

Izolace buněk

Funkční testy lymfocytů



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

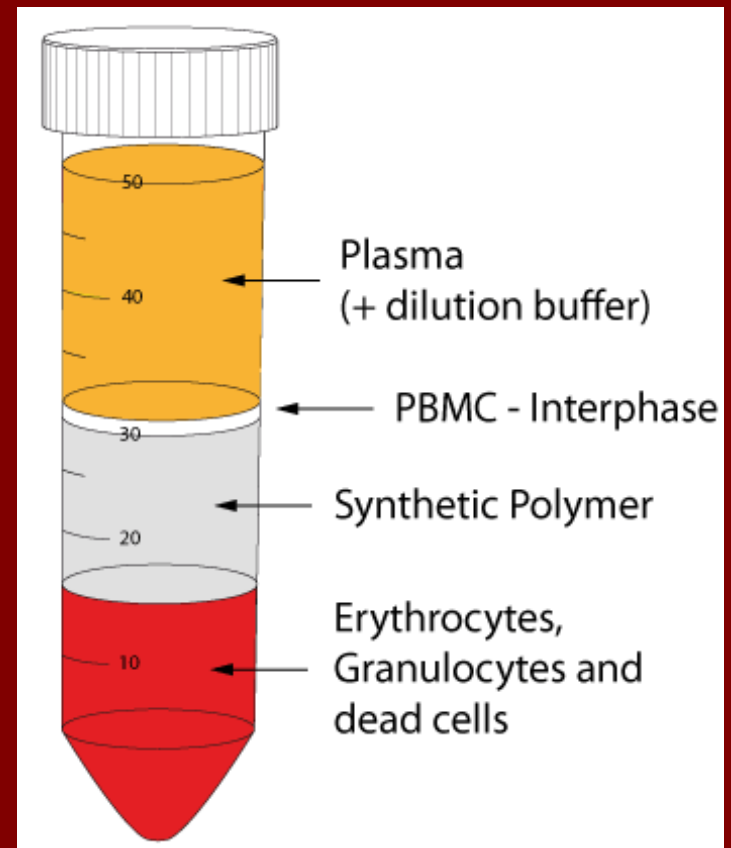
Izolace PBMC

PBMC = peripheral blood mononuclear cells = lymfocyty, monocyty

- Izolace PBMC pomocí gradientové centrifugace

krev se opatrně navrství na
separační médium

při centrifugaci se oddělí
jednotlivé vrstvy na základě
odlišné vznášivé hustoty –
nahore je plazma, mezi plazmou
a médiem je vrstva PBMC, na
dno klesnou erythrocyty a
granulocyty



Izolace PBMC

- odebere se plazma
- poté se nabere vrstva PBMC pozorovatelná jako bílý prstenec na rozhraní plazmy a média
- PBMC se pak promyjí pomocí PBS (opakované stočení, odlití supernatantu a rozsuspendování peletu v PBS)

- získá se koncentrovaná suspenze mononukleárů



Další typy izolací buněk

- **Jednotlivé typy leukocytů je možné izolovat např. pomocí IMUNOMAGNETICKÉ SELEKCE**
- **Využívá magnetické kuličky s navázanými monoklonálními protilátkami proti určitým CD znakům hledaného typu buněk**
- **buňky se navážou na tyto kuličky a jsou silným magnetem přichyceny ke stěně zkumavky, po odmytí ostatních buněk zůstanou jen požadované buňky (pozitivní selekce)**
- **postup je možné využít i obráceně – zbavit se určitého typu buněk a získat všechny ostatní (negativní selekce)**
- **k izolaci buněk je možné využít i modifikaci průtokového cytometru – cell sorter**

Funkční testy lymfocytů

- Patří sem zejména TEST PROLIFERACE LYMFOCYTŮ, kdy se sleduje schopnost dělení lymfocytů po stimulaci
- *Stimulátory:*
 - rostlinné - PHA (fytohemaglutinin), ConA (konkanavalin)
 - monoklonální protilátky proti receptorům a koreceptorům (anti-CD3, anti-CD28)
 - bakteriální antigeny – tetanický toxoid
- Izolované buňky se kultivují několik dní *in vitro* s různými stimulátory a pro kontrolu i bez stimulace
- Poruchou proliferace se vyznačují závažná onemocnění imunitního systému jako SCID (severe combined immunodeficiency)

Funkční testy lymfocytů

- Schopnost proliferace je možné testovat různými metodami, např:
 - detekce nově syntetizované DNA pomocí BrdU (brom-deoxyuridin), který je homologem thyminu a začlení se do nově vznikající DNA, BrdU je poté detekován pomocí protilátky anti-BrdU značené např. fluorescenčně
 - detekce nově syntetizované DNA pomocí thymidinu značeného radioaktivně (tritiem) – měření na *beta-counteru*
 - cytometrická detekce pomocí fluorescenčního barviva CFSE (karboxyfluoresceinsukcinimidylester), které se váže nespecificky na různé struktury v buňkách, sleduje se nárůst fluorescence po dělení buněk

Kultivace lymfocytů *in vitro*

- pěstování probíhá v definovaném bazálním médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ATB-*penicilin, streptomycin...*) při 37°C, 5%CO₂, 95%vlhkost
- normální buňky mají omezenou délku života – omezený počet dělení
- pomocí karcinogenních látek či virů (SV40, EBV) lze dosáhnout transformace buněk na nesmrtelné a vytvořit tzv. buněčné linie

