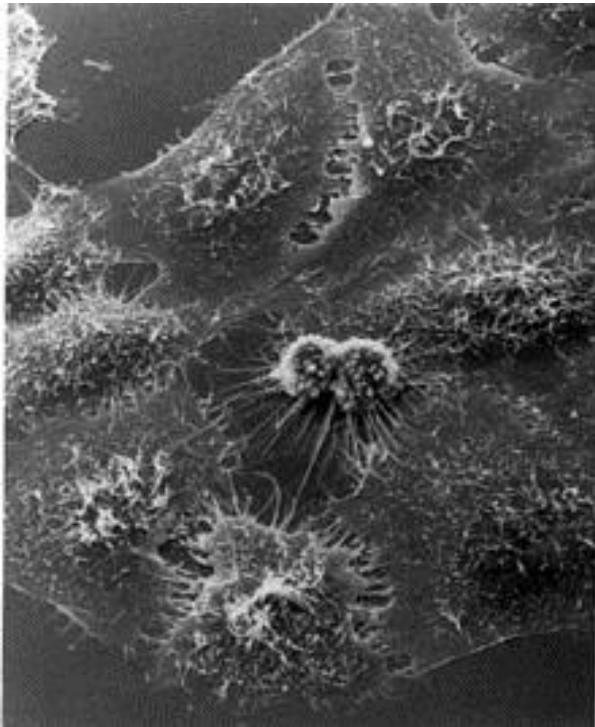


Izolácie buniek a funkčné testy lymfocytov



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

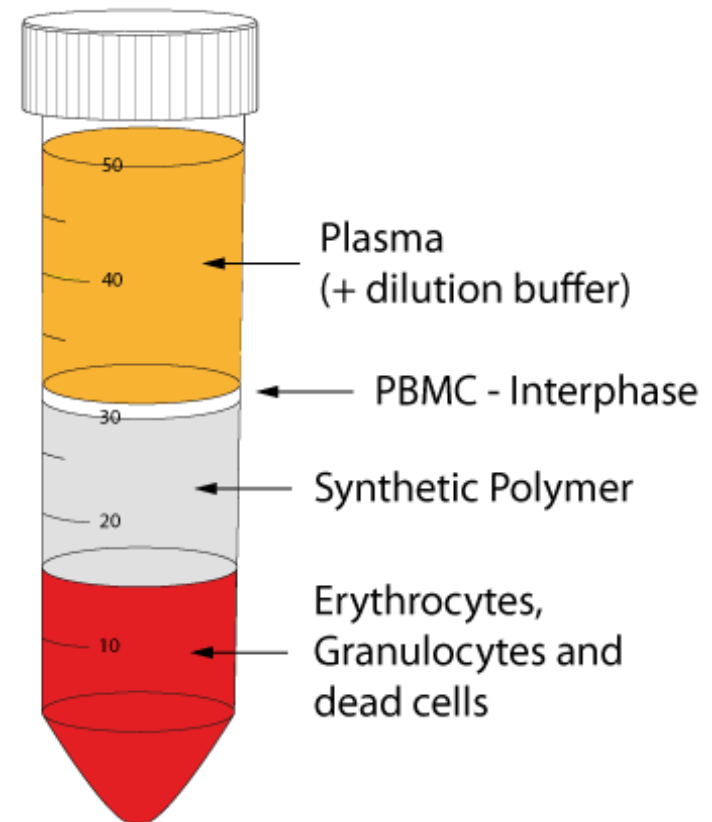
Izolácia PBMC

PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells = lymfocyty+monocyty

- Izolácia PBMC pomocou gradientovej centrifugácie

Krv sa navrství na separačné médium

Pri centrifugácii sa oddelia jednotlivé vrstvy na základe odlišnej vznášivej hustoty – hore je plazma, medzi plazmou a médiom je vrstva PBMC, na dno klesnú erytrocyty a granulocyty



Izolácia PBMC

- Odoberie sa plazma
- Naberie sa vrstva PBMC pozorovateľná ako biely prstenec na rozhraní plazmy a média
- PBMC sa premyje v PBS (opakované stočenie, odliatie supernatantu, rozsuspendovanie peletu v PBS)
- Získavame koncentrovanú suspenziu mononukleárov



