkáň, která je rozptýlena v submukózní tkáni dýchacího, trávicího, vylučovacího a pohlavního ústrojí (mucosa associated lymphoid tissue, MALT) [1,2].

Charakteristickým znakem periferních lymfatických orgánů je aktivace buněk adaptivního imunitního systému, a to buď prostřednictvím antigen prezentujících buněk (antigen presenting cell, APC), či rozeznání nativního antigenu B lymfocyty.

## Periferní tolerance

Periferní tolerance zahrnuje několik mechanismů:

- Klonální delece - fyzická eliminace lymfocytů po reakci s autoantigenem díky vyvolání apoptózy [1,5].
- Klonální anergie - dochází ke ztrátě nebo omezení reaktivity imunokompetentních buněk po tom, co není poskytnut kostimulační signál [5,8,1].
- Klonální ignorance - autoantigeny exprimovány na vlastních tkáních v podprahovém množství neposkytují dostatečný signál k aktivaci buněk imunitního systému [1].
- Suprese - za přítomnosti Treg dochází k potlačení autoreaktivních lymfocytů. Na tomto procesu se podílí třeba i některé subpopulace dendritických buněk, monocytů, žírné buňky, ty produkují inhibiční cytokiny nebo podporují diferenciaci Treg [1].

- Imunologické privilegium - zamezuje průchodu lymfocytů do tkání, případně na svém povrchu exprimuje Fas-ligand, který po navázání na Fas-receptor navodí apoptózu. Příkladem je rohovka, kanálky varlete [5,8].

## 2.2 Nespecifická (vrozená) imunita

Nespecifická neboli vrozená imunita tvoří první bariéru před patogenními organismy. Pokud je však porušená, k imunitní reakci dochází velmi brzy - v řádu několika minut. Do nespecifické imunity řadíme kromě fagocytujících buněk, buněk komplementového systému, interferonů i například povrch kůže. Hlavním úkolem nespecifické imunity je rozpoznání nebezpečí, aktivace imunitní odpovědi a adaptivního imunitního systému. Tyto buňky odhalují pomocí receptorů rozpoznávajících vzory (Pattern recognition receptors, PRR) molekuly asociované s patogeny tzv. PAMP (Pattern-associated molecular pattern) (např. struktury buněčných stěn mikroorganismů) a dále molekuly asociované s nebezpečím neboli poškozením vlastních buněk tzv. DAMP (Damage-associated molecular pattern) (např. intracelulární proteiny). Efektorové mechanismy nespecifické imunity zahrnují především fagocytózu, produkci cytokinů a dalších rozpustných mediátorů [1,7].

Nespecifická imunitní reakce je zprostředkována především myeloidní skupinou buněk, kam řadíme granulocyty, monocyty, dendritické buňky a mastocyty. Ovšem z lymfoidní linie sem můžeme zařadit NK buňky (Natural Killers) a přirozené lymfoidní buňky (Innate Lymphoid Cells, ILC), jelikož na jejich povrchu nelze nalézt žádné antigen specifické receptory [3,4].

### 2.2.1 Buňky nespecifického imunitního systému

#### NK a NKT buňky

NK buňky se rovněž označují jako “nulové buňky”, to díky nepřítomnosti specifických receptorů T (T-cell receptor, TCR) a B (B-cell receptor, BCR) na jejich povrchu. Jejich nejdůležitější funkcí je cytotoxicita pomocí perforinu a granzymu, kdy po rozpoznání virem infikovaných či nádorových buněk způsobují lýzu cílové buňky, tedy její smrt. Druhou důležitou funkcí je, díky přítomnosti komplementového receptoru CD16, tzv. cytotoxická smrt těch buněk, na jejichž povrchu jsou vázány molekuly imunoglobulinů (Ig) typu IgG. V neposlední řadě jsou NK buňky producenty řady cytokinů - především IFN $\gamma$  a TNF $\alpha$ , jež dále aktivují řadu buněk imunitního systému [3].

Oproti tomu NKT lymfocyty (Natural Killers T-lymphocytes) řadíme mezi populaci T lymfocytů, jež mají receptory a funkce NK buněk. U lidí je jejich počet velmi variabilní a vytváří rozhraní mezi nespecifickou a adaptivní imunitou. Hlavní úkol spočívá v regulaci imunitní odpovědi nebo rozpoznání glykolipidů/lipidů v komplexu s neklasickými MHC glykoproteiny (MHC gp), tedy CD1d. Produkují velké množství cytokinů, které ovlivňují odpověď pomocných T lymfocytů (T helper cell, Th) 1 a 2.

## **ILC**

ILC jsou svými funkcemi a morfologií velmi podobné T lymfocytům, ale díky jejich rychlé aktivaci s absencí TCR se řadí mezi buňky nespecifického imunitního systému. Lokalizovány jsou především na rozhraní vnějšího a vnitřního prostředí, převážně tedy na sliznicích, kde se mohou setkat s patogeny a reagovat na ně. Jejich funkcí je především produkce celé řady cytokinů nebo udržování homeostázy [4].

## **Granulocyty**

Granulocyty charakterizuje výskyt sekrečních granul v jejich cytoplazmě a členité jádro. Dle barvitelnosti granul rozlišujeme tři typy těchto buněk - neutrofile, bazofily a eosinofily. Nejpočetnější bílé krvinky jsou neutrofile, které mají schopnost fagocytózy, čímž se podílejí na likvidaci bakterií. Naopak v řádu jednotek procent jsou v krvi zastoupeny bazofily společně s eosinofily. Bazofily jsou charakteristické pro svůj obsah histaminu v granulích, díky tomu hrají roli jednak v alergické reakci, ale také v boji proti parazitům, kde se uplatňují i eosinofily, ty se mimo jiné účastní i zánětlivých reakcí a stejně jako neutrofile jsou schopné fagocytózy. Životnost těchto granulocytů není příliš dlouhá, proto je jejich produkce zvýšená převážně za výše uvedených situací [3].

## **Monocyty, dendritické buňky a makrofágy**

Monocyty představují nezralé formy makrofágů a dendritických buněk, jež cirkulují v krvi. Pro dendritické buňky společně s makrofágy je charakteristická schopnost fagocytózy, dále tvoří jakýsi most mezi nespecifickým a adaptivním imunitním systémem, především díky schopnosti prezentovat části pohlcených patogenních mikroorganismů ve formě peptidu v komplexu s MHC gp II. třídy. Díky tomu se řadí mezi APC. Tyto prezentované antigenní části jsou následně předkládány a rozpoznány T-lymfocyty, ty díky tomu mohou zahájit specifickou reakci [3,7,15].

MHC gp chápeme jako produkty rozsáhlého komplexu genů (HLA - Human Leucocyte Antigen), které jsou ukotvené na vnější straně cytoplazmatické membrány buněk a váží peptidy odrážející děje vnitřního prostředí včetně jeho složení - jsou tedy nezbytné k rozeznání vlastních struktur od cizích (patogenních). Rozpoznáváme několik tříd MHC gp, těmi základními jsou MHC gp I a II typu. MHC gp I se nacházejí na povrchu všech jaderných buněk, přičemž prezentují peptidy pocházející z vnitřního prostředí buňky. Naopak exprese MHC gp II je charakteristická převážně pro APC a váží zejména antigeny, jež pocházejí z pohlcených patogenních mikroorganismů. Můžeme se však setkat s výjimkami, tedy se situací, kdy jsou antigeny patogenů prezentovány v komplexu s MHC gp I nebo naopak - v případě tzv. cross-prezentace [15,16].

## **2.3 Specifická (adaptivní, získaná) imunita**

Specifická imunita je v porovnání s nespecifickou pomalejší, přičemž k její aktivaci dochází až v řádu dnů. Dalším rozdílem je způsob rozpoznávání nebezpečí, kdy jsou systému

předkládány antigeny pomocí MHC gp prezentovanými od APC, výjimkou je však část B lymfocytů, která je schopna rozpoznat antigen v nativním stavu a fungovat jako APC. K rozpoznání slouží specifické receptory na povrchu T i B lymfocytů, konkrétně TCR a BCR. Navíc specifická imunita funguje na tzv. anticipačním mechanismu, kdy je v těle předem připraveno nejméně několik desítek milionů T a B buněk s individuálně odlišnými antigenně specifickými receptory. Jakmile se lymfocyt setká s konkrétní cizorodou látkou, začne za vhodných podmínek proliferovat, přičemž jejich efektorové mechanismy vedou k eliminaci patogenu. V průběhu imunitní reakce také vznikají tzv. paměťové buňky, ty reagují daleko rychleji a účinněji při opětovném setkání se stejným antigenem, kdy se v tomto případě jedná o sekundární imunitní odpověď [1,7,15].

K aktivaci buněk specifické imunity nedochází pouhým rozpoznáním patogenních antigenů, ale pro tento proces je nezbytná funkce i tzv. kostimulačních (pomocných) signálů. Díky tomu nedochází k aktivaci imunitní reakce v nevyžádaném okamžiku, čímž se významně snižuje riziko poškození organismu [1,15].

V této imunitě se uplatňují především buňky z lymfoidní linie, konkrétně při buněčné odpovědi T lymfocyty, v humorální pak Ig, které jsou produkty konečného stadia diferenciaci B lymfocytů, tedy plazmatických buněk [2].

### 2.3.1 Humorální imunita

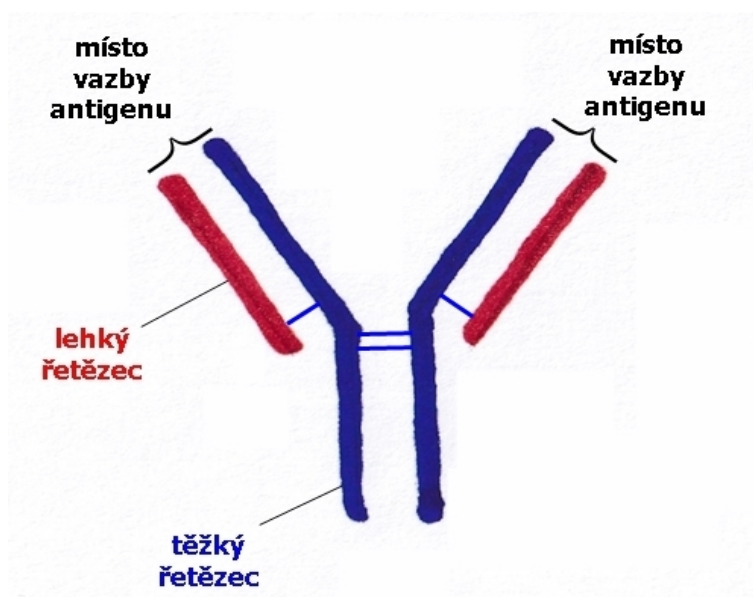
Jak bylo zmíněno výše, humorální odpověď adaptivního imunitního systému tvoří protilátky. Ty mohou být buď vázané na membráně, kdy fungují jako receptory, nebo secernované plazmatickými buňkami.

#### Imunoglobuliny

Molekula Ig je tvořena dvěma těžkými (H) kovalentně spojenými řetězci, dále pak dvěma lehkými (L) řetězci připojenými k H řetězcům pomocí cysteinových můstků [19]. Díky tomu molekula připomíná tvar písmene Y (viz Obrázek 5 níže). Jejich rozvětvená část je velmi variabilní, poněvadž se jedná o místo, které je zodpovědné za vazbu k antigenu [2,19].

Rozlišujeme dva typy L -  $\kappa$  a  $\lambda$  a pět variant H -  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$  řetězce. Toto dělení určuje rozdíly ve složení i velikosti konstantního úseku. Podle typů těžkých řetězců dále rozlišujeme pět základních tříd Ig - IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Nejpočetněji jsou v krvi zastoupeny imunoglobuliny třídy **IgG**. Jejich hlavní funkcí je aktivace komplementového systému, opsonizace patogenů, neutralizace toxinů a ochrana novorozenců (jako jediné procházejí v průběhu těhotenství přes placentu do plodu). Dále pak vytváří komplexy s antigeny tzv. imunokomplexy, ty následně aktivují imunitní buňky, např. NK. Jejich molekuly jsou monomerní na rozdíl od imunoglobulinu **IgA**, ten se nejčastěji vyskytuje v dimerní formě. Většinu těchto protilátek lze nalézt na sliznicích, kde mají především opsonizační funkci. Dále se setkáváme s **IgM**, ten se v monomerní formě nachází na povrchu B lymfocytů, kde tvoří specifický receptor BCR. Naopak v krvi ho najdeme ve formě pentameru, aktivuje zde komplement, či vazbou na antigen vytváří aglutináty. Nejméně jsou v krvi zastoupené

protilátky třídy **IgD** a **IgE**. IgD najdeme na povrchu membrány v podobě BCR, zatímco v krvi je ho velmi málo. IgE se uplatňuje především v průběhu alergických reakcí a při obranných procesech proti parazitům [15,19].



Obrázek 5: Schéma obecné stavby imunoglobulinu (5)

## 2.3.2 Buněčná imunita

### B lymfocyty

B lymfocyty se řadí mezi specifické buňky adaptivního imunitního systému vyvíjející se v kostní dřeni. Jedná se primárně o producenty protilátek, dále pak fungují i jako APC. Je pro ně charakteristická přítomnost specifického receptoru na povrchu, v případě B lymfocytů mluvíme o BCR, jež je tvořen molekulou imunoglobulinu a asociovaného signalizačního komplexu. Pomocí tohoto receptoru rozeznávají antigeny a společně s kostimulačními signály dochází k jejich aktivaci. Imunitní odpověď zprostředkovanou B lymfocyty dělíme dle potřeby pomoci T lymfocytů k jejich aktivaci do dvou základních skupin. B lymfocyty nezávislé na T lymfocytech rozeznávají prostřednictvím BCR nejčastěji polysacharidy či lipopolysacharidy bakterií. Výsledkem je produkce nízkoafinních molekul IgM. Naopak pro rozpoznání proteinových antigenů potřebují pomoc T-lymfocytů, přičemž výsledkem je tvorba vysokoafinních protilátek třídy IgG a paměťových buněk [1].

V prvotní fázi protilátkové odpovědi dochází k produkci IgM s nízkou afinitou, jež blokuje další šíření infekce. Interakce pomocných T lymfocytů s B lymfocyty je stěžejní pro tvorbu vysokoafinních protilátek, které vznikají až v pozdější fázi imunitní odpovědi. Později dochází k tzv. afinitní maturaci, která je způsobena somatickými mutacemi v H i L řetězcích imunoglobulinů. Zde také dochází k procesu zvanému “izotypový přesmyk” a vzniku protilátek IgG, IgA, IgE [1].

V průběhu zrání i diferenciaci B lymfocytů se setkáváme s jejich následujícími populacemi [1]:

### **Základní subpopulace B lymfocytů**

Je možné rozlišit šest subpopulací:

- Tranzientní B lymfocyty

Jedná se o tzv. přechodové lymfocyty, tedy lymfocyty mezi nezralým a zralým stadiem naivních buněk sleziny.

- Naivní B lymfocyty

Nazýváme tak ty buňky, které se nesetkaly s antigenem. Lokalizovány jsou převážně ve slezině nebo lymfatických uzlinách. Charakteristická je pro ně exprese molekuly IgD, která se po aktivaci ztrácí.

- Lymfocyty marginální zóny

Tento typ najdeme v marginální zóně nacházející se mezi bílou a červenou pulpou sleziny. Svým umístěním je můžeme považovat za buňky první ochranné linie proti patogenům v krvi. Jsou zapojeny do časně odpovědi, jedná se tedy převážně o producenty IgM.

- Paměťové B lymfocyty

Vznikají v sekundárních lymfoidních orgánech a vyznačují se dlouhou životností, kdy přežívají v periferní krvi nebo kostní dřeni. Díky tomu se mohou opakovaně setkat s antigeny, přičemž jejich reakce a aktivace je rychlejší v porovnání s naivními buňkami.

- Plazmablasty

Jedná se o krátce žijící buňky produkující protilátky v rané fázi imunitní odpovědi.

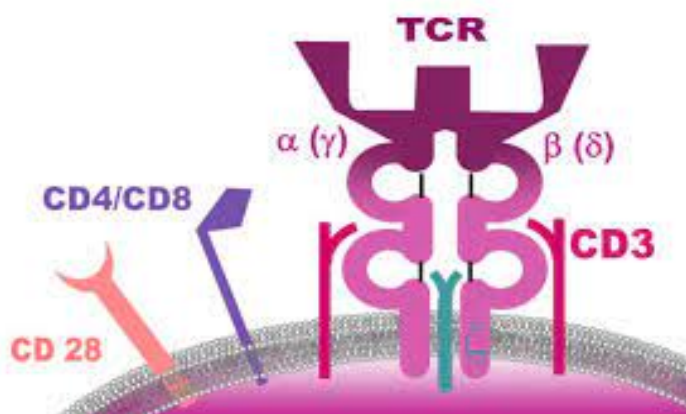
- CD21<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup>

Jde o populaci buněk, která není příliš zastoupená u zdravých jedinců. Jejich funkce nebyla doposud zcela objasněna, nicméně poslední studie ukazují [36,37,38] zvýšený počet u osob trpících akutní infekcí nebo autoimunitním onemocněním.