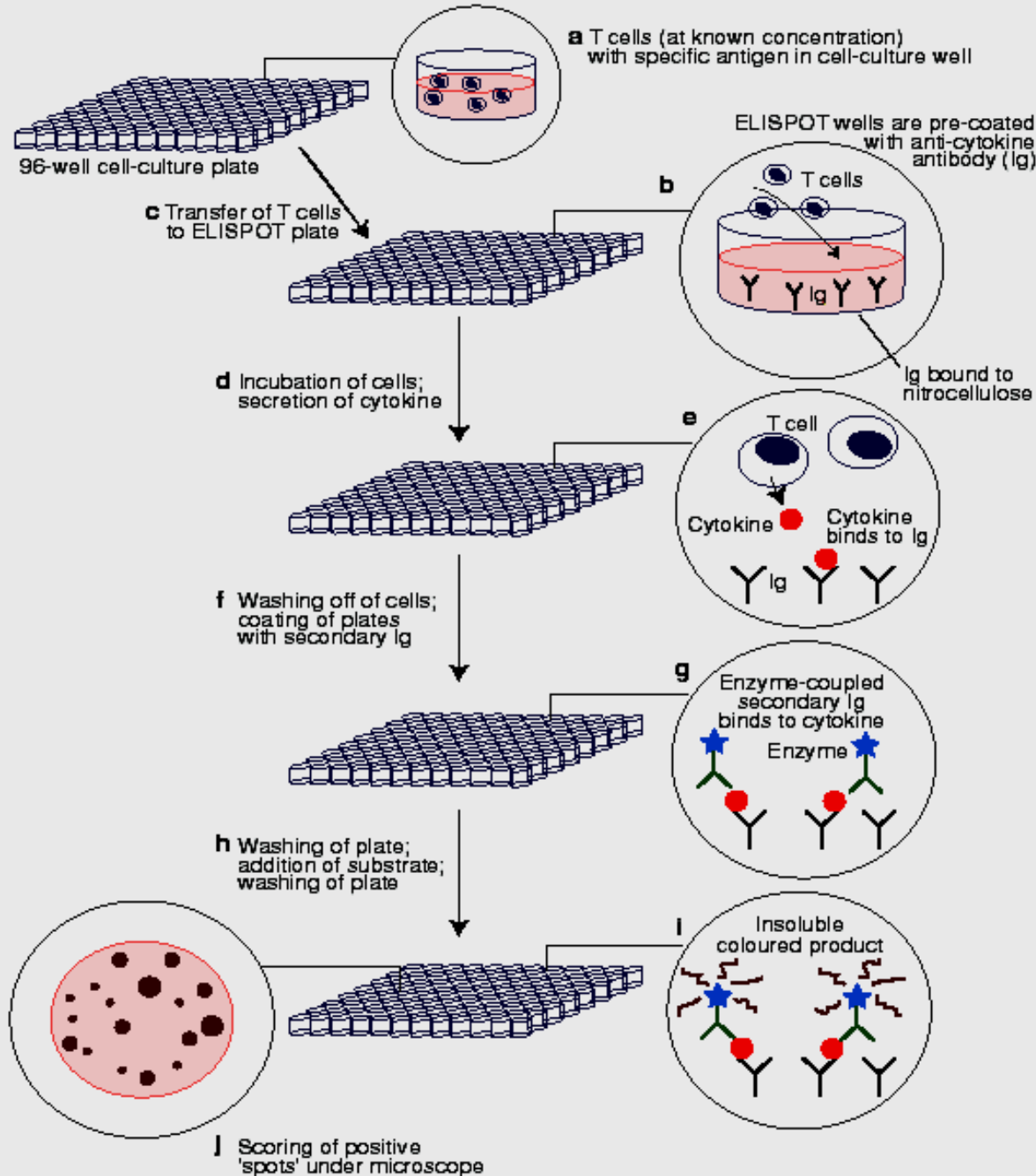
Jurkat – lidské leukemické buňky produkující IL-2

HL-60 – lidské buňky odvozené od myeloidních leukemických bñěk

- cesta kterou objeveny mnohé fce cytokinů a růst. faktorů

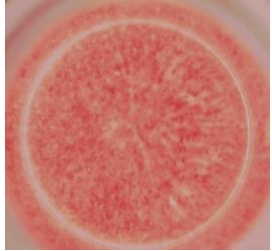
ELISPOT

- patří mezi funkční testy lymfocytů
- slouží ke sledování produkce specifických protilátek
- B-lymfocyty nebo produkce cytokinů T- a B-lymfocyty



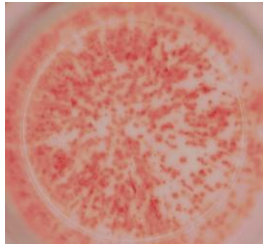
ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

ELISPOT

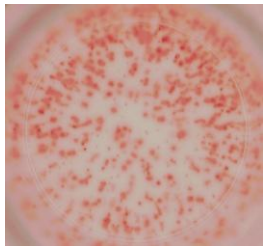
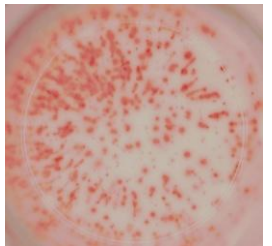


5×10^5

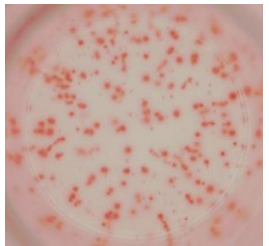
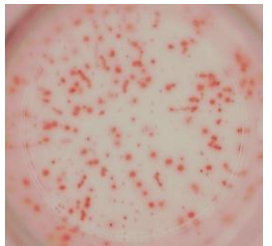
7 dní po očkování



$2,5 \times 10^5$



$1,25 \times 10^5$



$0,63 \times 10^5$

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 - thymus se nevyvíjí normálně (úplně/redukce), 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 γ C deficit	-	+	-	XL
JAK3 deficit	-	+	-	AR
IL-7R α 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