

# Cvičení č. 1

Úvod

Protilátky

Mgr. Julie Štíhová

# ÚKIA

**Alergologie**

Alergická onemocnění

**Imunologie**

Autoimunity, imunodeficiency

**Laboratoř**

**Buněčná část**

**Serologická část**

# Laboratorní vyšetření

- **Fáze preanalytická**
  - Odběr biologického materiálu, transport
- **Fáze analytická**
  - Vlastní laboratorní vyšetření
- **Fáze postanalytická**
  - Skladování, likvidace

# Biologický materiál

- Žilní krev
- Méně často BAL (bronchoalveolární laváž)
- Svoz:
  - V rámci nemocnice – ruční donáška
  - Externí materiál – svoz autem
- Odběry krve – uzavřené odběrové systémy

# Biologický materiál

## Plazma

- Z **nesrážlivé** krve
- EDTA – vyvazuje  $\text{Ca}_{2+}$
- Heparin – anti IIa/Xa aktivita



## Sérum

- Ze **srážlivé** krve
- Zkumavky s gelem – akcelerace koagulace
- Sérum neobsahuje koagulační faktory a fibrinogen



# Biologický materiál

EDTA



Vyšetření  
lymfocytárních  
subpopulací

HEPARIN



Funkční testy  
leukocytů

SERUM-GEL

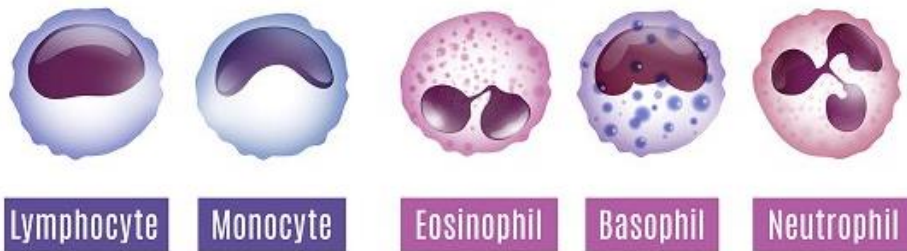


IgE, komplement,  
autoproti látky, atd.

# Rozdělení imunologických laboratorních metod

## Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



- Absolutní a relativní počty
- Funkční vlastnosti

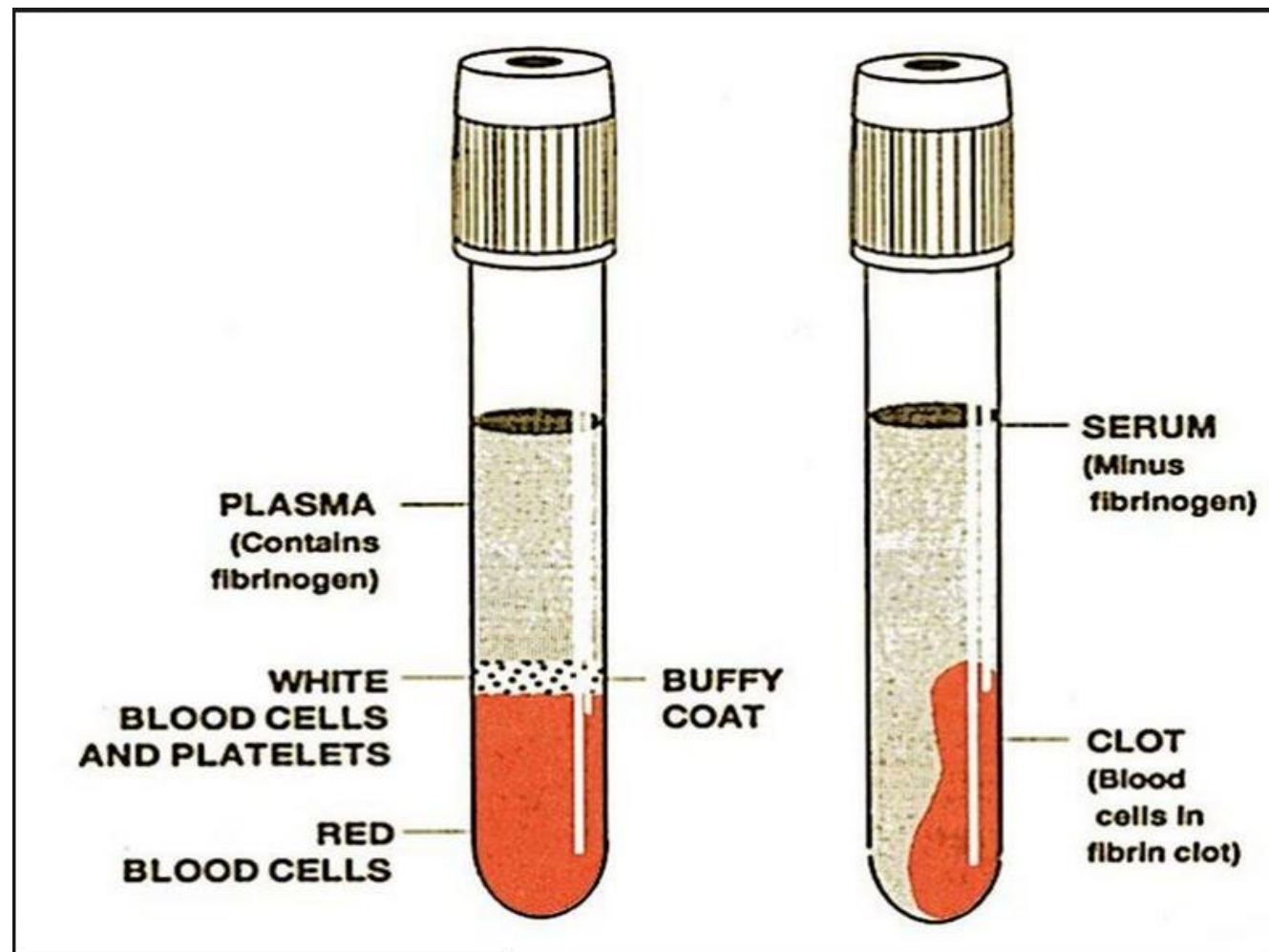
## Serologická laboratoř

Stanovení proteinů v séru

- Autoprotilátky
- Imunoglobuliny
- Proteiny akutní fáze
- Komplement
- Specifické IgE a další ...