### **T lymfocyty**

T lymfocyty jsou nejpočetnějšími buňkami z lymfoidní linie. Účastní se jak protilátkových, tak i buněčných reakcí. Charakteristické jsou svým specifickým receptorem lokalizovaným na povrchu jejich membrány. Ten je tvořen dvěma transmembránovými proteiny společně s

komplexem nezbytným pro přenos signálu - CD3. T-lymfocyty se dělí na základní dvě populace dle typu TCR -  $\alpha\beta$  nebo  $\gamma\delta$ . Na povrchu T lymfocytů lze najít i několik dalších koreceptorů, mezi které patří například CD4 (CD8), CD28 (viz Obrázek 6 níže). Velmi důležitý je CD28, který vazbou na ligand (CD80/CD86) nacházející se převážně na povrchu aktivované APC zprostředkovává druhý signál nezbytný k plné aktivaci T lymfocytu (TCR tvoří první), bez této interakce by nastala anergie T lymfocytu. Od B lymfocytů se liší nejen svou funkcí, ale také strukturou, kterou rozeznávají specifické receptory. T lymfocyty jsou schopné rozpoznat pouze antigenní peptidy, které jsou navázány v komplexu s MHC gp, nikoli však nativní antigen jako B lymfocyty [24,25].



Obrázek 6: Schéma molekul potřebných k plné aktivaci T lymfocytu (6)

## Vývoj T lymfocytů

T lymfocyty stejně jako ostatní buňky imunitního systému vznikají v kostní dřeni z hematopoetické kmenové buňky (viz Obrázek 1 na straně 12), odkud se krevním řečištěm dostávají do thymu ve stadiu tzv. pro-thymocytů. V brzlíku tyto buňky podstupují pozitivní i negativní selekci, jejichž výsledkem je smrt autoreaktivních buněk a buněk, jejichž TCR nerozpozná komplex MHC gp s nízkou afinitou. Při obou procesech zahyne více než 90% thymocytů. Dozralé imunokompetentní buňky opouštějí thymus a usídlují se v periferních lymfatických orgánech [1,9,22,25].

Některé autoreaktivní buňky ovšem nehynou, vyvíjejí se z nich tzv. regulační T lymfocyty (Treg), viz dále. Ty mají velmi důležitou úlohu v udržování periferní tolerance k vlastním tkáním.

## Základní subpopulace T lymfocytů

Dle přítomného koreceptoru dělíme dále T lymfocyty na subpopulaci CD4 tzv. Th či na CD8 tzv. cytotoxických lymfocytů (Cytotoxic T cell, Tc).

- Tc (CD8+)

Molekuly CD8 jsou koreceptory, které se váží na antigenní peptidy v komplexu s MHC gp I. Rozeznávají buňky infikované viry, bakteriemi, jinými intracelulárními parazity, popřípadě ty poškozené stresem nebo nádorově pozměněné. Efektorové funkce Tc lymfocytů vedou ke smrti napadené buňky, a to několika mechanismy: působením vylučovaných proteinů - perforinu, granzymu způsobí lýzu cílové buňky a aktivaci apoptózy. Druhým možným způsobem vedoucím k apoptóze cílové buňky je interakce Fas-receptoru a Fas-ligandu, který je exprimovaný na povrchu aktivovaných CD8 lymfocytů. Během imunitní odpovědi je nesmírně důležitá přísná regulace aktivace CD8 lymfocytů, aby nedošlo k poškození zdravých buněk nebo tkání [1,22].

- Th (CD4+)

Hlavním úkolem pomocných CD4 lymfocytů je produkce cytokinů, regulace imunitní odpovědi, včetně aktivace buněk imunitního systému např. B lymfocytů a makrofágů. Tyto buňky nesou na svém povrchu koreceptory CD4, které se váží na MHC gp II antigenní peptidy. Podle produkováných cytokinů (základních regulátorů imunitního systému) je lze rozdělit do podtypů následovně [1,22]:

Th1 - jejich hlavní funkcí je aktivace makrofágů při zánětu pomocí produkovaného IFN- $\gamma$ , čímž se primárně uplatňují v boji proti intracelulárním bakteriím. Dále se vyznačují produkcí IL-2, ten je nezbytný pro proliferaci a aktivaci řady imunitních buněk [25,1].

Th2 - soustředí se především v boji proti extracelulárním hrozbám včetně velkých mnohobuněčných parazitů. Dále najdou uplatnění v průběhu alergických reakcí. Produkované cytokiny IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 hrají důležitou roli v aktivaci žírných buněk i bazofilů, rovněž vedou k imunitnímu přesmyku produkovaných imunoglobulinů B lymfocyty a regulaci imunitní reakce [1,25].

Th17 - působí především proti extracelulárním patogenům a produkcí cytokinů (IL-17, 21, 22) aktivují neutrofile - mají tedy prozánětlivý účinek [1].

Důležité je, že cytokiny produkované Th1 (především IFN- $\gamma$ ) podporují jejich další vývoj a velmi účinně inhibují Th2. To stejné platí i naopak pro Th2 lymfocyty (IL-4, IL-10). Jedná se o jeden z nejdůležitějších imunoregulačních mechanismů [1].

- Treg (CD4+)

Jde o velmi důležitou skupinu lymfocytů, které regulují imunitní odpověď a rovněž potlačují vznik autoimunitních chorob. Hlavním povrchovým znakem je molekula CD25, tedy podjednotka receptoru pro IL-2. Rozlišujeme dvě základní subpopulace regulačních T lymfocytů [25]:

Přirozené Treg - vyskytující se především v krvi nebo lymfatických uzlinách a zpravidla inhibují imunitní reakci proti vlastním antigenům. Narozdíl od indukovaných Treg vznikají přímo v thymu v průběhu selekce [1,25].

Indukované Treg - buňky vznikající v periférii působením kombinace cytokinů IL-2 a TGF- $\beta$ , působí obdobně jako přirozené Treg [1].

Společně mají zásadní význam v udržování periferní tolerance i v regulaci imunitní odpovědi, a to několika mechanismy. Jednak exprimují prozánětlivé cytokiny (IL-10, TGF- $\beta$ ), přímým kontaktem inhibují APC, produkci perforinu a granzymu zapříčiní lýzu cílových buněk, v neposlední řadě vychytávají molekulou CD25 IL-2, ten je nezbytný pro proliferaci a efektorovou funkci CD4 i CD8 T lymfocytů. Na druhou stranu díky jejich efektorovým funkcím mohou představovat zásadní překážku k eliminaci nádorových buněk nebo některých infekcí [1].

## **2.4 Poruchy funkce imunitního systému**

Nedostatečná či naopak zvýšená funkce imunitního systému (jeho jednotlivých složek) je často asociovaná s výskytem patologického stavu organismu, kam mimo jiné řadíme imunodeficienci, autoinflatorní onemocnění, alergie či autoimunitu.

### **2.4.1 Imunodeficiencie**

Tyto poruchy lze charakterizovat jako sníženou obranyschopnost organismu vůči infekcím. Dají se rozdělit na primární, které jsou vrozené, často geneticky podmíněné, a sekundární, ty mohou být získané působením vnějších i vnitřních vlivů v průběhu života jedince. Další dělení je určeno podle složky imunitního systému, kterou postihují [1,17].

#### **Primární imunodeficiencie**

Jedná se o skupinu velmi vzácných onemocnění. Vznikají poruchou genů, ta v nejtěžších případech vede k úplné ztrátě exprese a funkce dané molekuly. Touto molekulou může být například membránový nebo signalizační protein, enzym, strukturální buněčný protein či secernovaný glykoprotein. Zmíněná porucha může v procesu diferenciaci imunocytů způsobit absenci celé buněčné linie. Narušení regulačních funkcí může vést k dysregulaci imunitního systému, to se projeví autoimunitními, lymfoproliferativními, granulomatózními či alergickými projevy [1].

Jako příklad protilátkové imunodeficiencie můžeme uvést Brutonovu agamaglobulinémii, běžný variabilní imunodeficit či hyper IgM syndrom. Buněčná složka bývá narušena v rámci kombinovaných imunodeficiencí. Cyklická neutropenie či chronická granulomatózní choroba pak reprezentují vrozené imunodeficiencie v procesu fagocytózy.

## **Sekundární imunodeficiency**

Tento typ se vyskytuje poměrně často napříč medicínskými obory. Nejčastější příčinou zmíněných stavů mohou být například rozsáhlé popáleniny, polytraumata, alkoholismus, imunosupresivní nebo cytostatická léčba, ozařování, v rozvojových zemích pak podvýživa. Obecně je lze souhrnně charakterizovat jako určité poškození přirozených obranných mechanismů či konkrétních složek imunity [1].

Příkladem je stav způsobený HIV, dále pak poléková neutropenie nebo hypogamaglobulinémie [1].

### **2.4.2 Alergie**

Alergie jsou charakterizované jako hypersenzitivní reakce imunitního systému na neškodné exoantigeny (alergeny). Jak bylo popsáno výše v sekci Humorální imunita - Imunoglobuliny v kapitole 2.3.1 na straně 17, nejčastěji jsou alergie zprostředkovány protilátkami typu IgE, přičemž mediátory jsou především mastocyty a bazofily [14,21].

Téměř čtvrtina celosvětové populace trpí určitým druhem alergie, přičemž zhruba u poloviny případů lze pozorovat pozitivní rodinnou anamnézu. Bohužel zatím se nedaří u většiny pacientů odhalit příčinu vzniku alergického onemocnění [1,14].

Alergickými reakcemi bývá nejčastěji postižena kůže (atopický ekzém, kontaktní dermatitida, kopřivka), sliznice horních a dolních cest dýchacích (alergická rýma, astma bronchiale), případně oční spojivky (alergická konjunktivitida). Tato místa jsou vystavena přímému působení alergenu. Jakmile by krví (bodnutí hmyzem) nebo zažívacím traktem (potravin, léky) došlo k proniknutí antigenu do organismu, pozorujeme systémovou anafylaxi, ta může vyústit v život ohrožující anafylaktický šok, ten je charakteristický především hypotenzí, tachykardií, bronchospasmem, případně bezvědomím [1].

Mezi základní druhy alergií lze řadit polinózu, astma bronchiale, atopický ekzém.

### **2.4.3 Autoinflamatorní onemocnění**

Autoinflamatorní onemocnění charakterizuje především výskyt opakovaných a nekontrolovatelných zánětů, jejichž příčinou nejčastěji bývají poruchy imunity na úrovni vrozeného systému. Jedná se konkrétně například o mutaci genů zodpovědných za regulaci aktivace imunokompetentních buněk. Tyto stavy jsou charakteristické opakovanými horečkami, artritidami nebo dalšími různými kožními příznaky [26,28].

Příkladem jsou například kryopyrinopatie, hyper IgD syndrom, familiární středomořská horečka.

#### **2.4.4 Autoimunitní onemocnění**

Důležitou vlastností imunitního systému je rozpoznávat a následně zneškodnit poškozené, staré nebo zmutované buňky vlastního těla. Jakmile selže schopnost rozlišit škodlivé od neškodného a poškodí se zdravá tkáň, hovoříme o autoimunitním onemocnění, tedy o abnormální reakci na autoantigeny, která vede k chronickému zánětu, jenž je pro tyto choroby typický. Proto se tyto stavy označují jako IMID (immune mediated inflammatory disorders) [1,2,27].

Autoimunitní reakce může být jak buněčného, tak humorálního typu. V té protilátkové dochází nejčastěji k tvorbě izotypu IgG s vysokou afinitou. Ta pak způsobuje buď imunopatologické reakce II. typu, tj. cytotoxickou reakci, nebo III., která spočívá v tvorbě a ukládání imunokomplexů [27,1].

Podmínkou pro spuštění takového onemocnění je prolomení autotolerance a přechod z fyziologické autoimunity v patologickou, proto se na vzniku těchto chorob podílí vysoké množství vnitřních i vnějších faktorů. Kromě některých vzácných vrozených monogeneticky podmíněných autoimunitních syndromů není zatím znám jediný spouštěcí faktor ani genetická anomálie, která by prokazatelně vedla ke vzniku autoimunity [2].

Je potřeba si uvědomit, že dělení těchto nemocí není dokonalé, jelikož existují choroby s převažující manifestací v určitém orgánu, ale jsou doprovázeny výskytem autoprotilátek proti orgánově nespecifickým antigenům [1]. Můžeme je ale charakterizovat dle následujícího dělení:

##### **Systémová autoimunitní onemocnění**

V této skupině chorob se uplatňují orgánově nespecifické protilátky. V důsledku ukládání imunokomplexů je postiženo více tkání a orgánů najednou [27]. Typickým příkladem může být systémový lupus erythematosus [1].

##### **Orgánově lokalizovaná autoimunitní onemocnění**

Je zde opět patrný výskyt orgánově nespecifických protilátek, ale výsledné poškození je lokalizováno na konkrétním ústrojí [27,1]. Jako příklad lze uvést autoimunitní hepatitidy nebo nespecifické střevní záněty, jako je Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida [1].

##### **Orgánově specifická autoimunitní onemocnění**

V těchto případech se uplatňují orgánově specifické protilátky a autoreaktivní T lymfocyty (Th1, Tc). Mnohdy se můžeme setkat s kombinací buněčných i humorálních odpovědí [27,1]. Řadíme sem například myasthenii gravis, autoimunitní onemocnění štítné žlázy nebo diabetes I. typu [1].

Faktory, které ovlivňují vznik autoimunitního onemocnění, můžeme rozdělit na vnitřní a vnější. V každé kategorii je uvedeno několik příkladů.:

## **Vnitřní faktory**

- Asociace s MHC

U několika autoimunitních onemocnění je přítomna asociace s určitým haplotypem nebo alelami MHC gp I. i II. třídy. Nejvýznamnější je například HLA-B27 s ankylozující spondylitidou a dalšími spondyloartritidami. Další asociací je HLA-DQ2 a DQ8 s celiakií. HLA-B27 s DQ molekulami lze využít i k diagnostice těchto onemocnění. HLA-DR3 je pak asociován s myasthenií gravis [1,27].

- Geny regulující apoptózu a aktivaci buněk

Jakmile v těchto genech proběhne mutace, nedochází k adekvátní regulaci a ukončení imunitní reakce. Nejčastěji se jedná o postižení genů kódující proteiny účastníci se kostimulačních a regulačních signálů, jako jsou například Fas-receptor, Fas-ligand, Bcl-2, CTLA-4, Bim [27,1].

- Hormonální faktory

Ty vysvětlují zvýšený výskyt většiny autoimunitních chorob u žen, a to především v dospívání a po porodu. Jedním z hlavních hormonů ovlivňující imunitní reakce je estrogen. Bylo prokázáno, že významně zvyšuje expresi interferonů typu I, jejichž nadprodukce je spojena se systémovými onemocněními pojiva [27,1].

## **Vnější faktory**

Největší uplatnění zde najde infekce, která odkryje pro imunitu prozatím nepoznané autoantigeny (kryptické), dále stres, způsobující hormonální dysbalanci, léky, chemikálie, UV záření, především kvůli porušení regulačních mechanismů a modifikace autoantigenů [27,1].

## **Vznik autoimunitního onemocnění**

Za předpokladu působení vnitřních i vnějších faktorů a za určitých okolností (prolomení autotolerance) může vzniknout autoimunitní onemocnění. Za jeho zrozením ovšem stojí několik fází, kdy se různé regulační mechanismy snaží průběh zvrátit [1]. Těchto stadií je hned několik:

### **Fáze vnímavosti**

V tomto stavu je již narušena tolerance, jedinec se tak stává predisponován ke vzniku patologické autoimunity. Tato fáze jde těžko odhalit, prakticky ji lze pouze předvídat na základě rodinné anamnézy [1,20].

### **Fáze iniciace**

Klinické symptomy ani lokalizovaný zánět se v této fázi nevyskytuje. V séru jsou ale již přítomné autoprotilátky, které je možno v rámci laboratorních vyšetření odhalit a podchytit [20].

### **Fáze propagace**

Objevují se první klinické příznaky, zároveň začíná být patrné poškození cílové tkáně vlivem zánětu. Lze pozorovat přítomnost autoprotilátek specifických pro danou chorobu. Zároveň jsou aktivovány regulační mechanismy snažící se o zvrácení vývoje onemocnění [20].

### **Fáze regulace**

Jakmile nedojde ke spontánní remisi onemocnění, je cílem léčebných metod zabránit dalšímu rozvoji a poškození. K tomuto úkonu je využívána především imunosupresivní nebo protizánětlivá léčba [1,20].

### **Fáze rezoluce nebo progresu**

Na základě genetické výbavy jedince nebo vnějších zásahů může dojít ke spontánnímu zastavení autoimunitního procesu. V opačném případě, kdy nastane selhání regulačních mechanismů, dochází k dalšímu vývoji a postupnému prolomení tolerance vůči různým orgánům. Obvykle se začnou vyskytovat reakce proti více autoantigenům. Charakteristický je výrazný zánětlivý proces v cílových tkáních [1,20].

### **Fáze ireverzibilního poškození**

Imunopatologické procesy zánětem trvale poškodí orgány. Pokud nedojde k selhání životních funkcí pacienta, autoimunitní reakce zde obvykle vyhasíná - dojde k vymizení autoreaktivních protilátek. U některých onemocnění (například diabetes I. typu) probíhají všechny předchozí fáze asymptomaticky, choroba se proto projeví až v tomto stadiu, kdy v důsledku poškození buněk produkujících inzulin dojde k jeho nedostatku [1].