Ďalšie typy izolácií buniek

- **IMUNOMAGNETICKÁ SELEKCIA**
 - Využíva magnetické guľičky s naviazanou monoklonálnou protilátkou proti určitému CD znaku hľadaného typu buniek
 - Bunky sa naviažu na tieto guľičky a sú silným magnetom prichytené k stene skúmavky, ostatné bunky sa odmyjú (pozitívna selekcia)
 - Postup je možné využiť aj obrátene – zbaviť sa určitého typu buniek a získať všetky ostatné (negatívna selekcia)
- **FACS CELL SORTER-** modifikácie prietokového cytometra



Funkčné testy lymfocytov

- test PROLIFERÁCIE lymfocytov – sleduje sa schopnosť delenia lymfocytov po stimulácii

Definícia: nárast počtu buniek ako výsledok bunečného rastu a bunečného delenia

- bujnenie, novo-tvorenie, rast
- lat. *prolifero* prinášať potomstvo: *proles* deti; *fero* niesť
- dve významné úlohy (role)
 - embryonálny vývoj
 - dospelé telo (napr. krvotvorba, obnova tkanív)
- typy: symetricky, asymetricky, **diferenciačné delenie**

Kedy indikovať test proliferácie???

- podozrenie na SCID
- vývoj ochorenia – zástava proliferácie?
- odpoveď na liečbu (farmaceutika)

SCID

Severe Combined Immunodeficiency

- skupina ochorení, ktoré vykazujú poruchu vo vývoji lymfoidnej rady – niekedy iba porucha vývoja T-lymf., niekedy kombinácia s B-lymf. a s NK bunkami (záleží na genetickej poruche)
- klinické prejavy - thymus se nevyvíja normálne (úplne/redukcia), veľmi nízke počty cirkulujúcich lymfocytov (lymfopénia) a T-lymfocytov
- lymfocyty nereagujú na stimuláciu mitogénmi – tzn. nemôžu proliferovať v odpovedi na antigény (myeloidná a eryteroidná rada je v počtoch a funkcii neovplyvnená)

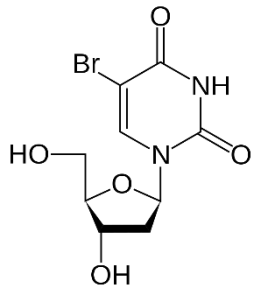
SCID

- existuje asi 7 variant, ktoré sú AR, jedna X viazaná
- väčšinou ide o defekt v gama reťazci IL-2R (X-viazaná forma), tento reťazec je aj súčasťou receptorov 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

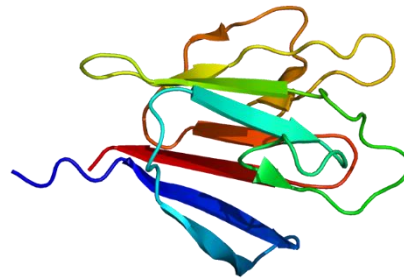
SCID

- Predĺženie života vyhnutím sa kontaktu s potenciálne nebezpečnými patogénmi – musia žiť v sterilním prostredí!!!
- Musia sa vyhýbať kontaktu s ľuďmi a nefiltrovaným vzduchom, všetkým s čím prídu tieto deti do styku – vrátane jedla!



Metódy

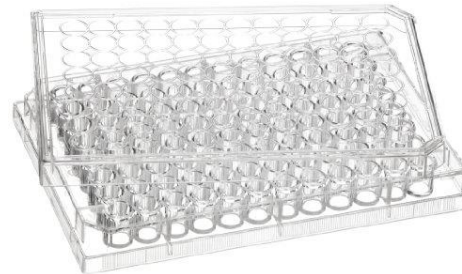
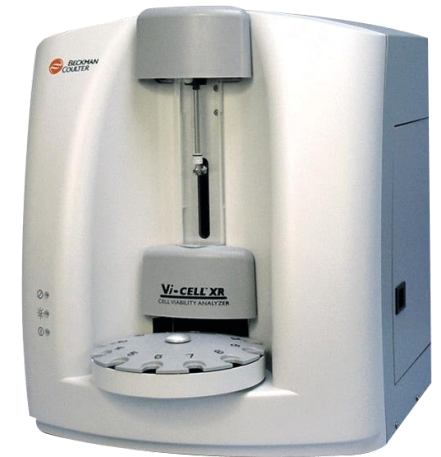
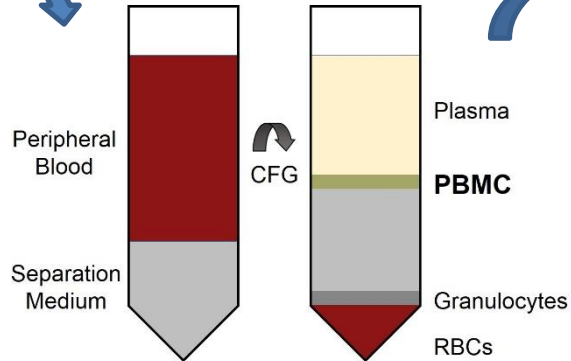
- Proliferačný set DELFIA (BrDU)
- Detekcia proteínu Ki-67