# Separace

- Centrifugy
- 2000 otáček/min, 10 min





# Protilátky

Chemické složení: glykoproteiny

Význam pro obratlovce:

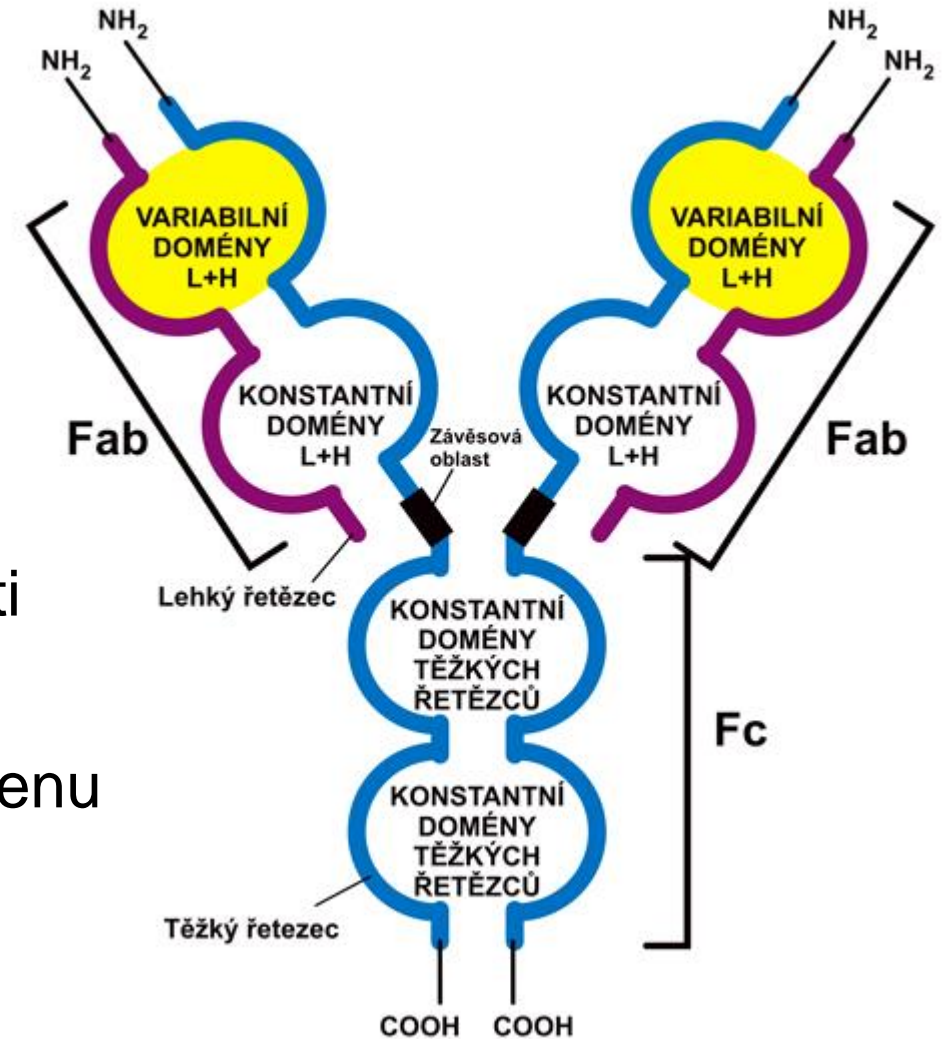
- Humorální složka adaptivní imunity
- Ochrana před extracelulárními patogeny

Význam pro medicínu:

- Reakce protilátky s antigenem je základem mnohých laboratorních testů
- Biologická léčba

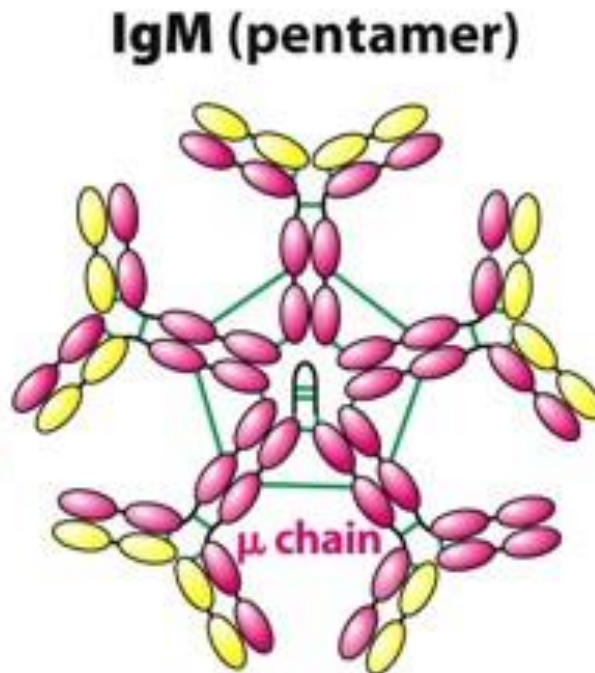
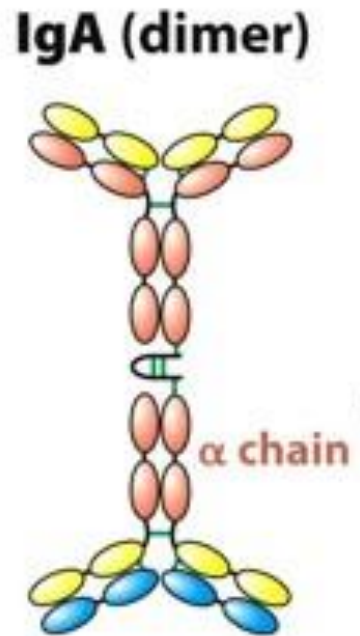
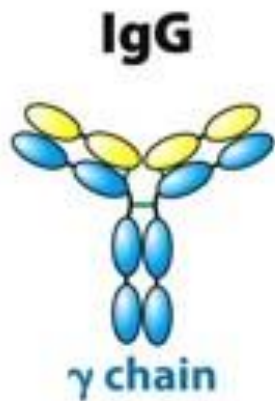
# Struktura protilátky

- 2 těžké (H) + 2 lehké řetězce (L)
- Spojení – kovalentní disulfidické můstky
- Pantová oblast - flexibilita
- L řetězec – 1 variabilní + 1 konstantní oblast
- H řetězec – 1 variabilní + 3-4 konstantní oblasti
- Fab fragment – variabilní oblasti – vazba antigenu
- Fc fragment – efektorová funkce