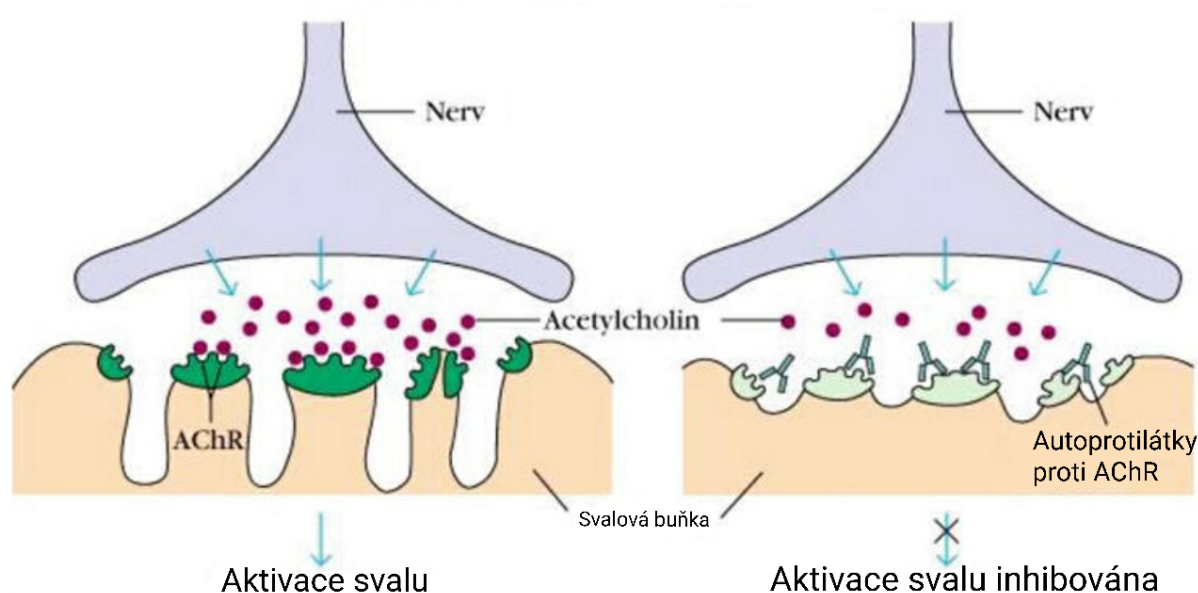
## **2.5 Myasthenia gravis**

Myasthenia gravis (MG) je chronické autoimunitní onemocnění, vyskytující se častěji u žen, postihující přenos na nervosvalové ploténce - místo mezi nervovým zakončením a vláknem příčně pruhovaného svalu. Z konce nervu je vlivem šíření vzruchu uvolněn acetylcholin působící na acetylcholinové receptory (AChR). Tento mechanismus otevře kanály pro sodíkové ionty, jejichž změněná koncentrace vyvolá podráždění. Celý tento proces reguluje acetylcholinesteráza, která rozkládá molekuly acetylcholinu, tím pádem nedojde k opětovné reakci s receptorem a proběhne uzavření kanálů. Kontrakce se tímto ukončuje. Obvykle je množství uvolněného acetylcholinu vyšší, než je nutně potřeba pro úspěšnou kontrakci, díky tomu je přenos mnohem spolehlivější. MG narušuje výše popsanou kaskádu dějů vedoucí ke svalovému stahu - dojde k utlumené aktivaci svalu [18,29,32].

Konkrétně jde o produkci autoprotilátek (IgG) proti AChR (hlavně IgG1, IgG2 - IgG4 jsou identifikovány v nižším počtu případů) a jeho okolí. Tyto látky jsou přítomné až u 85% tzv. séropozitivních pacientů. Ostatní pacienti vykazují přítomnost autoprotilátek proti svalově specifické tyrozin kináze (MuSK, nejčastěji IgG4), což je povrchový receptor nezbytný pro shlukování AChR, lipoprotein-related proteinu 4 (LRP4) (nejvíce IgG2, IgG1), případně agrinu, titinu, ryanodinovému receptoru, draselnému kanálu KV1.4 [18,30,32,31,33].

### **Myasthenia gravis s výskytem protilátek proti acetylcholinovému receptoru (AChR-MG)**

Nikotinový acetylcholinový receptor je pentamer poskládaný ze dvou  $\alpha$  podjednotek a dále z podjednotek  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  nebo  $\epsilon$  [32].



Obrázek 7: Schéma zdravé nervosvalové ploténky v porovnání s myasthenií gravis (7)

Zmiňované protilátky se pak váží na AChR, kde přibližně polovina blokuje  $\alpha$  jednotku (tyto protilátky jsou více patogenní než ty, které jsou mířené proti  $\beta$ ) nebo receptor přímo ničí (kvůli membránolytickému komplexu zformovaném po aktivaci komplementové kaskády) případně narušují shlukování acetylcholinu v postsynaptické membráně (viz Obrázek 7 výše) [32].

### **Myasthenia gravis s výskytem protilátek proti svalově specifické tyrozin kináze (MuSK-MG)**

Jak bylo zmíněno výše, tento membránový protein je důležitý pro shlukování AChR v nervosvalové ploténce. Agrin, uvolněný z presynaptického zakončení, reaguje s LRP4, což vede k aktivaci MuSK, ta následně způsobí shlukování acetylcholinových receptorů [32].

IgG4 se naváží na MuSK, čímž blokuje, narušují předem popsany systém. To vede k nižší koncentraci AChR v postsynaptické membráně a zabraňuje přenosu aktivačního signálu na svalovou buňku [32].

### **Myasthenia gravis s výskytem protilátek proti lipoprotein-related proteinu 4 (LRP4-MG)**

Funkce LRP4 spočívá v navázání agrinu, který reguluje formaci a regeneraci nervosvalové ploténky, tím dochází k aktivaci MuSK (viz výše) [32,33].

Jakmile je pacient séronegativní na AChR-MG, zároveň MuSK-MG, obvykle má přítomné autoprotiátky právě proti tomuto proteinu. Mnoho nemocných zároveň vykazuje přítomnost autoprotiátek na agrin [32].

## **2.5.1 Patogeneze**

Popisovaná nemoc bývá zprostředkována hlavně B lymfocyty, to především tranzientními a naivními buňkami, které obsahují autoreaktivní BCR. Jejich počet je v případě AChR-MG i MuSK-MG značně zvýšen. Z tohoto poznání můžeme odvodit, že pacienti s MG disponují chybnou centrální i periferní tolerancí, čímž se stávají více náchylní k rozvoji dalších autoimunitních chorob, jako je revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus. Abnormality a deformace v repertoáru B lymfocytů poukazují na klíčovou roli těchto buněk v patogenezi MG [32,33].

T lymfocyty také hrají důležitou roli především v produkci cytokinů, jež mají vliv na vývoj onemocnění. Je znám vliv CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, ovšem konkrétní mechanismy, jakými se podílejí na manifestaci, nejsou stále plně popsány. Současné výzkumy odhalují význam autoreaktivních Th1 a Th2, které produkují IL-4. Ten je zodpovědný za aktivaci B lymfocytů, proto se předpokládá, že humorální odpověď Th2 má přímý vliv v patogenezi nemoci. Th1 jsou také známy pro svůj podíl na vývoji MG, jelikož sekrece IFN- $\gamma$  je u postižených zvýšena. Zatím ovšem není jasné, jaký dopad má výskyt tohoto produktu na produkci autoprotiátek. Th17 také pravděpodobně ovlivňují vývoj MG. Jak bylo popsáno v předešlých kapitolách, cytokiny těchto buněk mají silně prozánětlivé účinky. Produkce IL-17 nepřímo podporuje tvorbu Ig a udržuje rovnováhu v působení cytokinů secernovaných Th1 i Th2. Podle několika studií můžeme pozorovat zvýšený výskyt Th17 s IL-17, tato skutečnost souvisí se závažností choroby, jelikož zmíněný poznatek lze pozorovat u pacientů s myasthenickou krizí (společně se zvýšeným výskytem produktů Th2) [32].

Myasthenickou krizí rozumíme život ohrožující zhoršení celkových příznaků MG. Konkrétně se dostaví zvýšení svalové slabosti, to může vést k selhání respiračního svalstva a bez okamžité intubace i ke smrti [39].

Další zajímavý jev je nerovnost v počtu autoreaktivních T a B lymfocytů vůči buňkám, které je potlačují (Treg, Breg). Treg produkují protizánětlivé cytokiny IL-10 společně s TGF- $\beta$ . Největší dysbalance byla popsána v souvislosti s Th17 imunitní odpovědí. Bereme-li v potaz

Breg, zde je opět klíčová produkce IL-10, ovšem pro absenci unikátního transkripčního faktoru se vědci stále nedokázali shodnout. Lze ale říci, že u pacientů s MG je snížen počet subtypů  $CD19^+CD1d^{hi}CD5^+$  a  $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$  včetně B buněk produkujících IL-10 pro každou z těchto podjednotek [32].

V séru nemocných je dále možné nalézt zvýšený výskyt cytokinu BAFF, který je důležitý pro přežití B lymfocytů, jejich vývoj v plazmablasty a plazmatické buňky [32].

### **2.5.2 Role thymu v myasthenii gravis**

Thymus je v tomto onemocnění klíčový, jelikož u 10 - 15% pacientů s diagnostikovanou myasthenií gravis se rozvine i thymom a u 70% je patrná hyperplazie thymu. Naopak až u 30% všech postižených thymomem hrozí vývoj MG. Je tomu tak pravděpodobně proto, že nádory brzlíku mají podobnou morfológickou strukturu jako thymový cortex a medulla, proto umožňují vývoj T lymfocytů obdobně, jako je popsáno v předešlých kapitolách (viz Hlavní složky imunitního systému - Thymus na straně 12, Nespecifická (neadaptivní) imunita - T lymfocyty na straně 19). Pokud novotvar nedisponuje funkcí vývoje T lymfocytů, MG není vyvolána. Vliv hormonů, jako je estrogen, pak mohou vysvětlit zvýšený výskyt MG u žen obdobně jako u jiných systémových autoimunitních onemocnění [6,32,33].

Jelikož thymom či hyperplazie thymu nemají příznivý vliv na vývoj T lymfocytů, jak bylo zmíněno výše, vedou ke vzniku autoreaktivních  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T buněk. Navíc se předpokládá, že stěžejní úlohu v tomto procesu má narušená funkce transkripčního faktoru AIRE v průběhu negativní selekce. Tyto lymfocyty vedou k dysbalanci cytokinů ovlivňujících regulaci B lymfocytů, které se potom diferencují v autoreaktivní formy. Proto je častou snahou brzlík chirurgicky odstranit [32].

### **2.5.3 Epidemiologie**

Z epidemiologického hlediska je MG poněkud vzácná. Lze zároveň pozorovat určité geografické nerovnosti v počtu postižených. Evropská prevalence nemoci se pohybuje v rozmezí od 4 do 30 případů na milion obyvatel ročně, v Severní Americe s Japonskem je rozmezí výrazně nižší - 3 až 9 postižených na milion obyvatel za rok, kdežto v Číně výzkumy ukázaly prevalenci MG nejnižší, dosahuje hodnot 0.155 - 0.366 na milion obyvatel každý rok. Celosvětově lze za posledních několik dekád vidět celkový nárůst těchto čísel, a to z jisté části díky značným pokrokům v diagnostice [32].

U žen se MG vyskytuje častěji, nejvíce však kolem třicátého a padesátého roku života. Muži bývají nejvíce diagnostikováni mezi 60 až 89 lety, kdy prevalence s přibývajícím věkem roste. U dětí bývá tato choroba velmi vzácná, z celkových případů tvoří zhruba 10%. Zajímavé je, že ženy jsou vůči mužům častěji diagnostikovány s MG před 40. rokem života v poměru 3:1, v 50 letech je prevalence vyrovnaná a po tomto milníku je výskyt u žen snížen a dokonce obrácen na poměr 2:3 [32].

Z hlediska mortality lze registrovat značné zlepšení s objevem inhibitoru acetylcholinesterázy, imunosupresiv a vývojem intenzivní péče. Úmrtí se proto pohybují okolo 5 - 9% s lehce vyšším rizikem u mužů [32].

#### **2.5.4 Klinický obraz**

Tato porucha je typická nadměrnou svalovou únavou zhoršující se při opakovaných pohybech, která po odpočinku bývá přechodně zlepšena, proto pacient často popisuje, že se ráno cítí lépe, večer hůře. Nejčastěji lze pozorovat asymetrické postižení okohybných, plentencových, bulbárních i respiračních svalů, diplopie, dysartrie, dysfagie [6,18].

Ohrožení života přichází při projevení tzv. myasthenické krize, při které dochází ke zhoršení příznaků, především respiračního a bulbárního svalstva. Možným diagnostickým testem je Seemanův test, kdy nemocný nahlas na jeden nádech počítá, hlas mu postupně slábne, řeč je méně zřetelná, srozumitelná. Pacient by měl takto napočítat alespoň do 20. Dalším závažným stavem může být cholinergní krize, která se dostaví při předávkování anticholinergiky. Projeví se sliněním, křečemi v břiše a průjmy [6].

V laboratorní diagnostice hrají hlavní úlohu sérologické testy, ty mohou odhalit jednotlivé podtypy MG. Další významnou metodu představují farmakologické zkoušky, kde se nejčastěji uplatňuje intravenózní aplikace inhibitoru acetylcholinesterázy (endorfin chlorid), to umožní vyšší koncentraci acetylcholinu, čímž dojde ke zvýšení šance na lepší aktivaci zbylých acetylcholinových receptorů. Do několika sekund se dostaví značné zlepšení především u okohybných svalů. Je důležité poznamenat, že podání tohoto inhibitoru není doporučeno při podezření na MuSK-MG, poněvadž tato látka může zhoršit příznaky postiženého. Jako alternativa se v tomto případě dá využít intramuskulární aplikace neostigminu, jež má dlouhodobější účinky. Ke zlepšení obvykle dojde do několika minut [34].

#### **2.5.5 Léčba**

Prvním krokem v léčebných strategiích jsou často inhibitory acetylcholinesterázy (v případě MuSK-MG spočívá léčba především v imunosupresivech), nejčastěji jde o orální užívání pyridostigminu. Pokud nedojde ke zlepšení příznaků, nastupuje imunosupresivní léčba, konkrétně najde využití například kortikosteroid prednison, případně monoklonální protilátky rituximab, eculizumab nebo inhibitor lymfocytární chemotaxe - efgartigimod. V případě myasthenické krize se přechází k aplikaci intravenózních Ig nebo k plazmaferéze. V indikovaných případech lze provést thymektomii, ta má prokazatelně příznivé účinky na vývoj MG a může odhalit asociované nádorové onemocnění - thymom [23,35].

### 3 Cíle práce

Má SOČ si klade za cíl pokusit se blíže objasnit a pochopit roli případně chování dosud ne příliš probádané populace CD21<sup>low</sup> B lymfocytů v patologiích thymu.

Pro potřeby této práce byly konkrétně stanoveny následující cíle:

- stanovení subpopulací B lymfocytů s důrazem na populaci CD21<sup>low</sup> a její další podkategorie u pacientů, kteří byli diagnostikováni myasthenií gravis, různými druhy patologií brzlíku nebo obojím
- analyzovat bazální stav aktivace B lymfocytů a subpopulací CD21<sup>low</sup> za pomoci exprese markerů CD80/86, HLA-DR či CD40
- detekovat schopnost migrace jednotlivých subpopulací CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pomocí stanovení chemokinových receptorů CXCR3 a CCR7

## 4 Praktická část

### 4.1 Metodika

#### 4.1.1 Laboratorní zpracování

Vzorky brzlíků od pacientů diagnostikovaných MG / MG s thymomem či jinými patologiemi (hyperplazie, cysty) byly zpracovány v laminárním boxu. Tkáň byla nejprve rozstříhána na kousky o maximální velikosti 5 mm. Vzorky pak byly pipetou přeneseny do zkumavek (gentleMACS™ C Tubes, Miltenyi Biotec, USA) obsahujících 4,945 ml média (RPMI Medium 1640 1x, Gibco, Thermo Fischer Scientific, USA), DNAsu I (Merck Life Science, CZ) a Collagenasu A (Merck Life Science, CZ) o finálních koncentracích 0,05 mg/ml, respektive 1 mg/ml. Následně proběhla disociace vzorků (gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, USA) po dobu 30 s (program h\_tumor\_01) a jejich uložení na 30 min při teplotě 37 °C v CO2 inkubátoru. Po uplynutí doby došlo k další disociaci vzorků, která znovu trvala 30 s (program h\_tumor\_01), dále následovala filtrace přes sterilní sítko (Corning® 40µm Cell Strainer, USA). Izolované buňky byly následně propláchnuty PBS a zmrazeny nejprve při -80 °C a poté v tekutém dusíku.

