

The background of the slide features a dark red color with several out-of-focus, semi-transparent red blood cells scattered across the top and bottom edges. The main content area is white.

# **Proliferace lymfocytů**

# Izolace lymfocytů

- 10 ml krve – pro čtyři studenty
- 10ml krve smíchat s 10 ml RPMI v kontejnerku, promíchat
- do prázdné zkumavky napipetovat 3,5 ml Lymphoprepu
- pasterkou nanést **OPATRNĚ** na povrch Lymphoprepu cca 5 ml krve smíchané s RPMI (ve skupině 4 rovnoměrně = stejná hladina), vrstvy se nesmí promíchat

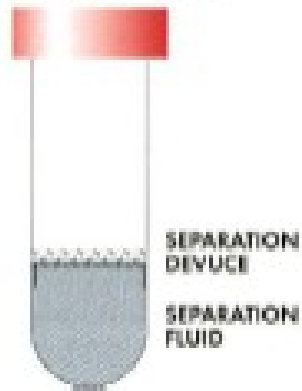
# Izolace lymfocytů 2

- **stáčet při 2500 ot. /30 min**
- **po centrifugaci: bílý proužek cca uprostřed je vrstva lymfocytů oddělený na základě odlišné vznášivé hustoty**
- **odstranit do koše vrchní vrstvu krevní plazmy**
- **kroužek lymfocytů přenést do nové zkumavky (vždy 2 studenti do 1 zkumavky)**
- **doplnit do plného objemu PBS a PROMÍCHAT pasterkou**
- **centrifugovat 1800 ot./10 min**

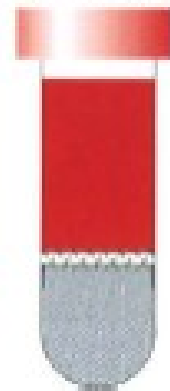
# Izolace lymfocytů 3

- **zkontrolovat zda jsou lymfocyty zcentrifugovány na dně zkumavky**
- **slít tekutinu**
- **přidat 1 ml PBS**
- **dobře promíchat**
- **nechat spočítat lymfocyty pomocí přístroje pro počítání leukocytů – naměřená hodnota udává počet lymfocytů  $\times 10^6/\text{ml}$**

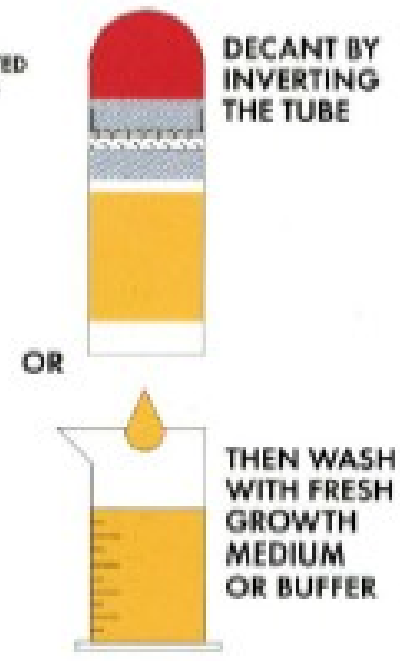
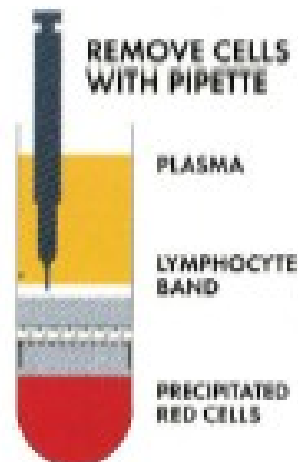
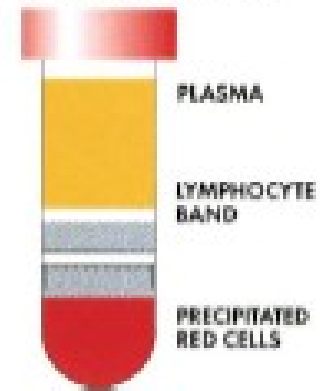
**UNI-SEP TUBE  
READY FOR USE**