# Třídy protilátek

- 5 tříd – podle typu těžkého řetězce



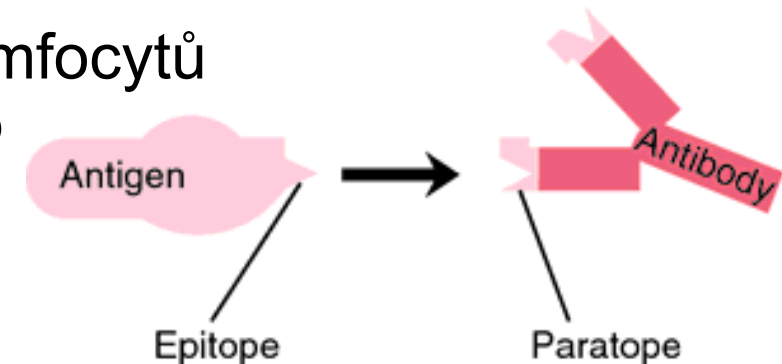
# Principy reakce antigen-protilátka

- Antigen

- Látka schopná vyvolat tvorbu protilátek
- Konkrétní místo na jeho povrchu, kam se váže protilátka – **EPITOP**

- Protilátka

- Specifický produkt terminálních vývojových stádií B lymfocytů
- Místo, které reaguje s epitopem antigenu – **PARATOP**



- Vazba Ag-Ab je reverzibilní – slabé ne vazebné interakce

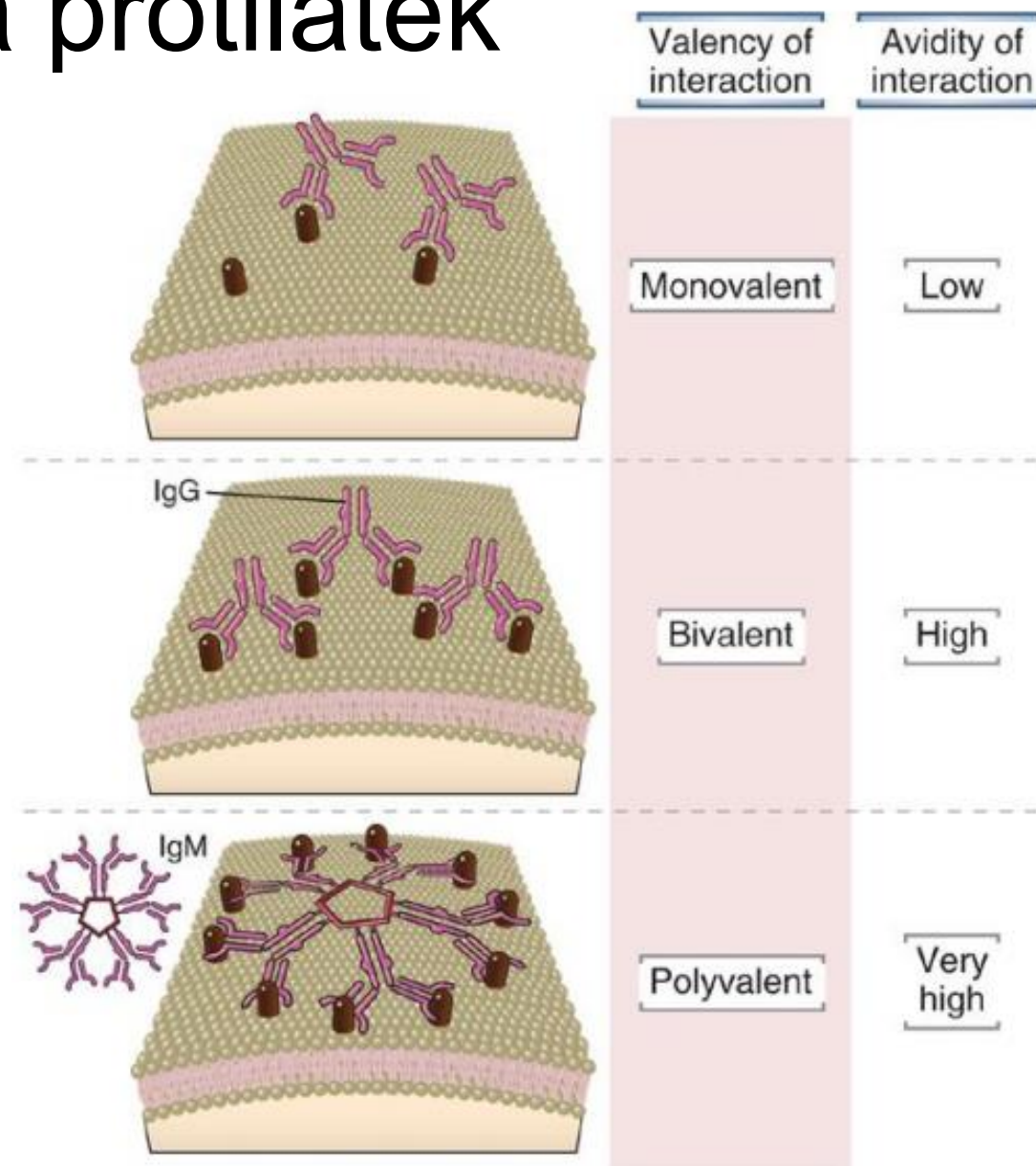
# Afinita vs avidita protilátek

- **Afinita**

- síla interakce mezi 1 epitopem Ab a 1 paratopem Ag

- **Avidita**

- je dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentním antigenem a protilátkou
- IgG – 2 vazebná místa
- Sekreční IgA – 4 vazebná místa
- Pentamer IgM – až 10 míst

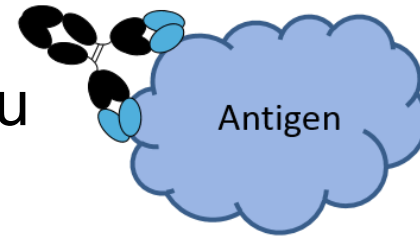


# Protilátky mohou být

- Monoklonální

- Produkty jediného klonu B lymfocytů
- namířeny proti 1 epitopu jediného antigenu
- Velmi vysoká specifita

Monoclonal antibody



- Polyklonální

- Namířeny proti více epitopům jednoho či více antigenů
- Pokud byl při imunizaci použit 1 antigen – vzniká monospecifické antisérum
- Pokud bylo při imunizaci použito antigenů více – polyspecifické antisérum