Detekce jednotlivých buněčných populací zastoupených v thymech pacientů byla provedena pomocí průtokové cytometrie. Rozmražené vzorky byly po propláchnutí PBS barveny protilátkami detekující extracelulární znaky. Pro rozpoznání základní B buněčné lymfocytární populace byly využity následující protilátky konjugované s níže uvedenými fluorochromy (viz Tabulka 1).

| Cíl protilátky | Fluorochrom   | Výrobce       | Množství protilátky (µl)/vzorek |
|----------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| CD19           | PC7           | Exbio, CZ     | 1                               |
| CD21           | APC           | Exbio, CZ     | 1,5                             |
| IgM            | FITC          | BioLegend, UK | 1                               |
| IgD            | PerP.Cyan 5.5 | BioLegend, UK | 1,5                             |
| CD27           | BV421         | BioLegend, UK | 1                               |
| CD24           | PE            | Exbio, CZ     | 1,5                             |
| CD38           | AF700         | Exbio, CZ     | 1                               |

Tabulka 1: Vyobrazení použitých protilátek konjugovaných s fluorochromy k detekci B buněčné linie

Naopak k detekci chemokinových receptorů a aktivačních znaků byla využita následující kombinace protilátek. Pro oba typy byl využit stejný základ (viz Tabulka 2), kombinovaný s protilátkami rozpoznávající aktivační znaky (CD40, HLA-DR, CD80/86) či chemokinovými receptory (CXCR3, CCR7).

| Cíl protilátky               | Fluorochrom   | Výrobce       | Množství protilátky (μl)/vzorek |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| CD19                         | PC7           | Exbio, CZ     | 1                               |
| CD21                         | APC           | Exbio, CZ     | 2                               |
| CD38                         | AF700         | Exbio, CZ     | 2                               |
| CD27                         | PE-Dy 594     | Exbio, CZ     | 1                               |
| IgD                          | BV650         | BioLegend, UK | 1                               |
| Životnost                    | BV421         | BioLegend, UK | 1                               |
| <b>aktivační znaky</b>       |               |               |                                 |
| HLA-DR                       | FITC          | Exbio, CZ     | 1                               |
| CD80/86                      | PerP.Cyan 5.5 | BioLegend, UK | 1                               |
| CD40                         | PE            | Exbio, CZ     | 2                               |
| <b>chemokinové receptory</b> |               |               |                                 |
| CCR7                         | FITC          | BioLegend, UK | 1                               |
| CXCR3                        | PE            | BioLegend, UK | 1                               |

Tabulka 2: Vyobrazení použitých protilátek konjugovaných s fluorochromy k detekci chemokinových receptorů a aktivačních znaků

Každý vzorek byl barven ve FACS zkumavce směsí protilátek doplněný na výsledný objem 50 μl PBS po dobu 30 min ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo promytí vzorku 250 μl PBS. Měření ve výsledném objemu 200 μl PBS probíhalo na průtokovém cytometru (LSR Fortessa, BD, USA).

Analýza získaných výsledků proběhla pomocí softwaru FlowJo (verze 6, BD, USA) a grafické zpracování využitím programu GraphPad Prism (verze 8, BD, USA).

#### 4.1.2 Statistické zpracování

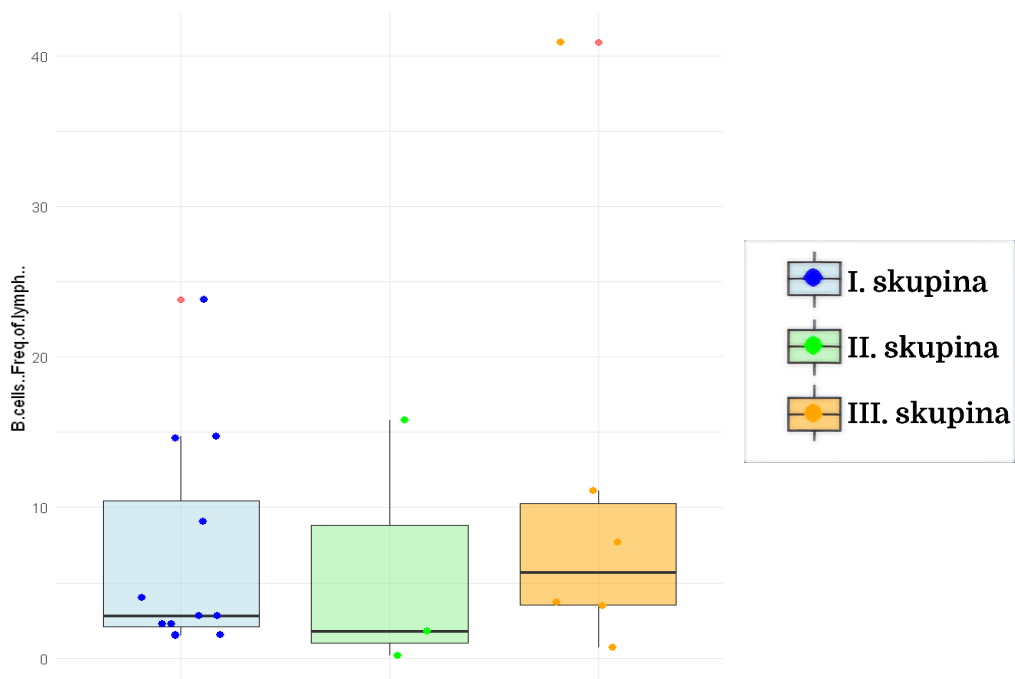
Statistická analýza byla provedena použitím Wilcoxonova testu, který byl aplikován na rozdíly mezi určitými skupinami pacientů (viz dále). K provedení těchto úkonů a grafickému vyobrazení statistického rozboru byl využit software Jupyter notebook v programovacím jazyce R.

## 5 Výsledky

K dispozici byly tkáně thymu celkem od 21 pacientů, kteří podstoupili thymektomii na III. chirurgické klinice 1. LF UK a Fakultní nemocnice Motol. Proběhlo rozdělení vzorků do tří skupin dle histologického vyšetření brzlíku, a to na skupinu I obsahující pacienty s MG (n=12; průměrný věk  $31,1 \pm 12,0$ ; v poměru 3:1 žen a mužů), skupinu II čítající pacienty s MG a thymomem (n=3; průměrný věk  $57,0 \pm 11,5$ ; v poměru 3:0 žen a mužů) a skupinu III zahrnující nemocné s jinou patologií thymu bez MG, nejčastěji se jednalo o thymické cysty, či hyperplazie thymu (n=6; průměrný věk  $49,0 \pm 4,6$ ; v poměru 1:2 žen a mužů).

Za použití Wilcoxonova testu byla provedena statistická analýza pro rozdíly mezi skupinami I a III. Ve II. skupině nebyl test aplikován z důvodu nízkého počtu dat. Poněvadž množství hodnot nebylo zcela ideální ani v ostatních skupinách, rozhodl jsem se jako statisticky signifikantní akceptovat výsledky na nestandardně vysoké hladině signifikance  $p \leq 0,15$ .

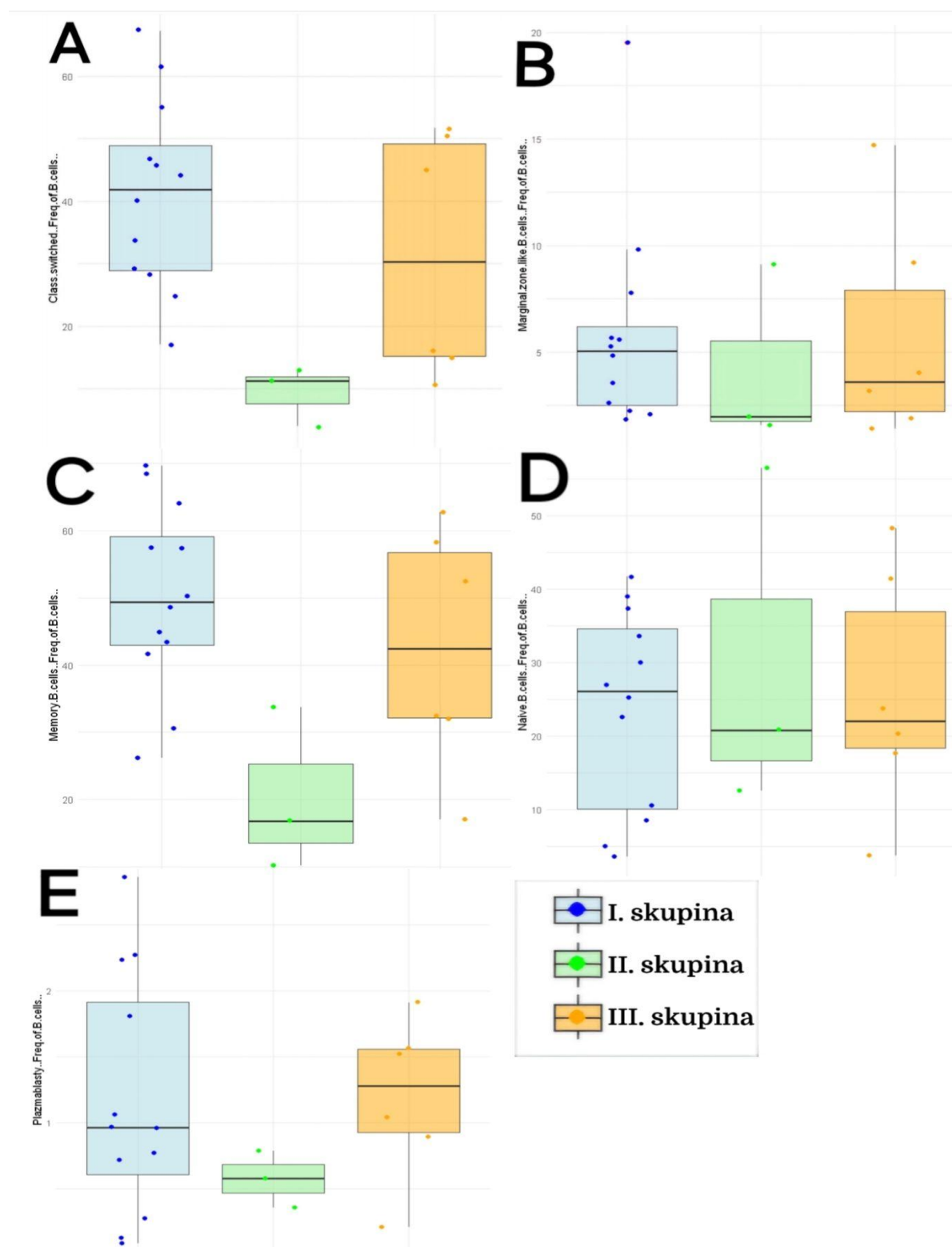
Nejprve proběhlo enzymatické štěpení vzorků brzlíku, následně došlo k izolaci lymfocytů, jejichž populace byly dále analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Jako první došlo ke stanovení procentuální hladiny izolovaných tkáňových B lymfocytů (CD19+) z celkového počtu buněk pro všechny tři skupiny pacientů. V rámci I. skupiny pacientů byly B lymfocyty v thymech zastoupeny  $6,73 \pm 6,97$  % (pro všechny následující hodnoty v této kapitole je použit formát “průměr dat ve skupině”  $\pm$  “směrodatná odchylka”), ve II. skupině  $5,92 \pm 7,02$  % a ve skupině III  $11,25 \pm 13,67$  %. V procentuálním zastoupení B lymfocytů mezi I. a III. skupinou nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ( $p=0,27$ ). Grafické znázornění je na Obrázku 8 níže.



Obrázek 8: Grafické znázornění procentuálního zastoupení B lymfocytů pro skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

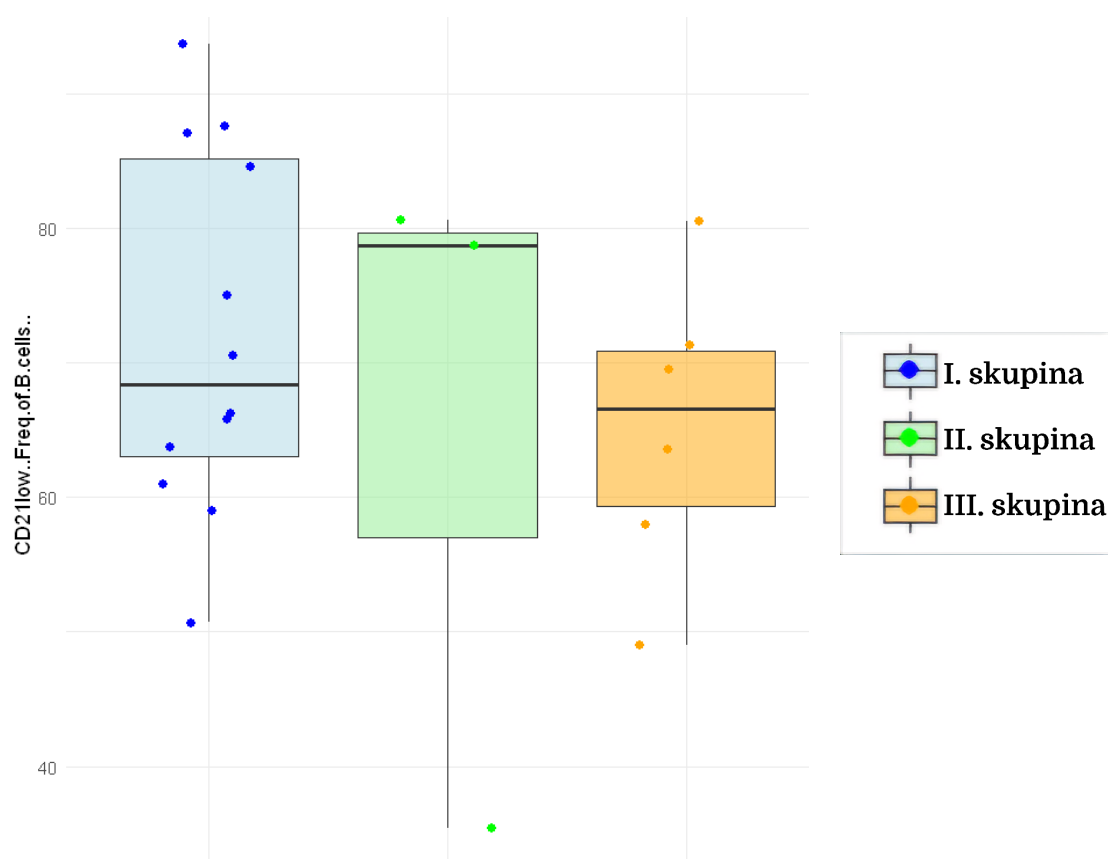
## 5.1 Výsledky měření jednotlivých B lymfocytárních populací

Dále byly buňky rozděleny na základní B lymfocytární populace dle exprese jednotlivých znaků (CD19, CD27, CD38, IgM, IgD) na svém povrchu. Procentuální zastoupení jednotlivých populací ve skupinách I až III bylo: paměťové B lymfocyty (CD19+CD27+; I:  $50,22 \pm 13,30$  %; II:  $20,23 \pm 9,90$  %; III:  $42,45 \pm 16,41$  %), naivní B lymfocyty (CD19+IgD+CD27-; I:  $23,69 \pm 13,65$  %; II:  $29,97 \pm 19,10$  %; III:  $25,88 \pm 14,91$  %), B lymfocyty po izotypovém přesmyku (CD19+CD27+IgD-IgM-; I:  $41,10 \pm 14,66$  %; II:  $9,25 \pm 3,80$  %; III:  $31,35 \pm 17,87$  %), B lymfocyty marginální zóny (CD19+CD27+IgD+IgM+; I:  $5,89 \pm 4,71$  %; II:  $4,21 \pm 3,46$  %; III:  $5,74 \pm 4,75$  %), plazmablasty (CD19+CD27+IgD-IgM-CD38+; I:  $1,18 \pm 0,87$  %; II:  $0,58 \pm 0,18$  %; III:  $1,19 \pm 0,55$  %). Pozorujeme významně snížené hladiny paměťových B lymfocytů a B lymfocytů po izotypovém přesmyku u pacientů skupiny II v porovnání s jedinci skupiny I a III. Nebyly zjištěny žádné statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinou I a III (B lymfocyty po izotypovém přesmyku (CD19+CD27+IgD-IgM-) -  $p=0,17$ ; B lymfocyty marginální zóny (CD19+CD27+IgD+IgM+) -  $p=0,34$ ; paměťové (CD19+CD27+) B lymfocyty -  $p=0,28$ ; naivní (CD19+IgD+CD27-) B lymfocyty -  $p=0,48$ ; plazmablasty (CD19+CD27+IgD-IgM-CD38+) -  $p=0,41$ ). Znázornění všech hodnot pro jednotlivé skupiny a thymické B lymfocytární populace je vyobrazeno na Obrázku 9 níže.