Metódy

- Detekcia novo syntetizovanej DNA pomocou **thymidínu** značeného radioaktívne (**trícium**)-meranie na beta-counteru
- Cytometrická detekcia pomocou fluorescenčného farbiva **CFSE** (karboxyfluoresceinsukcinimidylester), ktoré sa viaže nešpecificky na rôzne štruktúry v bunkách, sleduje sa nárast fluorescencie po delení buniek

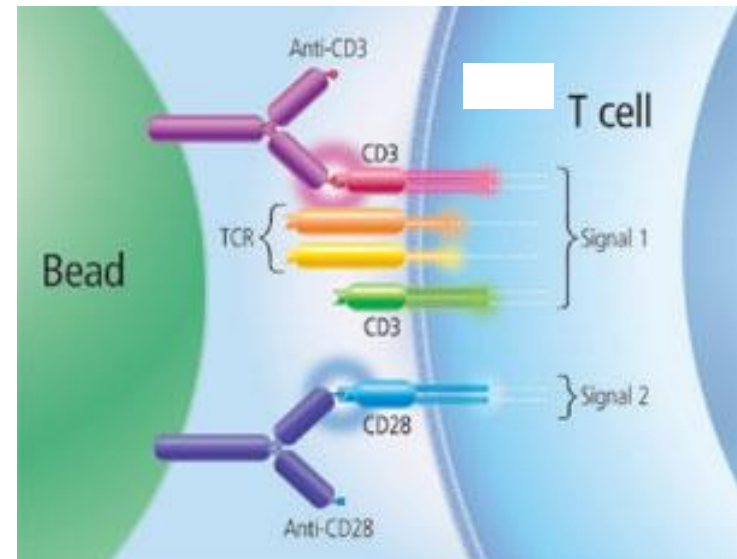
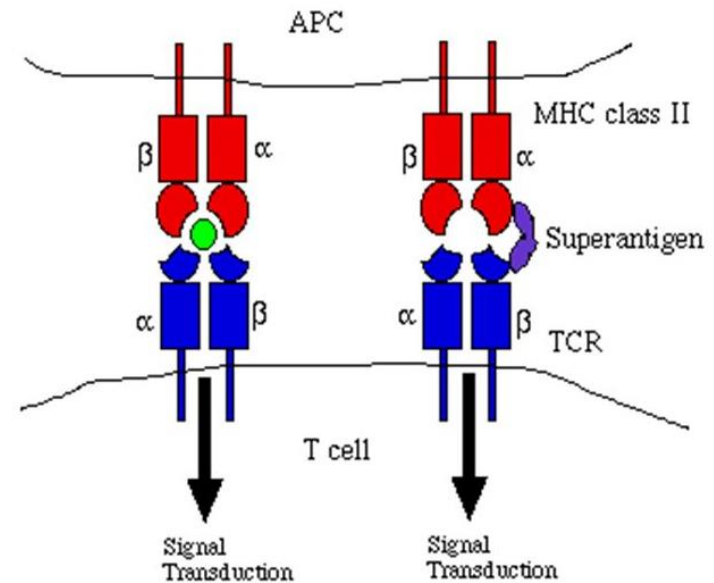
Príprava vzorky



• cca 2,5 hod

Stimulancia

- rastlinné - PHA (phytohaemagglutinin), ConA (Concanavalin A)
- monoklonálne protilátky proti receptorom a koreceptorom (anti-CD3,+ anti-CD28)
- bakteriálne antigény – tetanický toxoid