Polyclonal antibody





# Výroba polyklonálních protilátek

# Výroba polyklonálních protilátek

## 1. Výběr vhodného antigenu

- Nutná vysoká čistota – přečištění chromatografie, ELFO

## 2. Zvýšení afinity antigenu k buňkám imunitního systému

- Problém – solubilní antigeny špatně aktivují imunitní systém
- ADJUVANCIA – zvyšují imunogennost a udržují antigen déle v těle
  - soli  $\text{Al}_2\text{O}_3$
  - Freudovo adjuvans – adsorpce antigenu na kapičky minerálního oleje (s/bez přídavku usmrcených mykobakterií)



# Výroba polyklonálních protilátek

## 3. Výběr vhodného zvířete

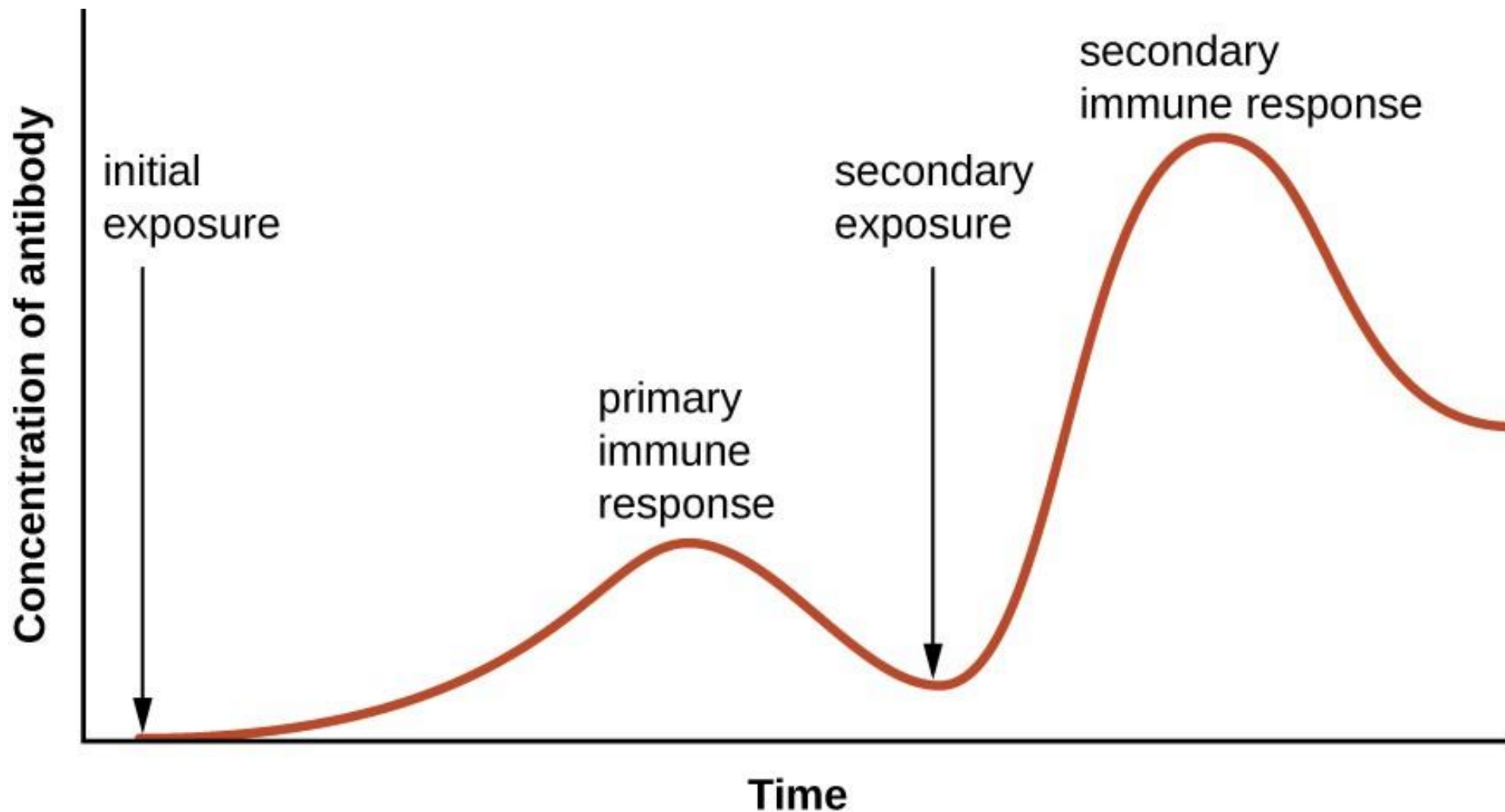
- Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu



## 4. Způsob aplikace – nejčastěji intradermálně, subkutánně

- Antigen je vychytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

# Výroba polyklonálních protilátek



# Výroba polyklonálních protilátek

## 5. Sběr krve

- Opakované odběry nižšího množství krve
- Kompletní vykrvení zvířete - usmrcení

## 6. Zisk séra s obsahem protilátek

## 7. Přechištění protilátek a jejich kvantifikace

- Nespecifické metody – izolace protilátek určité třídy
  - Precipitace síranem amonným, elektroforéza, ionexová nebo gelová chromatografie
- Specifické metody – izolace protilátek vůči konkrétnímu antigenu
  - Afinitní chromatografie, imunoadsorpce

# Polyklonální protilátky - využití

## Nefelometrie

- Reakce Ag-Ab → precipitace
- Třídy a podtřídy Ig, C3, C4, CRP

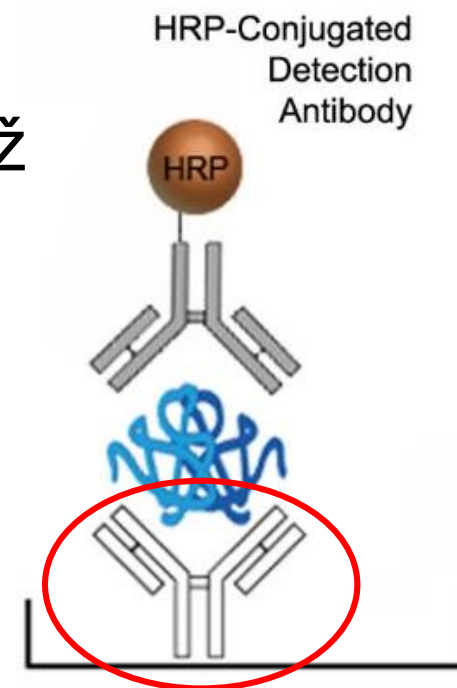
## Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