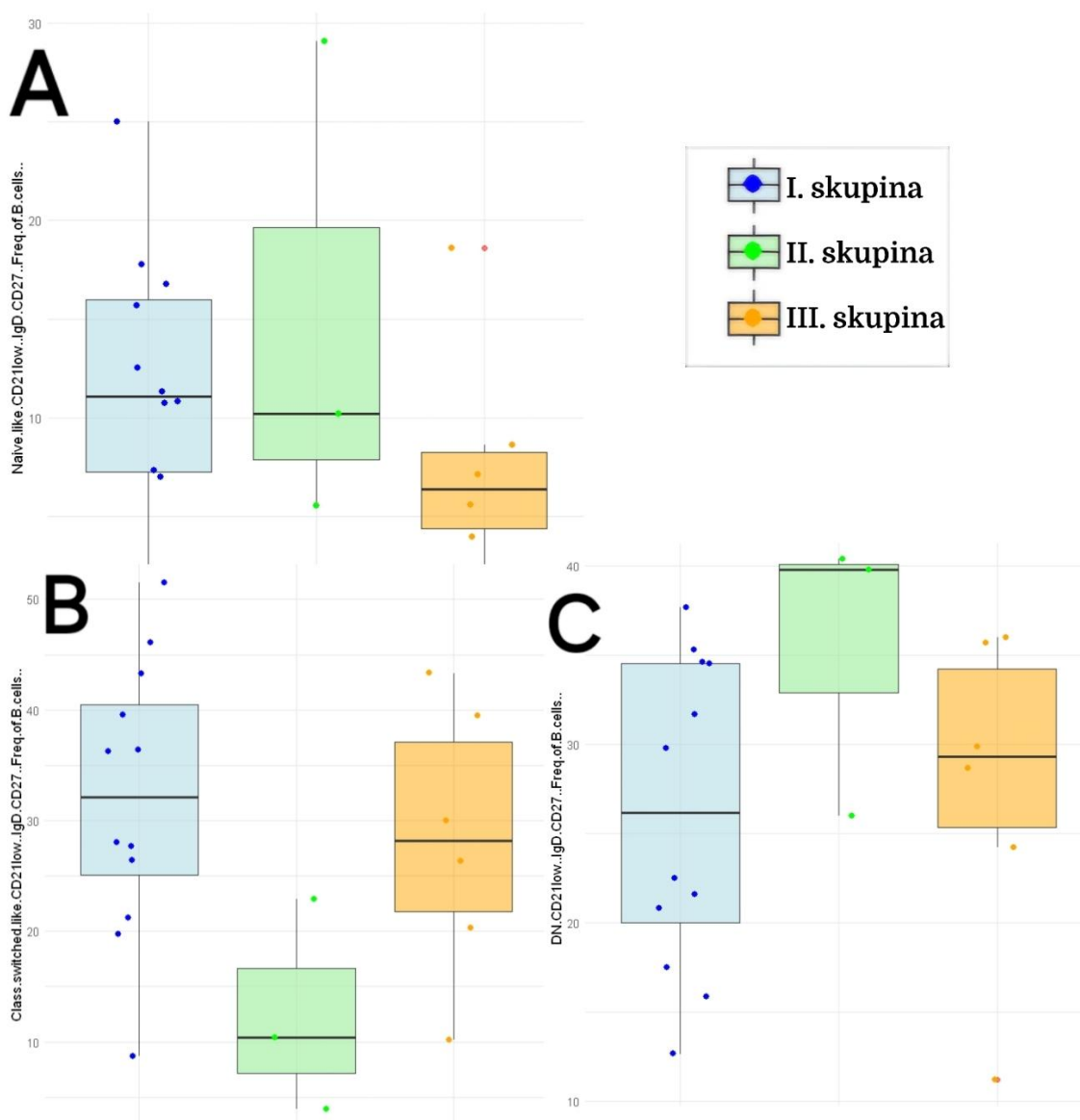
Obrázek 9: Grafické znázornění počtu buněk v jednotlivých základních subpopulacích B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: B lymfocyty po izotypovém přesmyku (CD19+CD27+IgD-IgM-), B: B lymfocyty marginální zóny (CD19+CD27+IgD+IgM+), C: paměťové (CD19+CD27+) B lymfocyty, D: naivní (CD19+IgD+CD27-) B lymfocyty, E: plazmablasty (CD19+CD27+IgD-IgM-CD38+).

Dalším postupem bylo určení množství zastoupení  $CD21^{low}$  B lymfocytů ( $CD19+CD21^{low}CD38^{low}$ ) napříč skupinami. Výpočet pro první skupinu odhalil relativní počet  $72,08 \pm 12,89 \%$ , hodnoty v druhé skupině byly naměřeny  $64,9 \pm 20,87 \%$  a ve třetí skupině  $65,3 \pm 10,07 \%$  - viz Obrázek 10 níže. Statisticky signifikantní rozdíl mezi kategorií I a III zde nepozorujeme ( $p=0,17$ ).



Obrázek 10: Grafické znázornění procentuálního zastoupení  $CD21^{low}$  B lymfocytů pro skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG).

Obdobně došlo k následnému rozdělení  $CD21^{low}$  B buněk na jejich subpopulace a určení procentuálního zastoupení pro všechny kategorie pacientů - naivní  $CD21^{low}$  ( $CD19+CD21^{low}CD38^{low}IgD+CD27^-$ ; I:  $11,58 \pm 6,37 \%$ ; II:  $14,94 \pm 10,20 \%$ ; III:  $7,47 \pm 5,54 \%$ ),  $CD21^{low}$  po izotypovém přesmyku ( $CD19+CD21^{low}CD38^{low}IgD-CD27^+$ ; I:  $32,58 \pm 77,82 \%$ ; II:  $12,41 \pm 7,87 \%$ ; III:  $28,27 \pm 11,17 \%$ ) a DN  $CD21^{low}$  ( $CD19+CD21^{low}CD38^{low}IgD-CD27^-$ ; I:  $26,21 \pm 8,31 \%$ ; II:  $35,4 \pm 6,65 \%$ ; III:  $27,62 \pm 8,4 \%$ ). Lze si všimnout mírně zvýšeného počtu DN  $CD21^{low}$  u skupiny II narozdíl od I a III. Dále je patrné nižší zastoupení  $CD21^{low}$  po izotypovém přesmyku také u II. skupiny. Co se týče statistického hodnocení, signifikantní rozdíl mezi I. a III. kategorií byl v počtu naivních  $CD21^{low}$  B lymfocytů ( $p=0,11$ ). Pro zbytek buněk je odchylka nesignifikantní ( $CD21^{low}$  po izotypovém přesmyku ( $IgD-CD27^+$ ) -  $p=0,3$ ; DN  $CD21^{low}$  ( $IgD-CD27^-$ ) -  $p=0,34$ ). Grafické vyobrazení je znázorněno na Obrázku 11 níže.

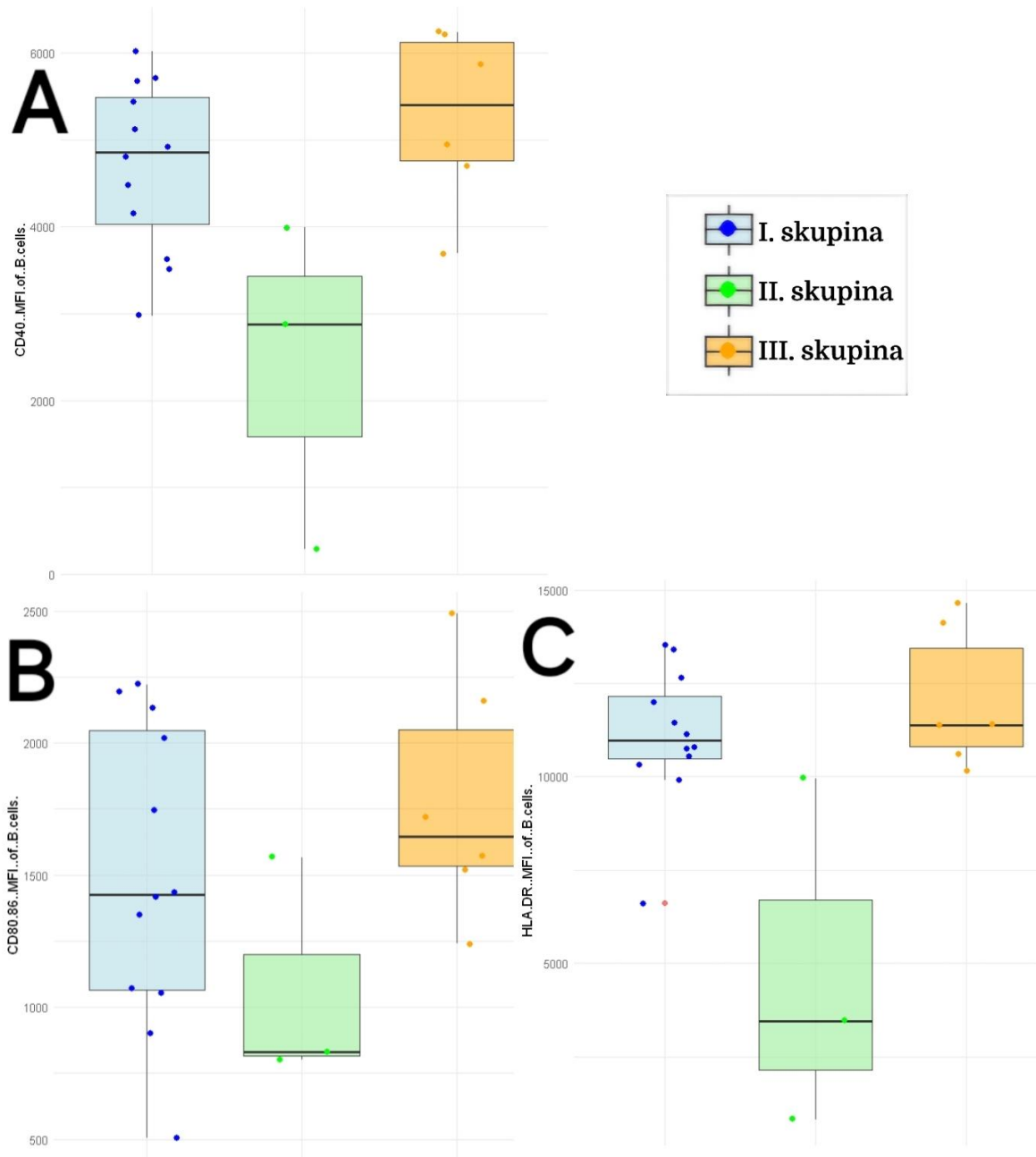


Obrázek 11: Grafické znázornění počtu buněk v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: naivní CD21<sup>low</sup> (IgD+CD27-), B: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (IgD-CD27+), C: DN CD21<sup>low</sup> (IgD-CD27-). Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 5.2 Výsledky pro aktivační markery B lymfocytů

Dalším zaměřením byla míra exprese všech aktivačních markerů (CD40, CD80/86 včetně HLA-DR) na povrchu B lymfocytů jako celku u všech skupin vzorků v jednotkách MFI (střední hodnota intenzity fluorescence, z angl. mean fluorescence intensity) - CD40 (I: 4703,83 ± 927,2 MFI; II: 2387 ± 1548,95 MFI; III: 5275,5 ± 921,72 MFI), CD80/86 (I: 1503,67 ± 539,78 MFI; II: 1066,33 ± 354,27 MFI; III: 1783,5 ± 418,8 MFI), HLA-DR (I: 11081,25 ± 1759,94 MFI; II: 4744 ± 3836,75 MFI; III: 12046 ± 1722,16 MFI). Lze si

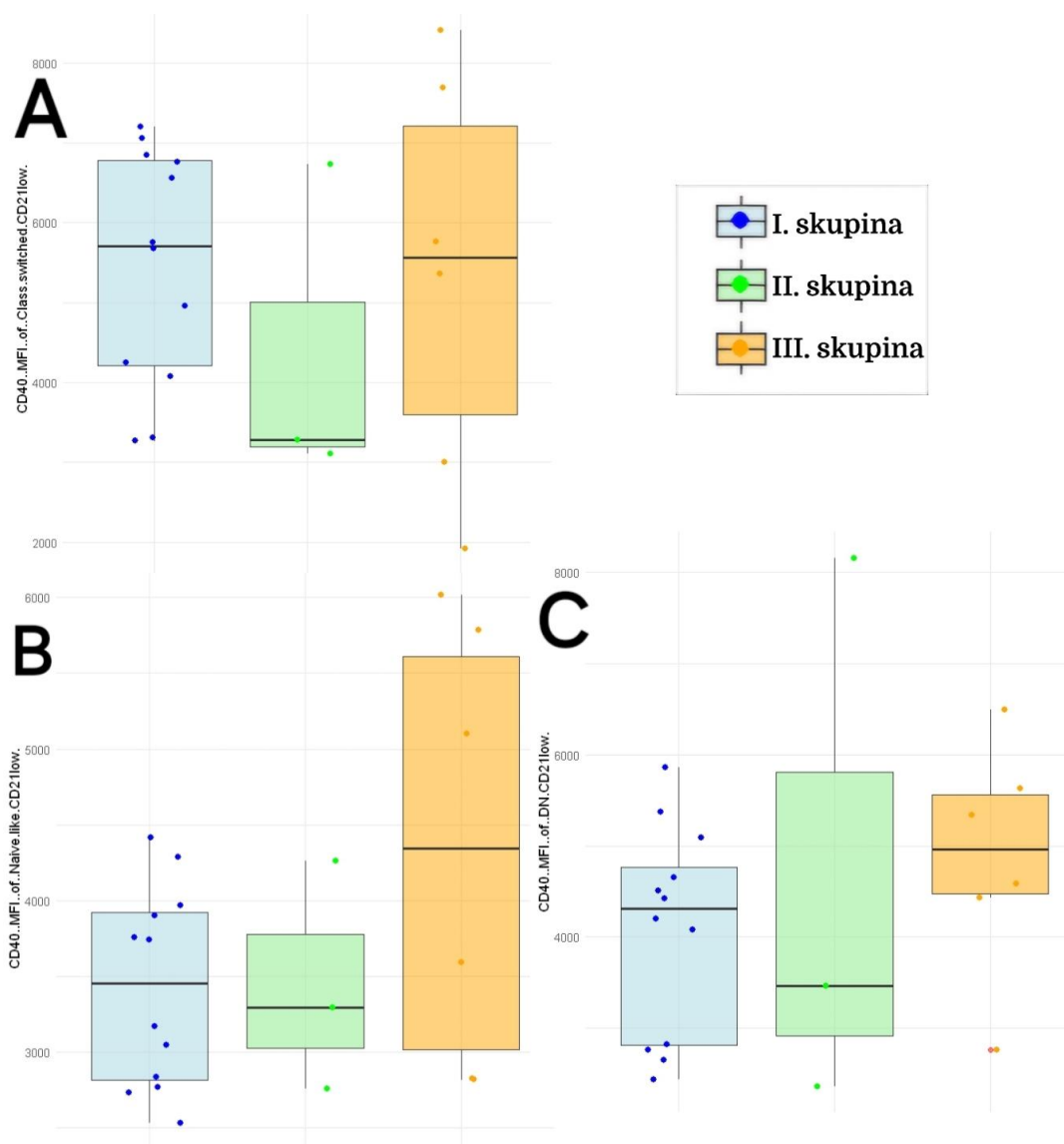
všimnout značně snížených hodnot exprese u všech měřených aktivačních markerů, tedy CD40, CD80/86 i HLA-DR. Statisticky signifikantní rozdíl mezi I. a III. skupinou byl identifikován pouze u CD40 ( $p=0,11$ ). Pro zbylé markery je odchylka statisticky nesignifikantní (CD80/86 -  $p=0,17$ ; HLA-DR -  $p=0,24$ ). Grafické znázornění, které popisuje rozdíly všech měřených kategorií jsou k nalezení níže na Obrázku 12.