**AFTER THE  
ADDITION OF BLOOD**



**AFTER  
CENTRIFUGATION**





# Kultivace lymfocytů *in vitro*

- primární buněčné linie lymfocytů jsou odvozené z periferní krve nebo z lymfoidních orgánů
- pouze model chování IS – IS je jinak velice komplexní!!
- pěstování probíhá v definovaném bazálním médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ATB-*penicilin, streptomycin...*) při 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%vlhkost
- podle typu pěstovaných buněk další přídatné látky (některé připraveny pomocí GI)
- cesta kterou objeveny mnohé fce cytokinů a růst. faktorů

# Kultivace lymfocytů *in vitro* 2

- normální buňky mají omezenou délku života – omezený počet dělení
- pro srovnání experimentálních dat problém → pomocí karcinogenních látek či virů (SV40, EBV) lze dosáhnout transformace buněk na nesmrtelné a vytvořit tzv. buněčné linie

*Jurkat – lidské leukemické buňky produkující IL-2*

*HL-60 – lidské buňky odvozené od myeloidních leukemických bñěk*



# Proliferační test

- testuje schopnost lymfoctů dělit se po stimulaci
- k testu se využívá: plné periferní krve nebo izolovaných leukocytů
- je potřeba definované množství lymfocytů
- přidá se stimulancium (PHA, ConA, Ag...)
- inkubace 2 (ConA, PHA) či 7 (tetanický toxoid) dní
- den před vyhodnocováním testu se přidá do proliferační směsi tymidin s  $H^3$
- druhý den se hodnotí množství začleněného tymidinu pomocí betacounteru (jednotky cpm)

# SCID

## severe combined immunodeficiency

- skupina onemocnění, které vykazují vadu ve vývoji lymfoidní řady – někdy pouze porucha vývoje T-lymf, někdy kombinace s B-lymf. a s NK buňkami (záleží na genetické vadě)
- klinické projevy - nevyvíjí se thymus, velmi nízké počty cirkulujících lymfocytů (lymfopenie) a T-lymfocytů
- lymfocyty nereagují na stimulaci mitogeny – tzn. nemůžou proliferovat v odpovědi na antigeny (myeloidní a eryteroidní řada je v počtech a funkci neovlivněna)

# SCID

- existuje asi 7 variant, které jsou AR, jedna X vázaná
- většinou jde o defekt v gama řetězci IL-2R (X-vázaná forma), tento řetězec je součástí i receptorů IL-4, -7, -9, 15