## ELISA

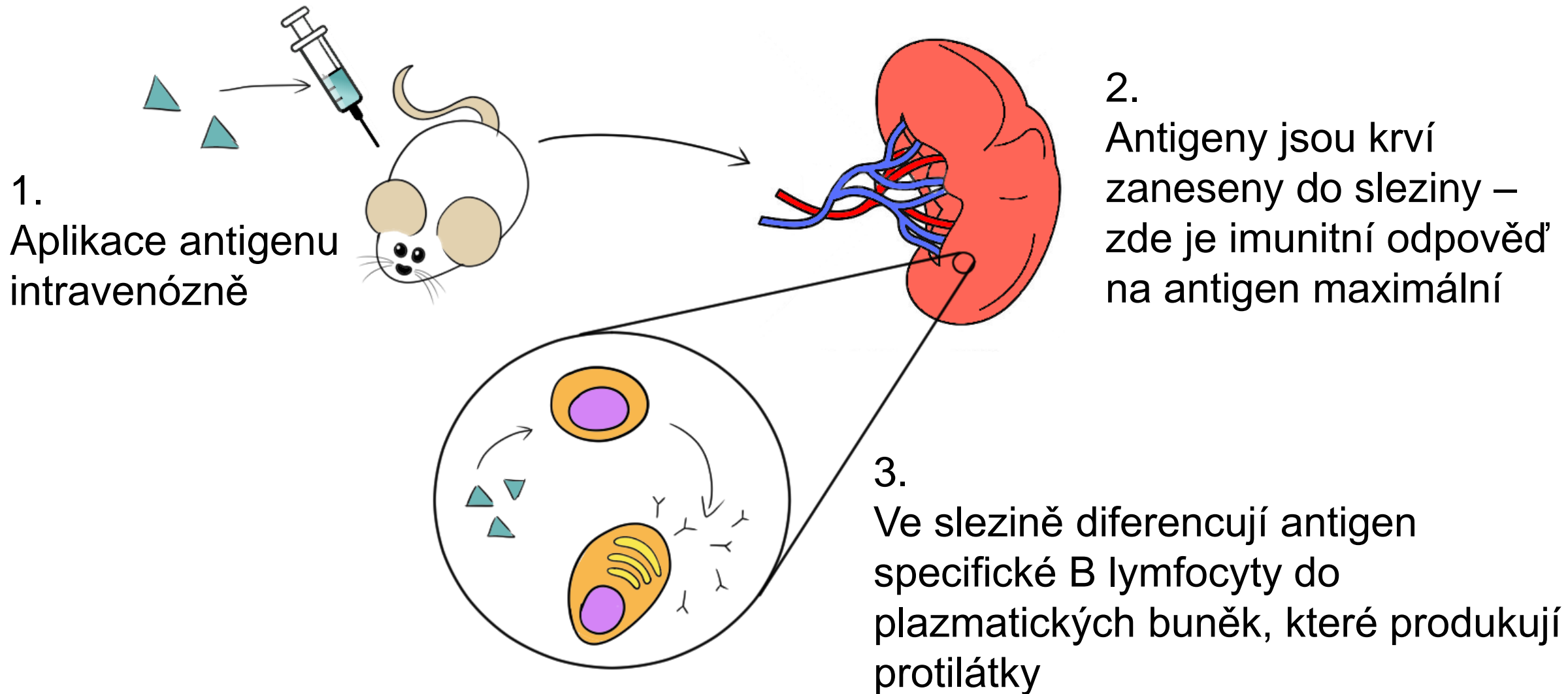
- Záchytné protilátky
- Záchyt různých variant antigenu
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita



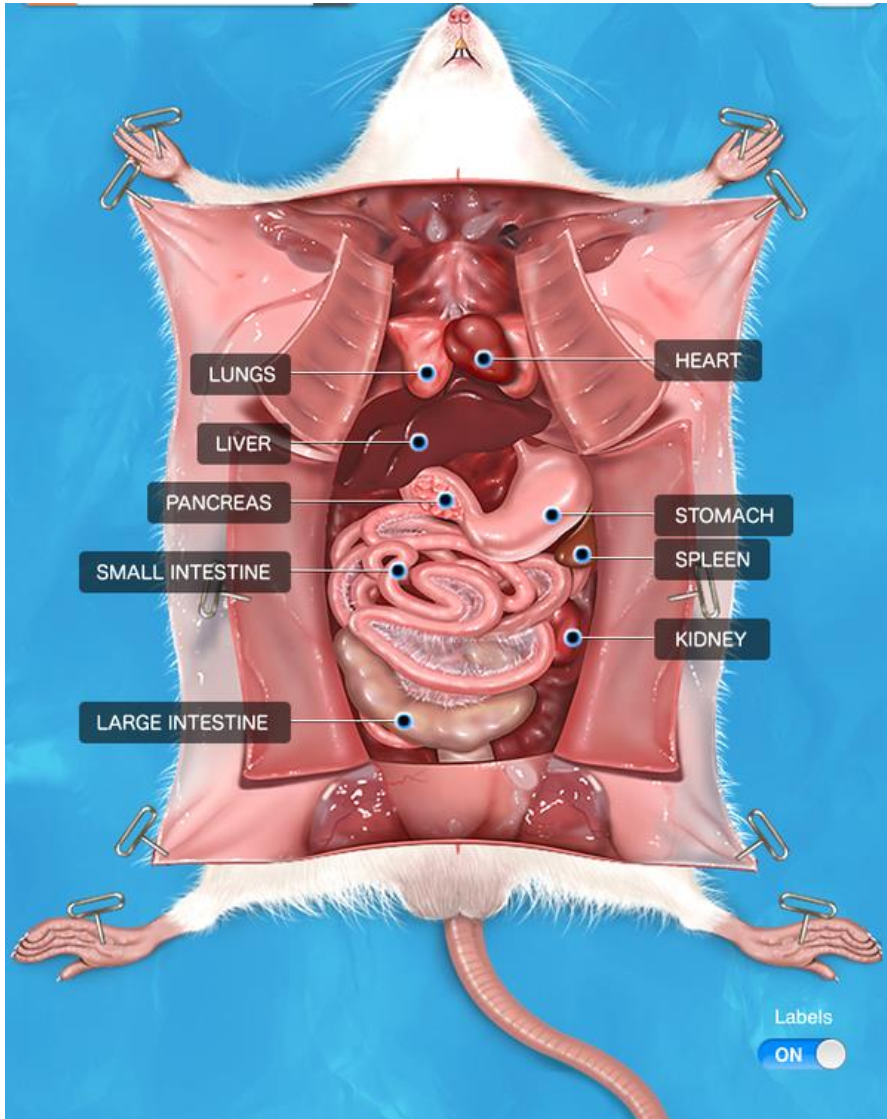


# Výroba monoklonálních protilátek

# Výroba monoklonálních protilátek



# Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



# Výroba monoklonálních protilátek

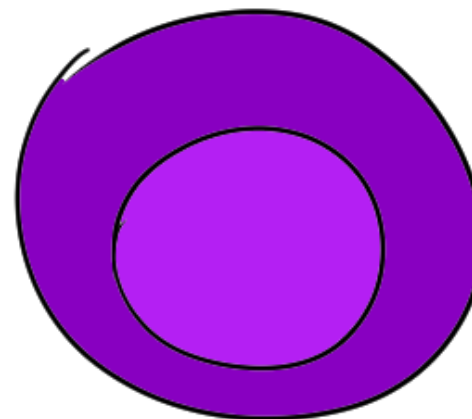
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická  
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka



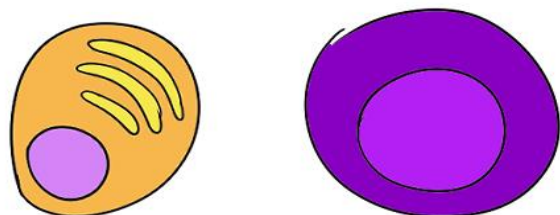
- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

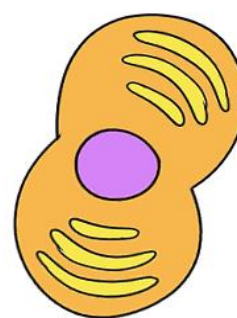


# Výroba monoklonálních protilátek

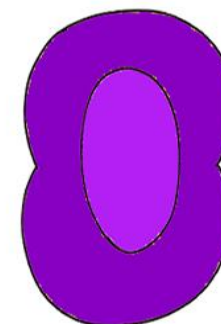
Nezfúzované B lymfocyty  
a myelomové buňky