Obrázek 12: Grafické znázornění hodnot aktivačních markerů CD40, CD80/86 a HLA-DR (MFI) u populace B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD40, B: CD80/86, C: HLA-DR. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

### 5.3 Výsledky pro aktivační markery CD21<sup>low</sup> - CD40

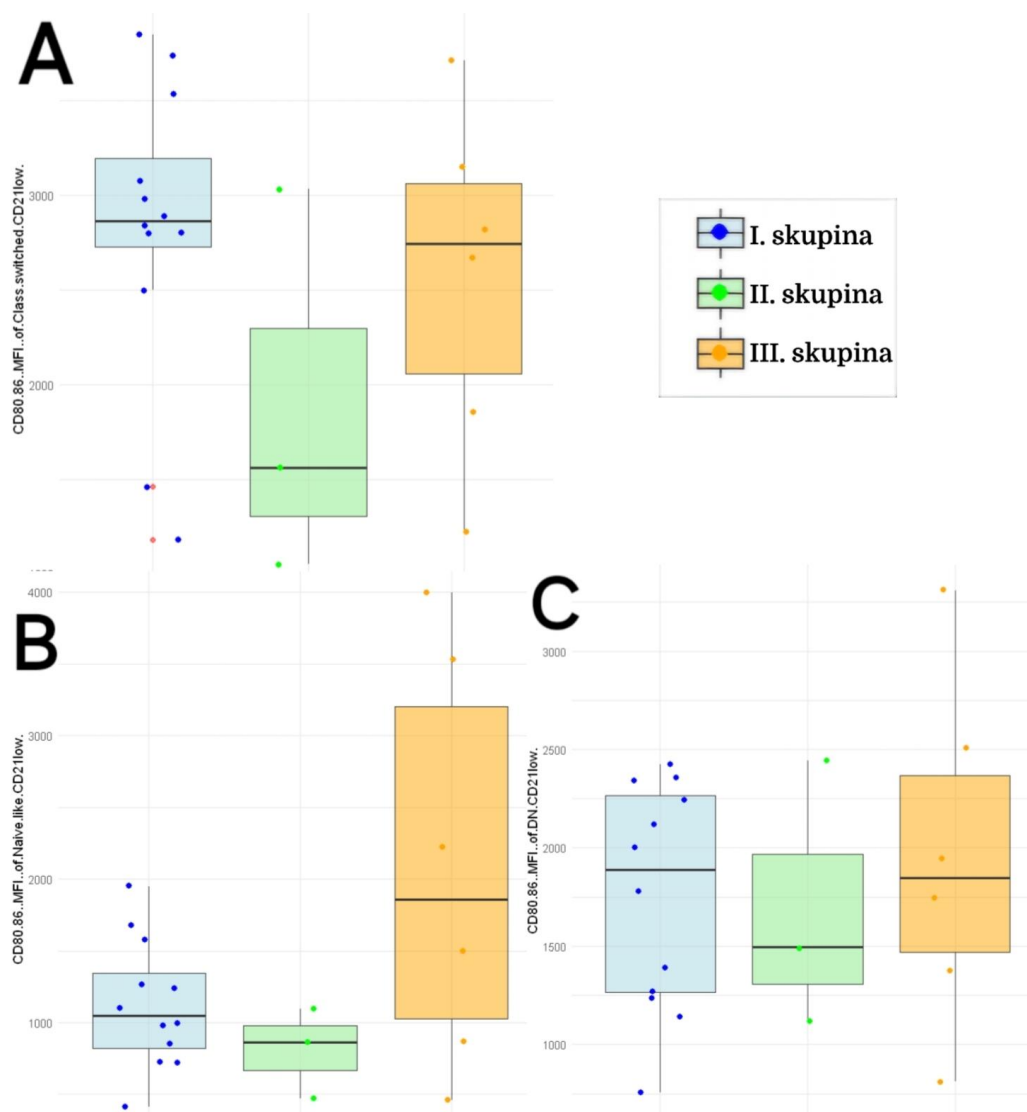
Dalším cílem bylo měření exprese aktivačních markerů na buněčném povrchu CD21<sup>low</sup> B buněk pro všechny skupiny pacientů, nejprve CD40 - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (I: 5476,67 ± 1400,48 MFI; II: 4374,67 ± 1669,05 MFI; III: 5358,83 ± 2317,85 MFI), naivní CD21<sup>low</sup> (I: 3429,42 ± 626,68 MFI; II: 3438 ± 622,1 MFI; III: 4355,5 ± 1331,98 MFI) a DN CD21<sup>low</sup> (I: 4072,58 ± 1101,67 MFI; II: 4662,33 ± 2514,18 MFI; III: 4876 ± 1165,25 MFI). Pozorujeme mírně sníženou expresi CD40 u CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku ve skupině II. Statisticky signifikantní se jeví rozdíl I. a III. skupiny u naivních CD21<sup>low</sup> ( $p=0,15$ ) a DN CD21<sup>low</sup> ( $p=0,11$ ). Pro CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku je statistická odchylka nesignifikantní ( $p=0,52$ ). Grafické znázornění je viditelné na Obrázku 13 níže.



Obrázek 13: Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru CD40 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 5.4 Výsledky pro aktivační markery CD21<sup>low</sup> - CD80/86

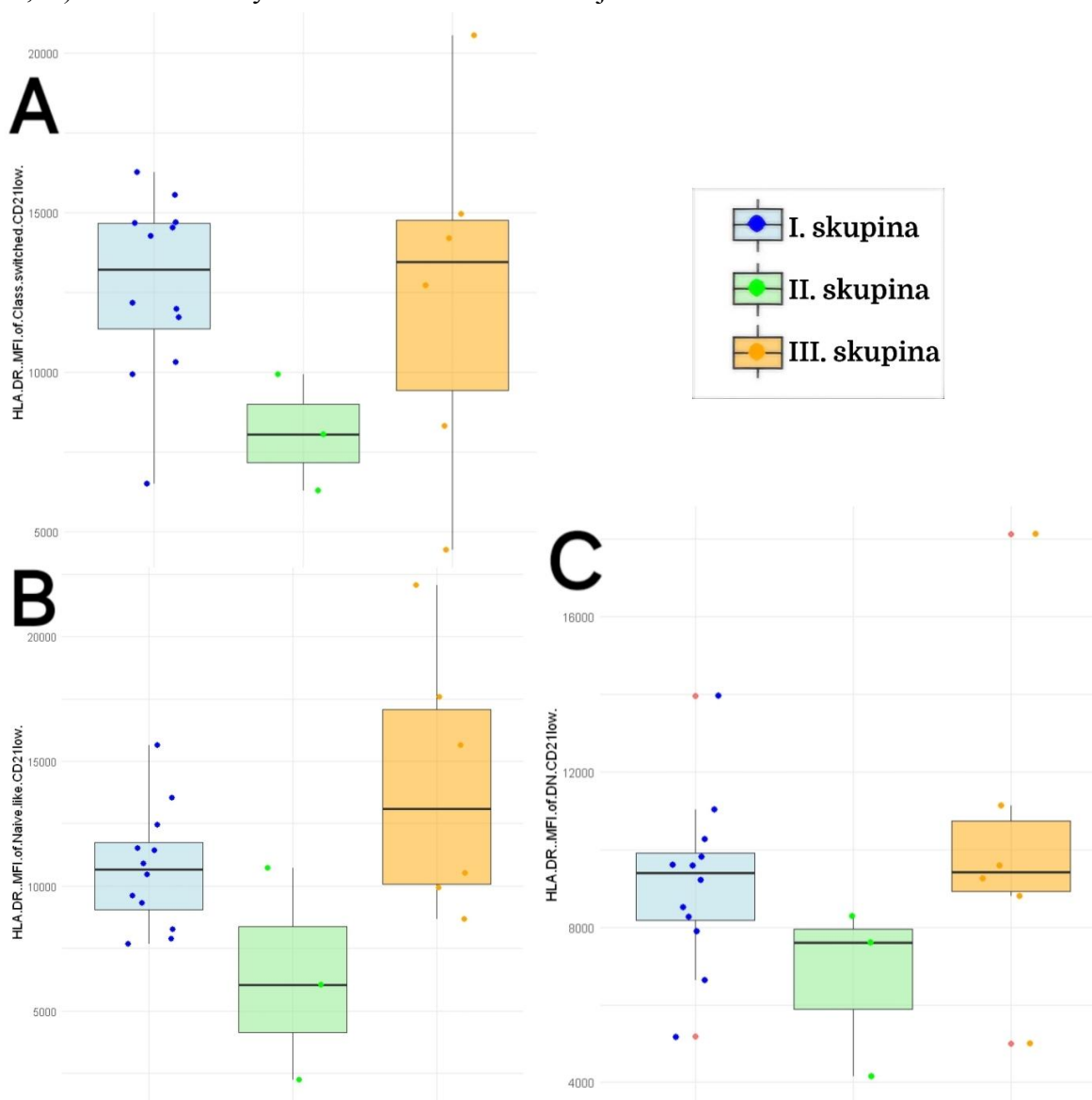
Postup byl obdobný i pro stanovení exprese aktivačního (kostimulačního) markeru CD80/86 u CD21<sup>low</sup> B buněk - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (I:  $2804,67 \pm 771,55$  MFI; II:  $1881,33 \pm 841,82$  MFI; III:  $2569,17 \pm 821,87$  MFI), naivní CD21<sup>low</sup> (I:  $1123,5 \pm 425,46$  MFI; II:  $808,33 \pm 258,77$  MFI; III:  $2095,5 \pm 1306,06$  MFI) a DN CD21<sup>low</sup> (I:  $1755,17 \pm 546,42$  MFI; II:  $1686 \pm 558,1$  MFI; III:  $1949,67 \pm 797,73$  MFI). Ve skupině II pozorujeme mírně snížené hodnoty u CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku a v kategorii III je vidět zvýšená přítomnost markeru u naivních CD21<sup>low</sup>, ovšem za zvýšené směrodatné odchylky. Míra statistické signifikance rozdílu mezi I. a III. skupinou dosahuje významných hodnot pouze u naivních CD21<sup>low</sup> ( $p=0,11$ ). Pro CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku je odlišnost mezi skupinami nesignifikantní ( $p=0,30$ ), stejně tak pro DN CD21<sup>low</sup> ( $p=0,38$ ). Hodnoty CD80/86 v jednotlivých kategoriích jsou graficky znázorněny na Obrázku 14 níže.



Obrázek 14: Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru CD80/86 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 5.5 Výsledky pro aktivační markery CD21<sup>low</sup> - HLA-DR

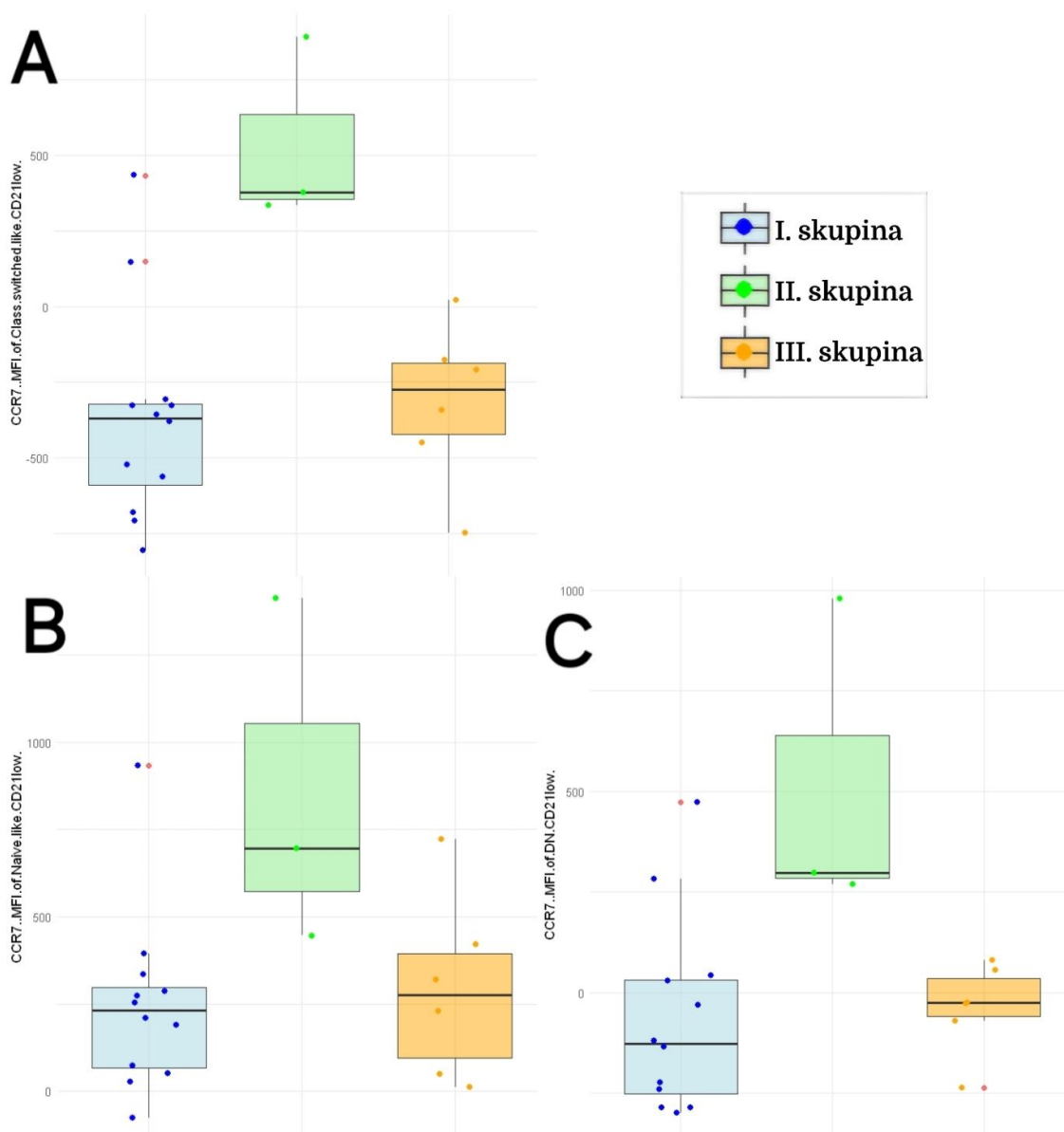
Další zaměření bylo na aktivační marker HLA-DR u CD21<sup>low</sup> B buněk pro všechny skupiny - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (I: 12709,83 ± 2710,08 MFI; II: 8084,33 ± 1495,69 MFI; III: 12525,67 ± 5112,49 MFI), naivní CD21<sup>low</sup> (I: 10728,25 ± 2286,11 MFI; II: 6339 ± 3470,01 MFI; III: 14073,5 ± 4780,83 MFI) a DN CD21<sup>low</sup> (I: 9160,25 ± 2114,83 MFI; II: 6682,67 ± 1808,33 MFI; III: 10316,83 ± 3960,55 MFI). U skupiny II lze rozlišit nižší hodnoty exprese HLA-DR pro všechny subpopulace CD21<sup>low</sup>. Statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami I a III pozorujeme u naivních CD21<sup>low</sup> (p=0,11). Zbytek byl vyhodnocen jako statisticky nesignifikantní - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (p=0,48), DN CD21<sup>low</sup> (p=0,34). Grafické vyobrazení všech rozdílů je znázorněno na Obrázku 15 níže.



Obrázek 15: Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru HLA-DR (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 5.6 Výsledky pro chemokinové receptory CD21<sup>low</sup> - CCR7

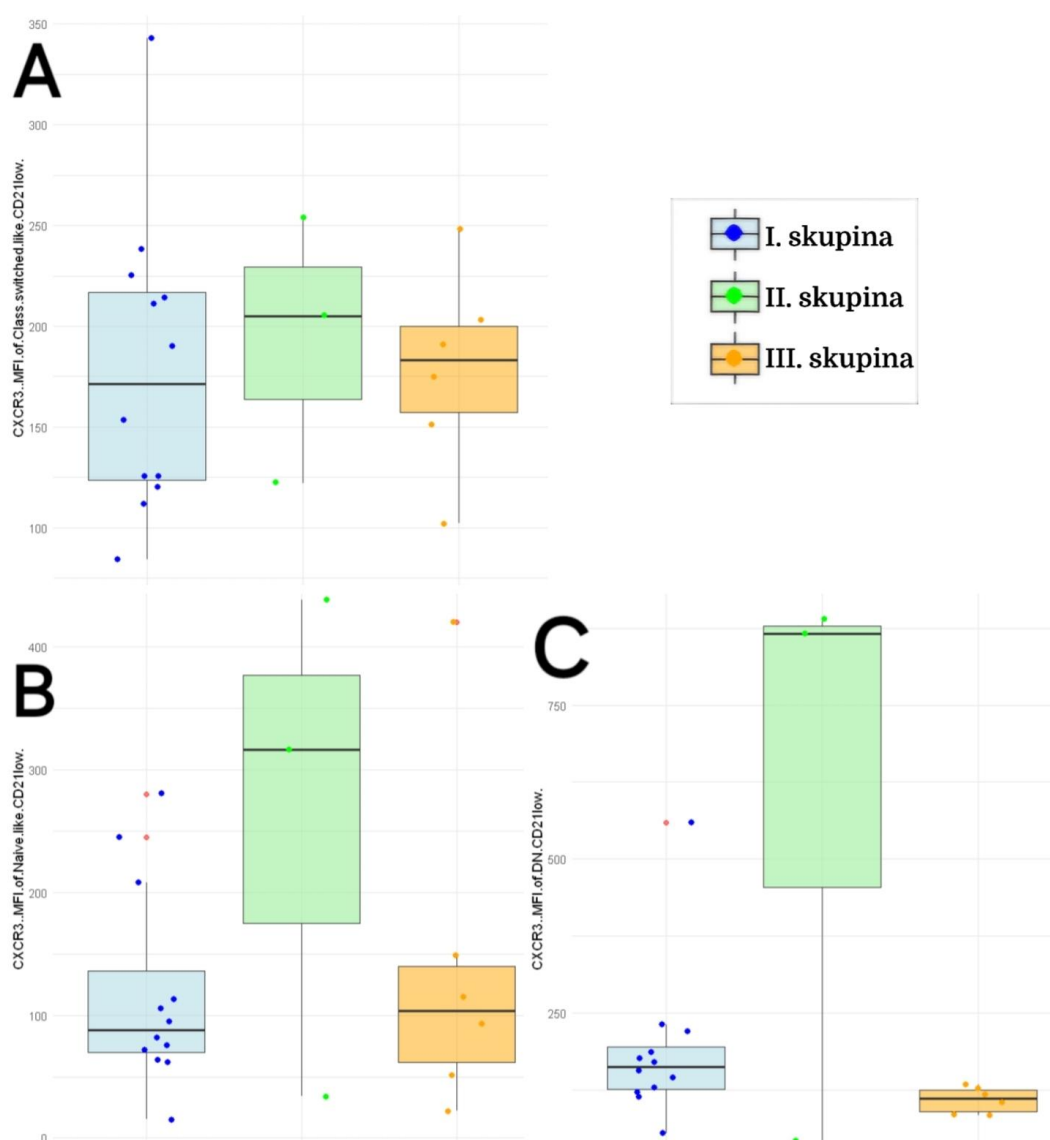
Následovalo měření exprese chemokinových receptorů, nejprve CCR7 v jednotkách MFI pro subpopulace CD21<sup>low</sup> B buněk u všech skupin pacientů - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (I:  $-365,75 \pm 338,89$  MFI; II:  $533,67 \pm 253,25$  MFI; III:  $-316,77 \pm 241,05$  MFI), naivní CD21<sup>low</sup> (I:  $246,38 \pm 246,31$  MFI; II:  $852,67 \pm 409,84$  MFI; III:  $292,25 \pm 239,64$  MFI) a DN CD21<sup>low</sup> (I:  $-65,73 \pm 232,22$  MFI; II:  $516 \pm 328,3$  MFI; III:  $-37,32 \pm 102,88$  MFI). Na první pohled lze vyčíst značně zvýšené hodnoty pro skupinu II ve všech subpopulacích. Statistická signifikance rozdílu I. a III. kategorie nebyla identifikována (CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku -  $p=0,28$ ; naivní CD21<sup>low</sup> -  $p=0,38$ ; DN CD21<sup>low</sup> -  $p=0,16$ ). Hodnoty CCR7 v jednotlivých skupinách jsou graficky znázorněny na Obrázku 16 níže.