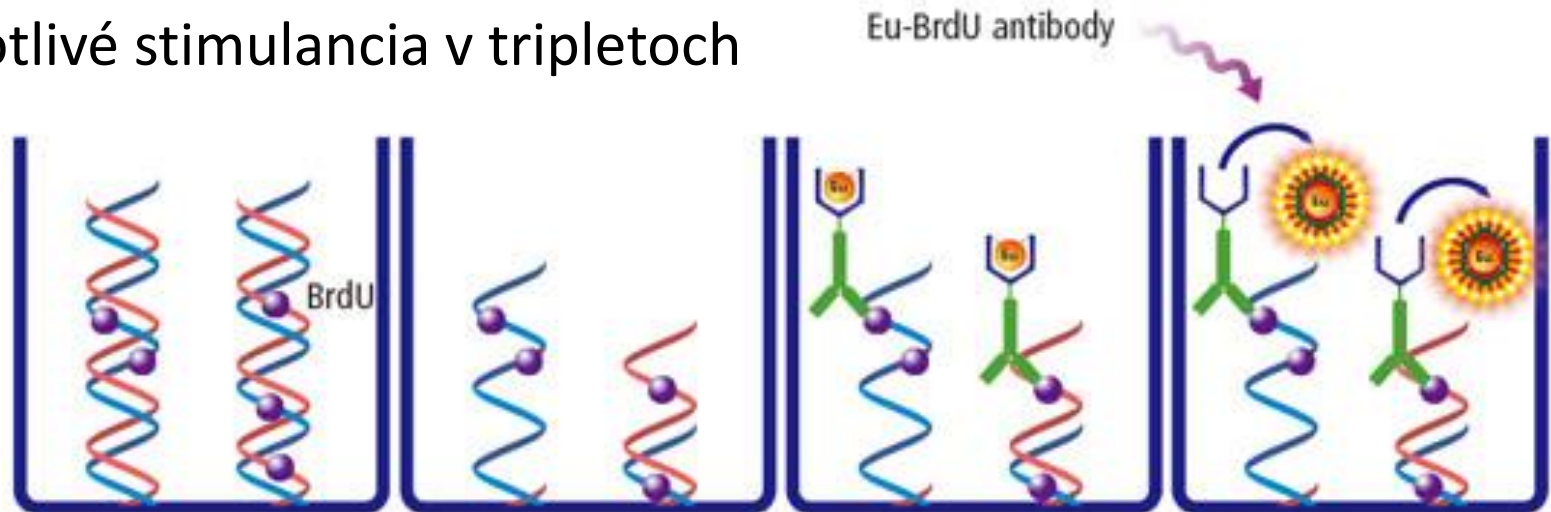


Kultivácia lymfocytov in vitro

- Pestovanie prebieha v definovanom bazálnom médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ ATB – penicilín, streptomycín) pri 37°C, 5% CO₂, 95% vlhkosť
- Normálne bunky majú obmedzenú dĺžku života- obmedzený počet delení
- Pomocou karcinogénnych látok alebo vírov (SV40, EBV)môžeme dosiahnuť transformáciu buniek na nesmrteľné a vytvoriť tzv. bunkové línie
 - Jurkat- ľudské leukemické bunky produkúce IL-2
 - HL-60- ľudské bunky odvodené od myeloidných leukemických buniek
- Cesta, ktorou bolo objavených mnoho funkcií cytokínov a rast.faktorov

DELFI (PerkinElmer)

- BrDU- BromoDeoxyUridin
 - analóg Tymidínu
- Eu- Európium
- Detekcia novo syntetizovanej DNA pomocou BrDU, začlení sa do novo vznikajúcej DNA, BrdU je potom detekované pomocou protilátky anti-BrdU značenej Eu
- jednotlivé stimulancia v tripletoch