Zfúzované  
B lymfocyty



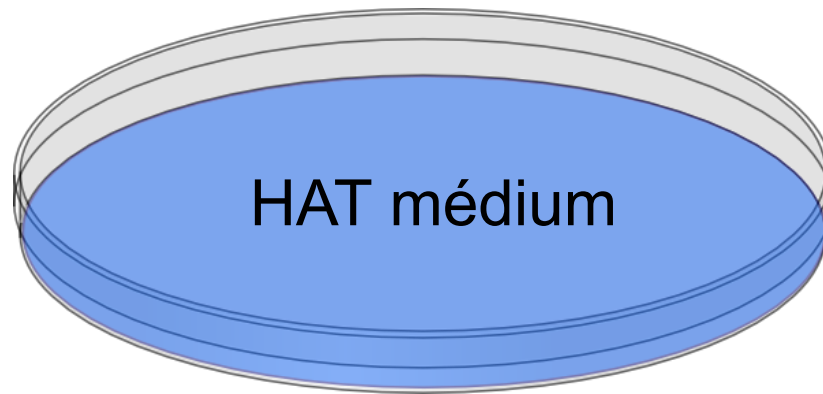
Zfúzované myelomové  
buňky



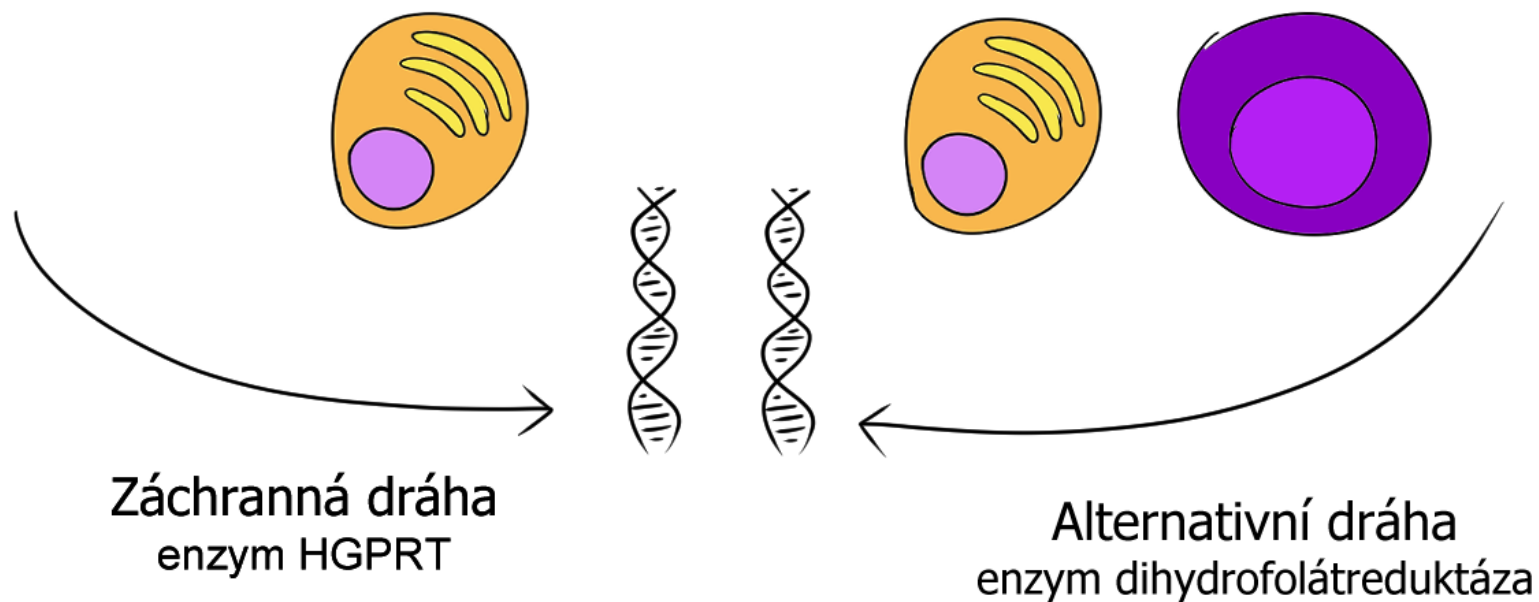
HYBRIDOM



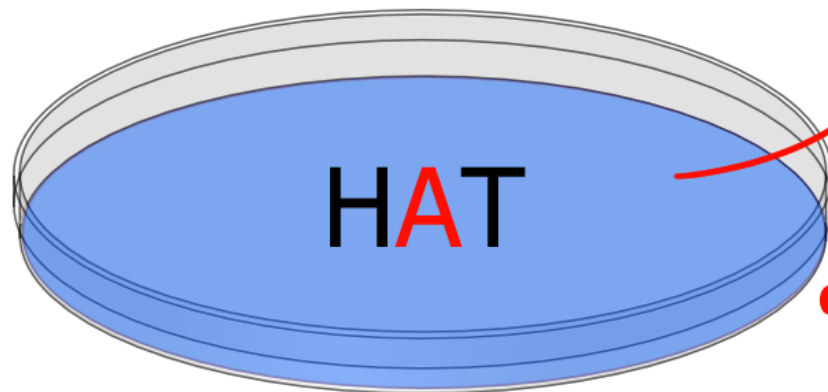
7. Buněčná směs je  
kultivována v selekčním  
HAT médiu  
(Hypoxantin, Adenosin,  
Thymidin)