Obrázek 16: Grafické znázornění hodnot chemokinového receptoru CCR7 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 5.7 Výsledky pro chemokinové receptory CD21<sup>low</sup> - CXCR3

Závěrem byla měřena míra exprese chemokinového receptoru CXCR3 pro subpopulace CD21<sup>low</sup> B buněk u všech skupin - CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (I: 178,43 ± 69,65 MFI; II: 193,67 ± 54,48 MFI; III: 178,33 ± 45,11 MFI), naivní CD21<sup>low</sup> (I: 117,69 ± 78,18 MFI; II: 262,73 ± 169,1 MFI; III: 141,33 ± 131,11 MFI) a DN CD21<sup>low</sup> (I: 188,58 ± 120,8 MFI; II: 599,4 ± 394,12 MFI; III: 108,6 ± 19,36 MFI). Pro skupinu II lze vypočítat zvýšené hodnoty u naivních CD21<sup>low</sup> a DN CD21<sup>low</sup>. Statistická analýza ukázala velmi výraznou signifikanci rozdílu I. a III. kategorie pro DN CD21<sup>low</sup> (p=0,01). U zbytku dat nebyly identifikovány signifikantní rozdíly (CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku - p=0,55; naivní CD21<sup>low</sup> - p=0,45). Znázornění všech hodnot pro jednotlivé skupiny a subpopulace CD21<sup>low</sup> je vyobrazeno na Obrázku 17 níže.



Obrázek 17: Grafické znázornění hodnot chemokinového receptoru CXCR3 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

## 6 Závěr

Thymus je stěžejní orgán pro ustanovení centrální tolerance imunitního systému. Jeho patologické stavy pak mohou ovlivnit nejen ustanovení tolerance, ale i samotný vývoj lymfocytů. Proto jsem se v rámci SOČ zaměřil na B lymfocyty lokalizované v chorobných tkáních thymu, a to především na CD21<sup>low</sup> B lymfocyty, přičemž byl kladen důraz na zmapování jejich funkcí, lokalizací a bazální hladiny aktivace. V rámci této práce se podařilo z dostupných vzorků tkání brzlíku od pacientů, kteří podstoupili thymektomii indikovanou z důvodu nádoru či jiné patologie, izolovat lymfocyty pro další analýzu.

Bylo zjištěno, že zastoupení celkových B lymfocytů je pro všechny patologie thymu srovnatelné. Po zaměření na jednotlivé subpopulace B lymfocytů, výrazně nižší zastoupení paměťových B lymfocytů, lymfocytů po izotypovém přesmyku a plazmablastů bylo objeveno u nemocných diagnostikovaných thymomem a MG. U ostatních patologií tento trend pozorován nebyl. Stejně tak nebyl pozorován rozdíl v zastoupení populace CD21<sup>low</sup>, ale u subpopulací bylo odhaleno vyšší zastoupení naivních CD21<sup>low</sup> u pacientů diagnostikovaných MG s/bez doprovodným thymomem. Naopak skupina s MG i thymomem vykazovala nižší zastoupení CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku. Navíc jednotlivé subpopulace CD21<sup>low</sup> B lymfocytů nemocných s MG a thymomem vykazují nižší expresi aktivačních markerů - CD80/86, HLA-DR, ale naopak výrazně vyšší expresi chemokinového receptoru CCR7 spojeného s jejich transportem do sekundárních lymfatických uzlin a CXCR3 spojeného s přesunem do míst zánětu.

Hlavním přínosem této práce je podnět k dalšímu zkoumání buněčných populací B lymfocytů, především CD21<sup>low</sup> u pacientů s MG s přidruženým thymomem. To by mohlo pomoci blíže porozumět mechanismu vzniku, vývoje a průběhu MG asociované s maligním nádorem brzlíku nebo různých druhů patologií thymu. Právě thymom, jak tato práce naznačuje, se zdá mít důležitou roli v rozvoji autoimunitních onemocnění i vývoji autoreaktivních buněk, a to především pro narušení funkce CD21<sup>low</sup> jako APC, což vede k porušení centrální tolerance. Dále pak může mít dopad i na migraci buněk do místa zánětu zajišťovanou chemokinovými receptory, kde se mohou potenciálně podílet na patologických procesech. Práce svými zjištěními otevírá dveře k bližšímu porozumění dosud ne příliš prozkoumané populaci B lymfocytů - CD21<sup>low</sup>.

Pro další výzkum bude nutné tato data ověřit na větších kohortách skupin pacientů a rovněž se zaměřit na funkční testy vedoucí k detailnímu pochopení funkcí populace CD21<sup>low</sup> společně s jejich subpopulacemi. Plánované budoucí monitorování pacientů ve Fakultní nemocnici Motol několik let po provedení thymektomie může svými dalšími poznatky ve změnách buněčných populací v periferní krvi a výskytu autoimunitních onemocnění pomoci k ještě bližšímu porozumění B lymfocytům a CD21<sup>low</sup> u nemocných MG a MG s přidruženým thymomem.

## 7 Diskuze

Pro správné fungování imunitního systému je nezbytná souhra buněk a orgánů. Jedním z nich je primární lymfatický orgán - thymus, kde dochází k vývoji T lymfocytů a k ustanovení centrální tolerance. Stejně jako ostatní funkční struktury lidského těla, i tkáň thymu může podléhat patologickým změnám. Mezi ně se řadí nádory - thymomy nebo karcinomy brzlíku, MG, vícečetné cysty či hyperplazie. Dodnes však bohužel neznáme přesnou příčinu či spouštěč těchto změn [41].

Pro detailní pochopení pochodů na buněčné úrovni v patologických tkáních brzlíku je důležité popsat jednotlivé buněčné subpopulace, jejich funkce i vliv na buněčné interakce a ustanovení centrální tolerance. Víme, že autoimunitní onemocnění jsou asociována s výskytem patologických B lymfocytů produkujících autoprotiátky [53]. Úloha B lymfocytů lokalizovaných v patologických tkáních thymu a jejich souvislost s výskytem autoimunitních onemocnění však doposud zůstává ne zcela objasněna. Aktuálně je dostupné pouze omezené množství pramenů, přičemž B buňkám je věnován znatelně menší prostor v porovnání s T lymfocyty. Navíc většina studií se soustředí na lymfocyty obsažené v periferní krvi pacientů.

U B buněk lokalizovaných v thymu byla dokázána zvýšená exprese aktivačních a kostimulačních markerů, jako jsou HLA-DR společně s CD80/86, což souvisí s jejich schopností prezentovat antigeny a jejich zapojením do ustanovení centrální tolerance [42]. Naopak v patologických tkáních brzlíku byl detekován snížený počet, což může vysvětlovat fakt, že až u 30% pacientů s thymomem hrozí vývoj MG [32]. Několik studií totiž naznačuje, že B lymfocyty mohou mít vliv na centrální toleranci, konkrétně na negativní selekci T buněk v thymu, a to pro svou schopnost působit jako APC [48,49,50]. Nižší exprese aktivačních markerů B buněk v patologicky pozměněné tkáni thymu implikuje jejich sníženou schopnost působit jako APC, což může znamenat nižší kontrolu nad regulací vývoje autoreaktivních T lymfocytů vedoucí k větší pravděpodobnosti vzniku autoimunitního onemocnění - v tomto případě MG.

Zhang se svým kolektivem odhalil, že závažnost onemocnění se u pacientů s MG s asociovaným thymomem dá stanovit na základě poměru B lymfocytů po izotypovém přesmyku ( $CD19^+IgD^-CD27^+$ ) a paměťových B lymfocytů, které izotypový přesmyk ještě nepodstoupily ( $CD19^+IgD^+CD27^+$ ) [51]. Aby toto bylo možné ověřit, je potřeba v budoucnu rozšířit počet zkoumaných pacientů, v současné době tuto práci limituje počet vzorků v jednotlivých skupinách.

Poměrně nedávno došlo k popsání populace  $CD21^{low}$  B lymfocytů definované jako  $CD21^{low}CD38^+$ , lze ji pozorovat u řady autoimunitních onemocnění, jako je revmatoidní artritida, systémový lupus erythematosus či vrozená porucha imunitního systému - běžná variabilní imunodeficeience [43,44,45]. Tato populace buněk však byla objevena především v periferní krvi, zatímco o její úloze v thymu nejsou dostupné téměř žádné informace.

Dnes se setkáváme se dvěma odlišnými pohledy popisující funkce  $CD21^{low}$  B lymfocytů. První z nich je popisuje jako neschopné aktivace a proliferace tedy ve stavu tzv. anergie,

zatímco druhými přístupy bývají označovány jako patologicky aktivní buňky podílející se na dysregulaci imunitního systému [40,43,46]. To, že se nejedná pouze o anergní buňky popisuje i fakt, že vzájemná ko-kultivace CD21<sup>low</sup> B lymfocytů s thymocyty vedla k rychlejší vzájemné interakci buněk v porovnání s případem ko-kultivace CD21<sup>+</sup> B lymfocytů a thymocytů [47].

Ačkoliv se mi v práci nepodařilo prokázat rozdíly v zastoupení celkového počtu CD21<sup>low</sup> B lymfocytů lokalizovaných v patologické tkáni thymu, byla zjištěna nejednota v zastoupení jednotlivých populací CD21<sup>low</sup> definovaných pomocí exprese markerů IgD a CD27. Právě zastoupení subpopulací je klíčové, protože se zdá, že každá populace bude mít v patologiích nejen autoimunitních onemocnění jinou roli [40].

Popsal jsem, že jednotlivé populace CD21<sup>low</sup> u pacientů s MG s přidruženým thymomem vykazují nižší výskyt aktivačních markerů CD80/86 a HLA-DR, což naznačuje, že tyto buňky nejsou plně aktivované a disponují menší schopností působit jako APC. Tento poznatek je v rozporu se studií zaměřenou na antigen prezenční potenciál CD21<sup>low</sup> [40]. Zmíněná práce se ale zaměřuje na autoimunitní onemocnění obecně. Z tohoto lze předpokládat, že v MG s přidruženým thymomem může být antigen prezenční potenciál značně snížený oproti ostatním druhům autoimunit bez nádoru. To potvrzuje i fakt, že u kategorie zahrnující pouze MG byly hodnoty těchto markerů znatelně vyšší.

Dalším zajímavým poznatkem je zjištění signifikantně zvýšené exprese chemokinových receptorů CCR7 a CXCR3 u skupiny MG společně s thymomem. CCR7 souvisí s transportem CD21<sup>low</sup> buněk do sekundárních lymfatických uzlin, což by mohlo naznačovat jejich účast na dysregulaci imunitní odpovědi u MG. CXCR3 je spojen s migrací buněk do zánětlivých míst, to lze interpretovat tak, že CD21<sup>low</sup> mohou mít určitý podíl na patologických procesech spojených s těmito onemocněními i mimo thymus. Zajímavé je, že u kategorie s pouhou MG nebo jinou patologií thymu bez MG jsou hodnoty výrazně nižší.

Na základě popsaných výsledků lze předpokládat, že thymom může značně změnit úlohy CD21<sup>low</sup> B lymfocytů u pacientů s MG oproti těm s jinou nemaligní patologií. Toto tvrzení nelze podpořit žádnou další studií, jelikož v současné době, dle mých informací, na toto téma neexistuje žádná jiná práce. Širší poznatky v tomto ohledu by přitom mohly znamenat lepší pochopení role CD21<sup>low</sup> u pacientů s MG případně s přidruženým thymomem.

Tato práce byla do značné míry limitována nízkým počtem posuzovaných vzorků, který je ovlivněn velmi nízkou incidencí těchto onemocnění. Tento projekt byl zároveň proveden jako pilotní. Pro případné další studie na toto téma k ověření zmíněných tvrzení a poznatků je klíčové především rozšíření vzorku pacientů a jejich dlouhodobé sledování.

V budoucnu dojde k dalšímu rozvoji tohoto projektu. V případě podpory financování Ministerstvem zdravotnictví v rámci agentury pro zdravotnický výzkum, bude možné detailněji studovat funkce CD21<sup>low</sup> B lymfocytů. Jejich aktivační a proliferační kapacity se budou měřit pomocí funkčních testů, kdy budou B lymfocyty stimulovány jednak ligandy BCR, ale také TLR, jako jsou například lipopolysacharidy či resiquimod. Rovněž výzkum

povede ke sledování vlivu populace CD21<sup>low</sup> na ustanovení centrální tolerance a samotné T lymfocyty pomocí ko-kultivačních esejí. Nedílnou součástí bude i monitorování pacientů po thymektomii a pozorování dalšího výskytu autoimunitních onemocnění. V rámci periferní krve pacientů po thymektomii se výzkum rovněž zaměří na jev homeostatické proliferace, která může významně ovlivnit funkci a vlastnosti buněk imunitního systému [52].

## 8 Bibliografie

1. HOŘEJŠÍ, Václav; BARTŮŇKOVÁ, Jiřina; BRDIČKA, Tomáš a ŠPÍŠEK, Radek. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
2. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PANZNER, Petr. *Klinická imunologie a alergologie: pro všeobecné praktické lékaře*. Ediční řada pro VPL. Bratislava: Raabe, [2020]. ISBN 978-80-8140-413-9.
3. JANEWAY JR., CHARLES A, Janeway Jr., Charles A. *Immunobiology 5: the immune system in health and disease*. 5th ed. New York: Garland Publishing, 2001. ISBN 0-8153-3642-X.
4. BUC, Milan. *Charakteristika a funkcia ILC-buniek človeka za fyziologických a patologických okolností*. Dostupné také z: <http://www.tigis.cz/casopisy/>.
5. NOVOTNÝ, Ivan a HRUŠKA, Michal. *Biologie člověka*. 6., upravené vydání. Praha: Fortuna, 2021. ISBN 978-80-7373-169-4.
6. SEIDL, Zdeněk a OBENBERGER, Jiří. *Neurologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0623-7.
7. *Imunitní systém*. Online. Wikiskripta. 2024. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Imunitn%C3%AD\\_syst%C3%A9m](https://www.wikiskripta.eu/w/Imunitn%C3%AD_syst%C3%A9m). [cit. 2025-01-18].
8. *Autoimunitní onemocnění*. Online. Wikiskripta. 2018. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Autoimunitn%C3%AD\\_onemocn%C4%9Bn%C3%AD](https://www.wikiskripta.eu/w/Autoimunitn%C3%AD_onemocn%C4%9Bn%C3%AD). [cit. 2025-01-18].
9. *Regulace v imunitním systému*. Online, Prezentace k přednášce. Brno: Masarykova univerzita, 2018. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/VLIM051p/um/Prednaska\\_V\\_Cytokiny\\_Regulace\\_imunitni\\_odpovedi\\_\\_Imunologicka\\_tolerance.pdf](https://is.muni.cz/el/med/podzim2018/VLIM051p/um/Prednaska_V_Cytokiny_Regulace_imunitni_odpovedi__Imunologicka_tolerance.pdf). [cit. 2025-01-20].
10. ZÁKLADY ANATOMIE SOUSTAVY DÝCHACÍ, SRDEČNĚ CÉVNÍ, LYMFATICKÉHO SYSTÉMU, KŮŽE A JEJICH DERIVÁTŮ. *Lymfatický systém – systema lymphatica*. Online. 2013. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady\\_anatomie/zakl\\_anatomieIII/pages/lymfaticky\\_system.html#lymfaticke-organy](https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomieIII/pages/lymfaticky_system.html#lymfaticke-organy). [cit. 2025-01-20].
11. ČÍŽEK, Petr; HURNÍK, Pavel a URÍK, Milan. *Histologie - Lymfatický systém*. Online, Modelová kapitola. Brno: Středisko pro pomoc studentům se specifickými nároky - Masarykova univerzita, rok neuveden. Dostupné z: <https://www.teiresias.muni.cz/comin/documents/histologie-modelova-kapitola.pdf>. [cit. 2025-01-20].
12. *Mízní uzliny a cévy*. Online, Prezentace. Praha: 2.Lékařská fakulta UK, 2019. Dostupné z: <https://anatomie.lf2.cuni.cz/sites/anatomie/files/page/files/2019/miza.pdf>. [cit. 2025-01-20].
13. FONTANA, Josef a ŠAJDÍKOVÁ, Martina. *Lymfatický systém a imunita*. Online. Funkce buněk a lidského těla. 2024. Dostupné z: <https://fblt.cz/skripta/v-krev-a-organy-imunitniho-systemu/6-thymus-mizni-uzliny-a-difuzni-imunitni-system/>. [cit. 2025-01-18].