Výsledok DELFIA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	315	350	430	475	510	400	445	595	470	335	470	485
B	N	2600	2680	2610	1940	1695	1985	465	520	595	465	545
C	CD3	140162	151055	122390	106725	115225	115470	390	510	500	475	510
D	PHA 5	88795	106705	86380	55570	54025	64045	665	470	445	520	440
E	PHA 2	43145	47355	36225	11400	9575	12840	470	425	375	520	605
F	ConA 2,5	61915	66675	55665	78625	58965	99605	525	540	525	570	555
G	ConA 1	30045	30015	29490	39655	43855	44170	490	375	450		
H		425	495	475	345	545	530	495	535	365		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	295	320	415	270	345	440	405	525	345	265	310	445
B	N	1785	1700	1510	1505	2790	2200	365	425	485	450	525
C	CD3	106520	92780	95990	115415	112115	106790	375	390	475	325	430
D	PHA 5	32295	26035	24970	109190	109035	90855	355	320	380	415	370
E	PHA 2	7185	6475	4490	50205	47085	45965	435	300	345	355	405
F	ConA 2,5	48050	46670	46200	121630	115575	100390	445	390	500	455	450
G	ConA 1	25230	23305	16690	65255	78885	60965	480	425	610	300	370
H		330	455	440	375	385	385	405	500	425	460	450

Cytometrické stanovenie

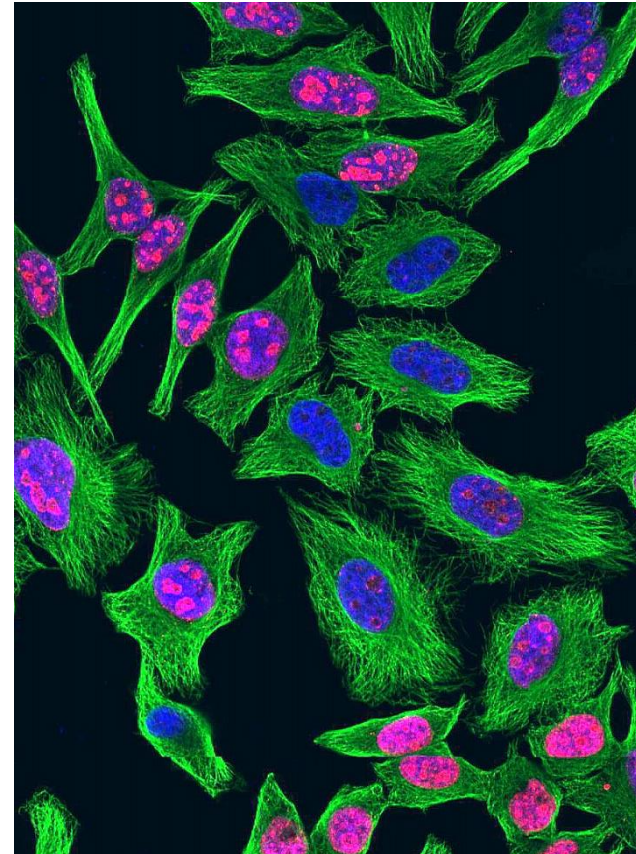
- Ki-67 - jadrový proteín
- asociovaný (možno nevyhnutný) s bunečnou proliferáciou a s transkripciou rRNA
- interfáza- bunečné jadro
- mitóza- povrch chromozómov
- prítomnosť G1, S, G2, mitóza
- absencia G0

HeLa cells

Ki-67 proteín (červená)

tubulín (zelená)