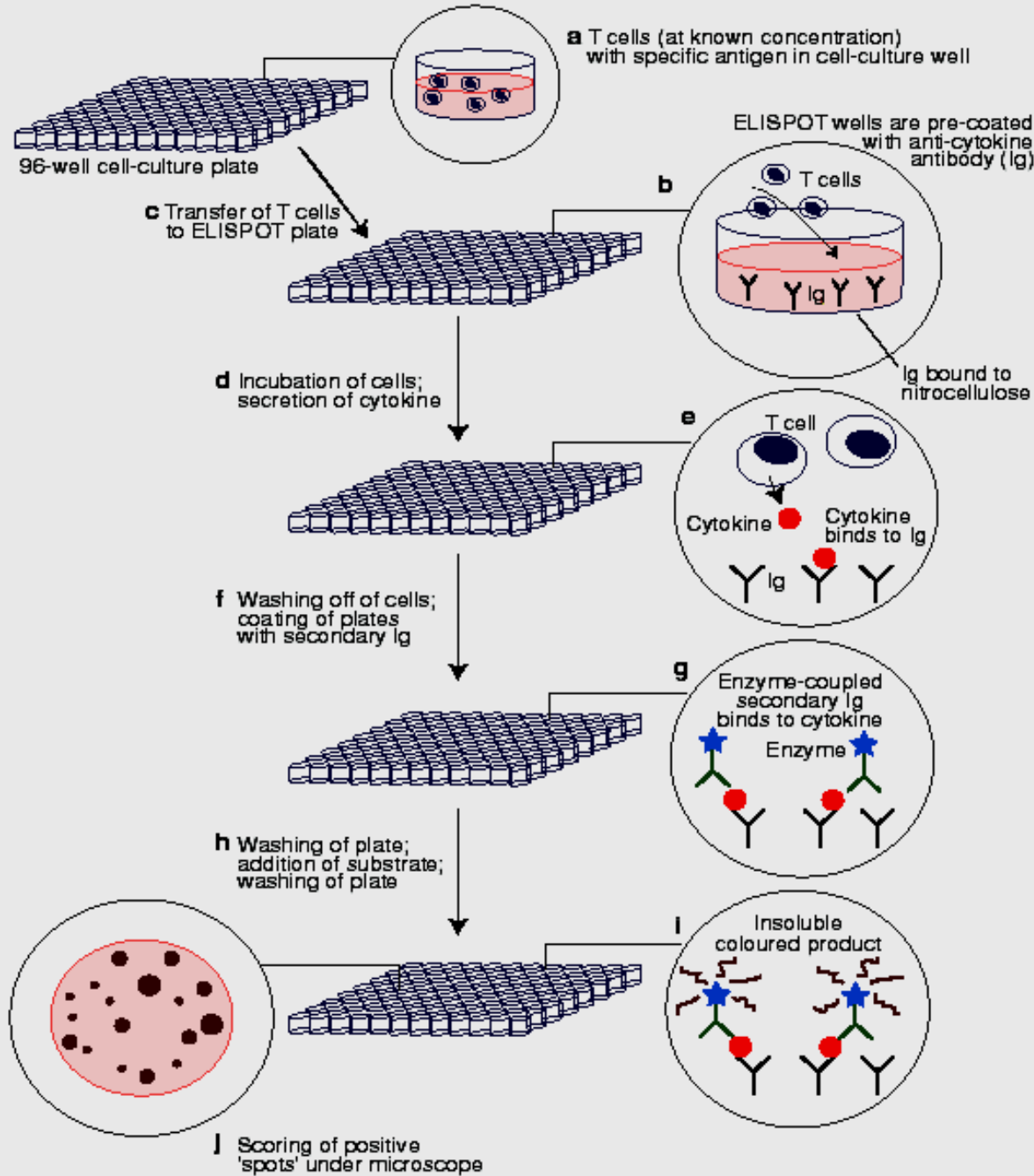
Syndrom	T-bb	B-bb	NK-bb	Dědičnost
Retikulární dysgeneze	-	-	-	AR
ADA deficit	-	-	-	AR
RAG 1,2 deficit	-	-	+	AR
C $\gamma$ C deficit	-	+	-	XL
JAK3 deficit	-	+	-	AR
IL-7R $\alpha$ deficit	-	+	+	AR
Omennův syndrom	+	-	+	AR
ZAP-70 deficit	CD4+	+	+	AR

# SCID

- prodloužení života vyhnutím se kontaktu s potenciálně nebezpečnými patogeny – musí žít ve sterilním prostředí!
- musí se vyhýbat kontaktu s lidmi a nefiltrovaným vzduchem, vše s čím přijdou tyto děti do styku - včetně jídla! musí být sterilizováno

# ELISPOT

- umožňuje kvantifikaci buněk v populaci, které produkují specifické protilátky proti předloženému antigenu



ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

# ELISPOT

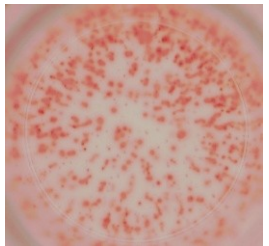


**$5 \times 10^5$**

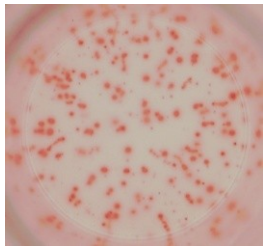
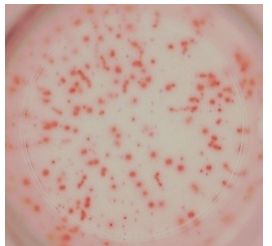
**7 dní po očkování**



**$2,5 \times 10^5$**



**$1,25 \times 10^5$**



**$0,63 \times 10^5$**