14. MEKORI, Yoseph A. Introduction to allergic diseases. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1996, roč. 36, č. sup001, s. 1-18. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408399609527756>. [cit. 2025-01-18].
15. CHALÁSOVÁ, Katarína. *Imunita - Imunitní systém, očkování, krevní skupiny*. Online, Prezentace. Brno: Masarykova univerzita, rok neuveden. Dostupné z: [https://is.muni.cz/www/k.chalasova/nalekarskou/105871915/13\\_imunitni\\_soustava.pdf?lang=en](https://is.muni.cz/www/k.chalasova/nalekarskou/105871915/13_imunitni_soustava.pdf?lang=en). [cit. 2025-01-20].
16. VLKOVÁ, Marcela. *HLA - systém*. Online, Prezentace. Brno: Masarykova univerzita, 2016. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/MBKI081p/um/14\\_imunologie\\_magistri\\_HLA\\_system.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/MBKI081p/um/14_imunologie_magistri_HLA_system.pdf). [cit. 2025-01-20].
17. *IMUNODEFICIENCE*. Online, Prezentace k přednášce. Praha: 1.Lékařská fakulta UK, rok neuveden. Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/324/Imunodeficiency.pdf>. [cit. 2025-01-20].
18. KONECZNY, Inga a HERBST, Ruth. Myasthenia Gravis: Pathogenic Effects of Autoantibodies on Neuromuscular Architecture. Online. *Cells*. 2019, roč. 8, č. 7. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells8070671>. [cit. 2025-01-18].
19. *B lymfocyty*. Online, Prezentace. Plzeň: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň, 2018. Dostupné z: [https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia2/24.10.2018\\_0.pdf](https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia2/24.10.2018_0.pdf). [cit. 2025-01-20].
20. Imunologie a autoimunitní onemocnění. Online. *Med. praxi*. 2016, roč. 22., č. 4, s. 1-4. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2016/04/04.pdf>. [cit. 2025-01-19].
21. OLBRICHT, Dominik. *ZÁKLADY ALERGOLOGIE*. Online, Prezentace k přednášce. Praha: 1.Lékařská fakulta UK, rok neuveden. Dostupné z: <https://kpdpm.lf1.cuni.cz/file/327/alergologie-imunologie-zubari-bez-obrazku.pdf>. [cit. 2025-01-20].
22. LITZMAN, Jiří. *Mechanismy specifické buněčné imunity*. Online, Prezentace k přednášce. Brno: Masarykova univerzita, 2015. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2015/VLIM051p/um/cz/prednasky/Prednaska-IV-Bunecna\\_imunita.pdf](https://is.muni.cz/el/med/podzim2015/VLIM051p/um/cz/prednasky/Prednaska-IV-Bunecna_imunita.pdf). [cit. 2025-01-20].
23. MAGGI, Lorenzo a MANTEGAZZA, Renato. Treatment of Myasthenia Gravis. Online. *Clinical Drug Investigation*. 2011, roč. 31, č. 10, s. 691-701. ISSN 1173-2563. Dostupné z: <https://doi.org/10.2165/11593300-000000000-00000>. [cit. 2025-01-18].
24. ANAYA, Juan-Manuel; SHOENFELD, Yehuda; ROJAS-VILLARRAGA, Adriana; LEVY, Roger A. a CERVERA, Ricard (ed.). *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogota (Colombia): El Rosario University Press, 2013. ISBN 9789587383669.
25. FELLNEROVÁ, I. a FELLNEROVÁ, A. *T lymfocyty a látková imunita*. Online, Pracovní text. Olomouc: Přírodovědecká fakulta UPOL, 2015. Dostupné z: [https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie\\_pdf/6\\_T\\_lymfocyty\\_a\\_bunecna\\_imunita\\_2015\\_11\\_text.pdf](https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie_pdf/6_T_lymfocyty_a_bunecna_imunita_2015_11_text.pdf). [cit. 2025-01-20].

26. EL-SHEBINY, Emad M.; ZAHRAN, Enas S.; SHOEIB, Sabry A. a HABIB, Eman S. Bridging autoinflammatory and autoimmune diseases. Online. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*. 2021, roč. 33, č. 1. ISSN 1110-7782. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43162-021-00040-5>. [cit. 2025-01-18].
27. *AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ 1. část*. Online, Presentace. Plzeň: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň, 2018. Dostupné z: [https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia2/21.11.2018\\_0.pdf](https://uia.fnplzen.cz/sites//users/uia2/21.11.2018_0.pdf). [cit. 2025-01-20].
28. TOUITOU, Isabelle a KONÉ-PAUT, Isabelle. Autoinflammatory diseases. Online. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2008, roč. 22, č. 5, s. 811-829. ISSN 15216942. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.08.009>. [cit. 2025-01-18].
29. MEDICÍNA, NEMOCI, STUDIUM NA 1. LF UK NERVOSVALOVÁ PLOTÉNKA. *Nervosvalová ploténka*. Online. 2011. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/nervosvalova-plotenka>. [cit. 2025-01-20].
30. TÝBLOVÁ, Michaela. Current and future therapeutic options for the treatment of the generalized form of myasthenia gravis. Online. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2023, roč. 86/119, č. 3. ISSN 12107859. Dostupné z: <https://doi.org/10.48095/cccsnn2023100>. [cit. 2025-01-18].
31. EHLER, Edvard a PÍŤHA, Jiří. *Myasthenia gravis s protilátkami proti MuSK*. Dostupné z: <https://doi.org/10.36290/neu.2017.104>.
32. DRESSER, Laura; WLODARSKI, Richard; REZANIA, Kourosh a SOLIVEN, Betty. Myasthenia Gravis: Epidemiology, Pathophysiology and Clinical Manifestations. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, roč. 10, č. 11. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm10112235>. [cit. 2025-01-18].
33. ROMI, Fredrik; HONG, Yu a GILHUS, Nils Erik. Pathophysiology and immunological profile of myasthenia gravis and its subgroups. Online. *Current Opinion in Immunology*. 2017, roč. 49, s. 9-13. ISSN 09527915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.006>. [cit. 2025-01-20].
34. ROUSSEFF, Rossen T. Diagnosis of Myasthenia Gravis. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2021, roč. 10, č. 8. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm10081736>. [cit. 2025-01-18].
35. ALHAIDAR, Mohammed K.; ABUMURAD, Sumayyah; SOLIVEN, Betty a REZANIA, Kourosh. Current Treatment of Myasthenia Gravis. Online. *Journal of Clinical Medicine*. 2022, roč. 11, č. 6. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jcm11061597>. [cit. 2025-01-18].
36. FREUDENHAMMER, Mirjam; VOLL, Reinhard E.; BINDER, Sebastian C.; KELLER, Baerbel a WARNATZ, Klaus. Naive- and Memory-like CD21<sup>low</sup> B Cell Subsets Share Core Phenotypic and Signaling Characteristics in Systemic Autoimmune Disorders. Online. *The Journal of Immunology*. 2020, roč. 205, č. 8, s. 2016-2025. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000343>. [cit. 2025-01-18].
37. THORARINSDOTTIR, Katrin; CAMPONESCHI, Alessandro; JONSSON, Charlotte; GRANHAGEN ÖNNHEIM, Karin; NILSSON, Jenny et al. CD21<sup>-/low</sup> B cells associate with joint damage in rheumatoid arthritis patients. Online. *Scandinavian*

- Journal of Immunology*. 2019, roč. 90, č. 2. ISSN 0300-9475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/sji.12792>. [cit. 2025-01-18].
38. RAKHMANOV, Mirzokhid; KELLER, Baerbel; GUTENBERGER, Sylvia; FOERSTER, Christian; HOENIG, Manfred et al. Circulating CD21<sup>low</sup> B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, roč. 106, č. 32, s. 13451-13456. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0901984106>. [cit. 2025-01-18].
  39. WENDELL, Linda C. a LEVINE, Joshua M. Myasthenic Crisis. Online. *The Neurohospitalist*. 2011, roč. 1, č. 1, s. 16-22. ISSN 1941-8744. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1941875210382918>. [cit. 2025-01-18].
  40. REINCKE, Marlene E.; PAYNE, Kathryn J.; HARDER, Ina; STROHMEIER, Valentina; VOLL, Reinhard E. et al. The Antigen Presenting Potential of CD21<sup>low</sup> B Cells. Online. *Frontiers in Immunology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.535784>. [cit. 2025-01-30].
  41. ROBINSON, Shawn P. a AKHONDI, Hossein. *Thymoma*. Online. Treasure Island (FL): StatPearls [Internet], 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559291/>. [cit. 2025-01-30].
  42. FEHERVARI, Zoltan. Thymic B cells. Online. *Nature Immunology*. 2013, roč. 14, č. 12, s. 1211-1211. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ni.2777>. [cit. 2025-01-30].
  43. FREUDENHAMMER, Mirjam; VOLL, Reinhard E.; BINDER, Sebastian C.; KELLER, Baerbel a WARNATZ, Klaus. Naive- and Memory-like CD21<sup>low</sup> B Cell Subsets Share Core Phenotypic and Signaling Characteristics in Systemic Autoimmune Disorders. Online. *The Journal of Immunology*. 2020, roč. 205, č. 8, s. 2016-2025. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000343>. [cit. 2025-01-30].
  44. THORARINSDOTTIR, Katrin; CAMPONESCHI, Alessandro; JONSSON, Charlotte; GRANHAGEN ÖNNHEIM, Karin; NILSSON, Jenny et al. CD21<sup>−/low</sup> B cells associate with joint damage in rheumatoid arthritis patients. Online. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2019, roč. 90, č. 2. ISSN 0300-9475. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/sji.12792>. [cit. 2025-01-30].
  45. RAKHMANOV, Mirzokhid; KELLER, Baerbel; GUTENBERGER, Sylvia; FOERSTER, Christian; HOENIG, Manfred et al. Circulating CD21<sup>low</sup> B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, roč. 106, č. 32, s. 13451-13456. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.0901984106>. [cit. 2025-01-30].
  46. ISNARDI, Isabelle; NG, Yen-Shing; MENARD, Laurence; MEYERS, Greta; SAADOUN, David et al. Complement receptor 2/CD21<sup>−</sup> human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. Online. *Blood*. 2010, roč. 115, č. 24, s. 5026-5036. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243071>. [cit. 2025-01-30].

47. LUNDQVIST, Christina; CAMPONESCHI, Alessandro; VISENTINI, Marcella; TELEMÖ, Esbjörn; EKWALL, Olov et al. Switched CD21<sup>-/low</sup> B cells with an antigen-presenting phenotype in the infant thymus. Online. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019, roč. 143, č. 4, s. 1616-1620.e7. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.019>. [cit. 2025-01-30].
48. CASTAÑEDA, Justine; HIDALGO, Yessia; SAUMA, Daniela; ROSEMBLATT, Mario; BONO, María Rosa et al. The Multifaceted Roles of B Cells in the Thymus: From Immune Tolerance to Autoimmunity. Online. *Frontiers in Immunology*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766698>. [cit. 2025-01-30].
49. YAMANO, Tomoyoshi; STEINERT, Madlen a KLEIN, Ludger. Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance. Online. *Frontiers in Immunology*. 2015, roč. 6. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00376>. [cit. 2025-01-30].
50. ROTHER, Magdalena B.; SCHREURS, Marco W. J.; KROEK, Roel; BARTOL, Sophinus J. W.; VAN DONGEN, Jacques J. M. et al. The Human Thymus Is Enriched for Autoreactive B Cells. Online. *The Journal of Immunology*. 2016, roč. 197, č. 2, s. 441-448. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501992>. [cit. 2025-01-30].
51. ZHANG, Peng; LIU, Yuxin; CHEN, Si; ZHANG, Xinyu; WANG, Yuanguo et al. Distribution of multi-level B cell subsets in thymoma and thymoma-associated myasthenia gravis. Online. *Scientific Reports*. 2024, roč. 14, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53250-6>. [cit. 2025-01-30].
52. SMETANOVA, Jitka; MILOTA, Tomas; RATAJ, Michal; BLOOMFIELD, Marketa; SEDIVA, Anna et al. Accelerated Maturation, Exhaustion, and Senescence of T cells in 22q11.2 Deletion Syndrome. Online. *Journal of Clinical Immunology*. 2022, roč. 42, č. 2, s. 274-285. ISSN 0271-9142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01154-9>. [cit. 2025-02-04].
53. HAMPE, Christiane S. B Cells in Autoimmune Diseases. Online. *Scientifica*. 2012, roč. 2012, s. 1-18. ISSN 2090-908X. Dostupné z: <https://doi.org/10.6064/2012/215308>. [cit. 2025-02-04].

## 9 Seznam a zdroje použitých obrázků a tabulek

### 9.1 Seznam a zdroje použitých obrázků

1. *Hematopoiesis simple*. Online. In: Wikimedia. 2009. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4a/Hematopoiesis\\_simple.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4a/Hematopoiesis_simple.png). [cit. 2025-01-20].
2. *Brzlik*. Online. In: Medixa. 2014. Dostupné z: <https://www.medixa.org/nemoci/brzlik>. [cit. 2025-01-20].
3. *Changes in thymus with age*. Online. In: Immunesystemimmunity. 2011. Dostupné z: <https://immunesystemimmunity.blogspot.com/2011/11/thymus.html>. [cit. 2025-01-20].
4. *Central and peripheral tolerance*. Online. In: Multidisciplinary Digital Publishing Institute | MDPI. 2021. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/2/202>. [cit. 2025-01-20].
5. *Schéma - obecná stavba imunoglobulinu*. Online. In: Stefajir. 2011. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/protilatka>. [cit. 2025-01-20].
6. *Membránové proteiny T lymfocytů účastníci se stimulace*. Online. In: PřF UPOL. 2013. Dostupné z: [https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie\\_pdf/6\\_T\\_lymfocyty\\_a\\_bunecna\\_imunita\\_2015\\_11\\_text.pdf](https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/imunologie_pdf/6_T_lymfocyty_a_bunecna_imunita_2015_11_text.pdf). [cit. 2025-01-20].
7. *Blocking auto-antibodies (Myasthenia gravis)*. Online. In: Pathologicallyspeaking. 2015. Dostupné z: <http://pathologicallyspeaking.blogspot.com/search/label/myasthenia%20gravis>. [cit. 2025-01-20].
8. **Obrázek 8:** Grafické znázornění procentuálního zastoupení B lymfocytů pro skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
9. **Obrázek 9:** Grafické znázornění počtu buněk v jednotlivých základních subpopulacích B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: B lymfocyty po izotypovém přesmyku (CD19+CD27+IgD-IgM-), B: B lymfocyty marginální zóny (CD19+CD27+IgD+IgM+), C: Paměťové (CD19+CD27+) B lymfocyty, D: naivní (CD19+IgD+CD27-) B lymfocyty, E: Plazmablasty (CD19+CD27+IgD-IgM-CD38+).
10. **Obrázek 10:** Grafické znázornění procentuálního zastoupení CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG).

- 11. Obrázek 11:** Grafické znázornění počtu buněk v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: naivní CD21<sup>low</sup> (IgD+CD27-), B: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku (IgD-CD27+), C: DN CD21<sup>low</sup> (IgD-CD27-). Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 12. Obrázek 12:** Grafické znázornění hodnot aktivačních markerů CD40, CD80/86 a HLA-DR (MFI) u populace B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD40, B: CD80/86, C: HLA-DR. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 13. Obrázek 13:** Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru CD40 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 14. Obrázek 14:** Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru CD80/86 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 15. Obrázek 15:** Grafické znázornění hodnot aktivačního markeru HLA-DR (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 16. Obrázek 16:** Grafické znázornění hodnot chemokinového receptoru CCR7 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.
- 17. Obrázek 17:** Grafické znázornění hodnot chemokinového receptoru CXCR3 (MFI) v jednotlivých subpopulacích CD21<sup>low</sup> B lymfocytů pro pacienty skupiny I (MG), II (MG + thymomy) a III (jiná patologie thymu bez MG). A: CD21<sup>low</sup> po izotypovém přesmyku, B: naivní CD21<sup>low</sup>, C: DN CD21<sup>low</sup>. Hodnoty, které mají vůči zbytku dat neobvykle vysoký rozptyl, jsou označeny červenou tečkou.

\* Všechny obrázky, které nemají uvedeno přejímání, jsou vytvořeny autorem.

## 9.1 Seznam použitých tabulek

**Tabulka 1:** Vyobrazení použitých protilátek konjugovaných s fluorochromy k detekci B buněčné linie

**Tabulka 2:** Vyobrazení použitých protilátek konjugovaných s fluorochromy k detekci chemokinových receptorů a aktivačních znaků