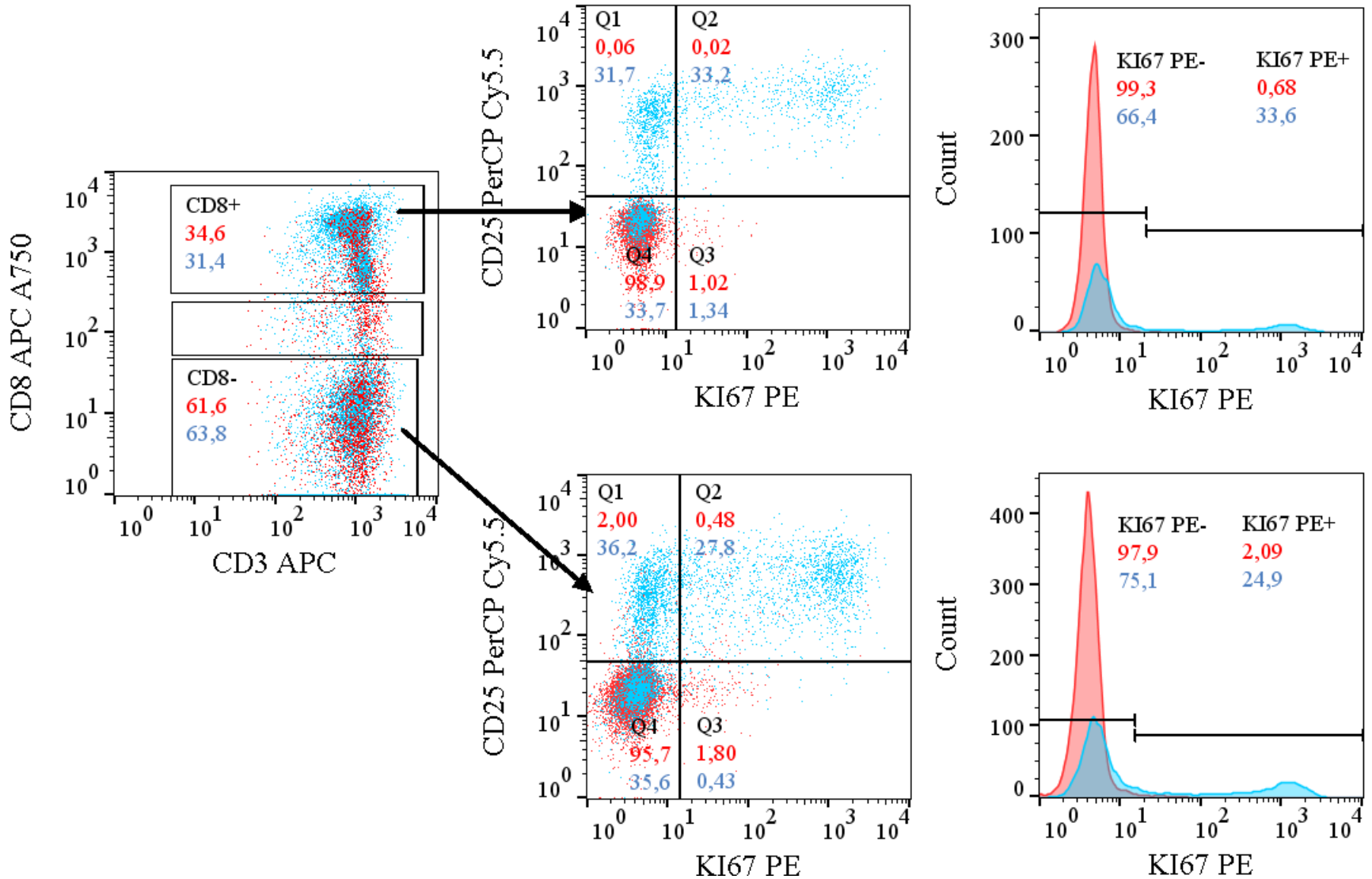
DNA (modrá)



Spracovanie

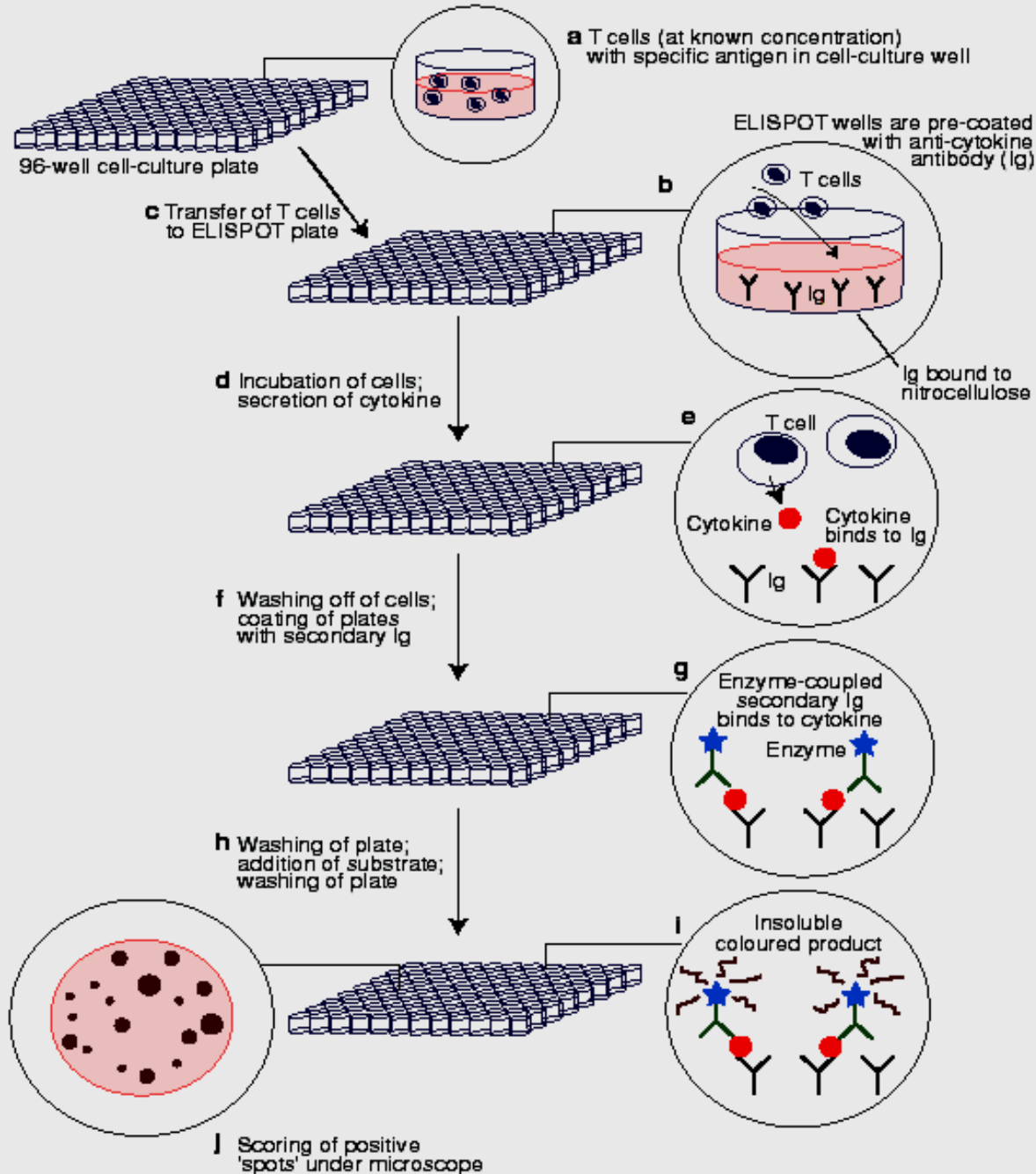
- značenie L/D- 30 min
- extracelulárne značenie (CD25 PerCP Cy5.5, CD8 APC A750)- 30 min
 - CD25- súčasť receptoru pre IL-2 (α reťazec)
- fixácia (paraformaldehyd)- 60 min
- permeabilizácia (metanol?) + intracelulárne značenie (CD3 APC, Ki-67 PE)- 30 min

Patient 1- ↓ expresia Ki-67



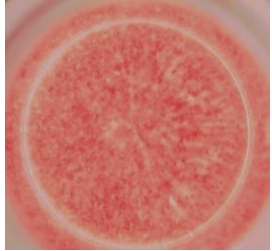
ELISPOT

- patrí medzi funkčné testy lymfocytov
- slúži k sledovaniu produkcie špecifických protilátok B-lymfocytmi alebo produkcie cytokínov T- a B-lymfocytmi



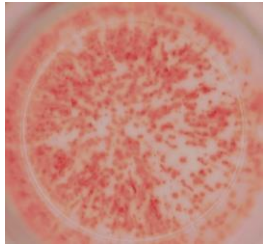
ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

ELISPOT

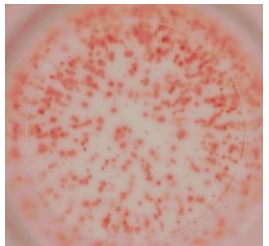
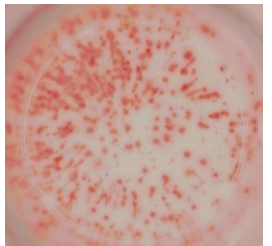


5×10^5

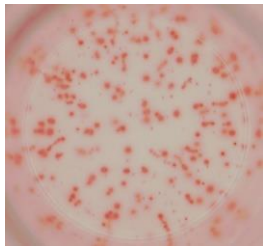
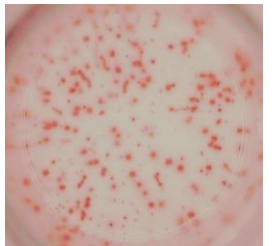
7 dní po očkování



$2,5 \times 10^5$



$1,25 \times 10^5$



$0,63 \times 10^5$