# Selekce – enzymatický blok

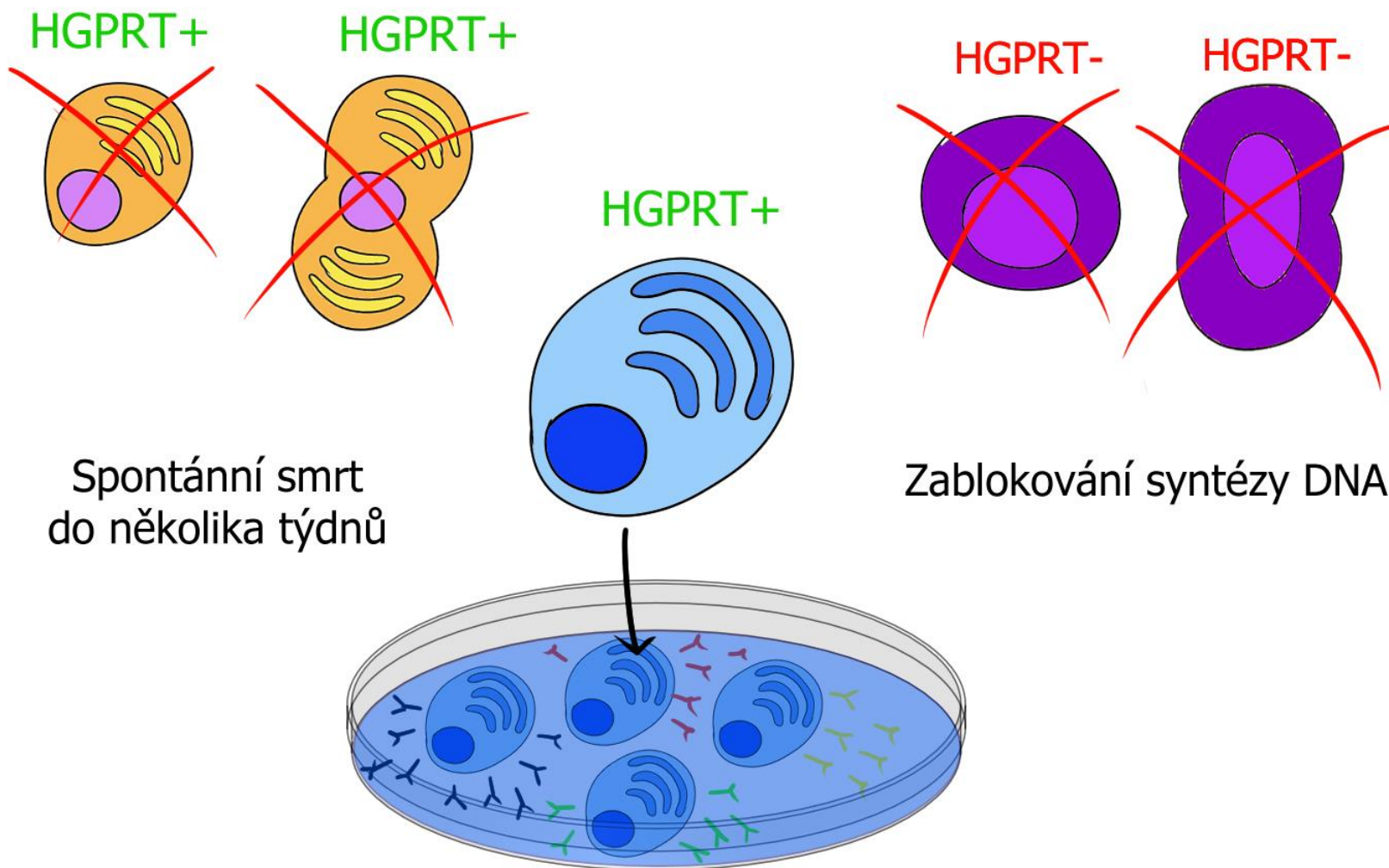


HGPRT = Hypoxantin Guanin  
FosfoRibosyl Transferáza



**Aminopterin  
blokuje  
dihydrofolátreduktázu**

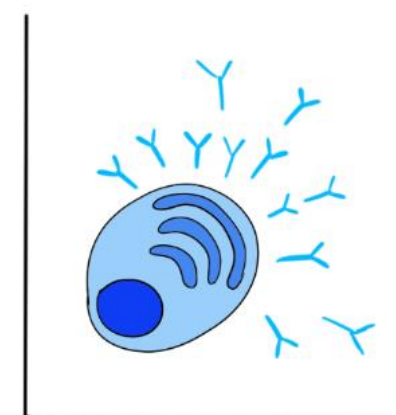
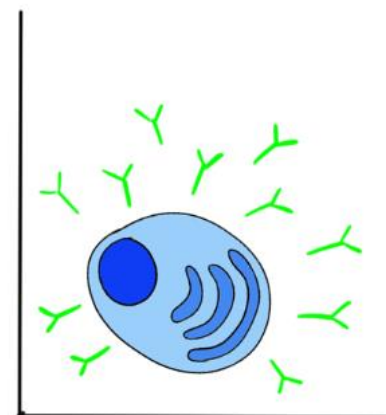
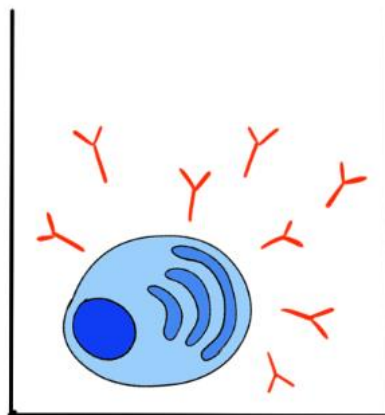
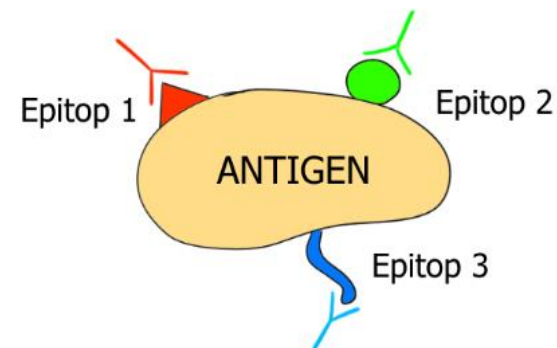
# Selekce – enzymatický blok



# Výroba monoklonálních protilátek

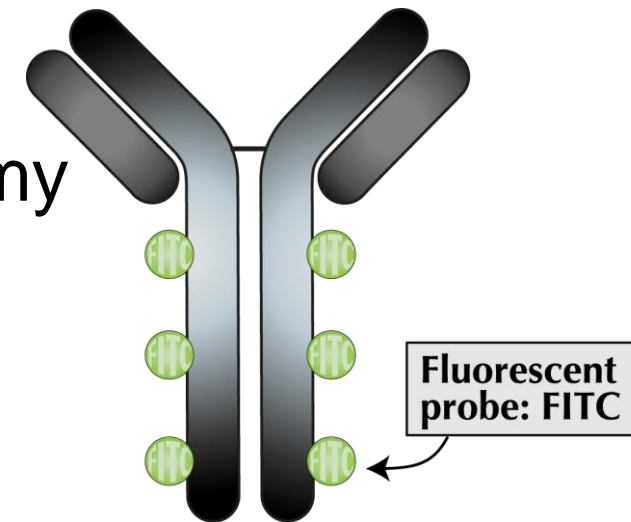
- Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek
- Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

10. Přechištění, kvantifikace, validace



# Využití monoklonálních protilátek

- Konjugace monoklonálních protilátek s fluorochromy
- Základní reagensie pro imunofenotypizaci



## IMUNOFENOTYPIZACE

„stanovení fenotypu buněk na základě imunologické detekce jejich povrchových znaků (markerů) pomocí průtokové cytometrie“

- CD nomenklatura → CD znaky na buňkách
- Některé jsou pro určité typy buněk vysoce specifické
- Detekce pomocí fluorescenčně značených protilátek

# Využití monoklonálních protilátek

Příklady využití konjugátů protilátka-fluorochrom jako diagnostik v laboratoři:

- Rozlišení T a B lymfocytárních subpopulací
- Rozlišení klidových a aktivovaných forem leukocytů
- Rozlišení časně/pozdní aktivace buněk
- Rozlišení vývojových stádií buněk
- Proliferace
- Apoptóza
- Imunofenotypizace malignit

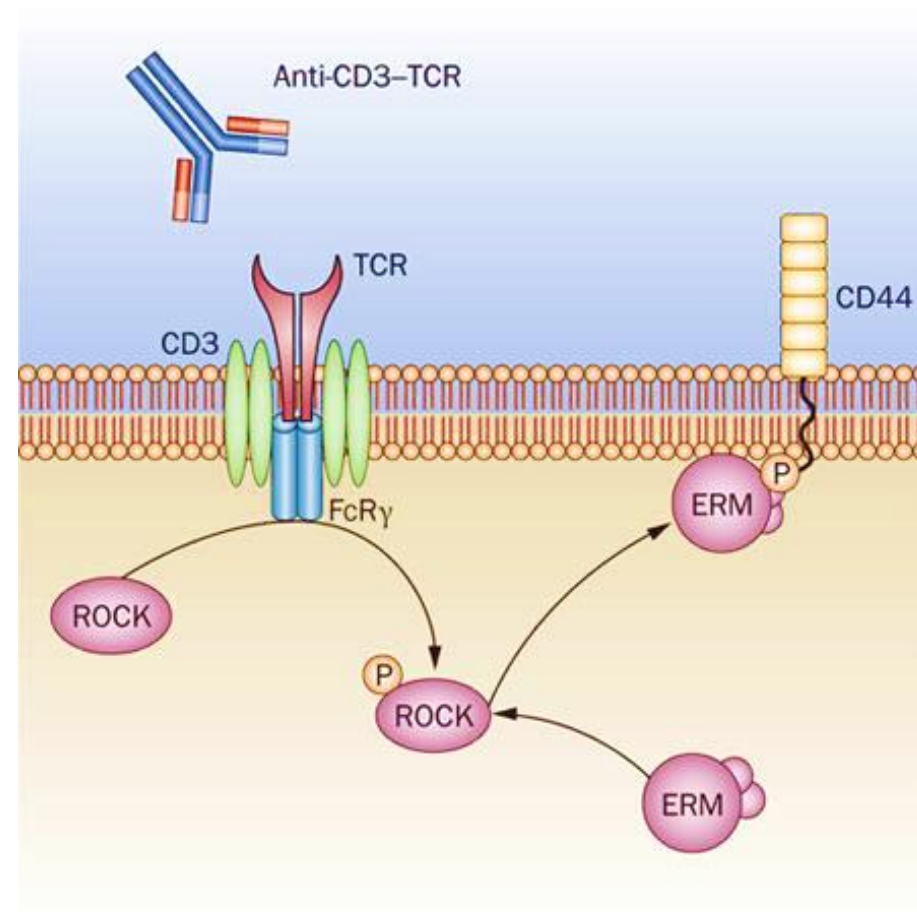
# Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

Příklad:

- Anti CD3 – váže se na CD3 ko-receptor T lymfocytů a aktivuje je →

- Produkce cytokinů – INF- $\gamma$ , IL-2
- Proliferace

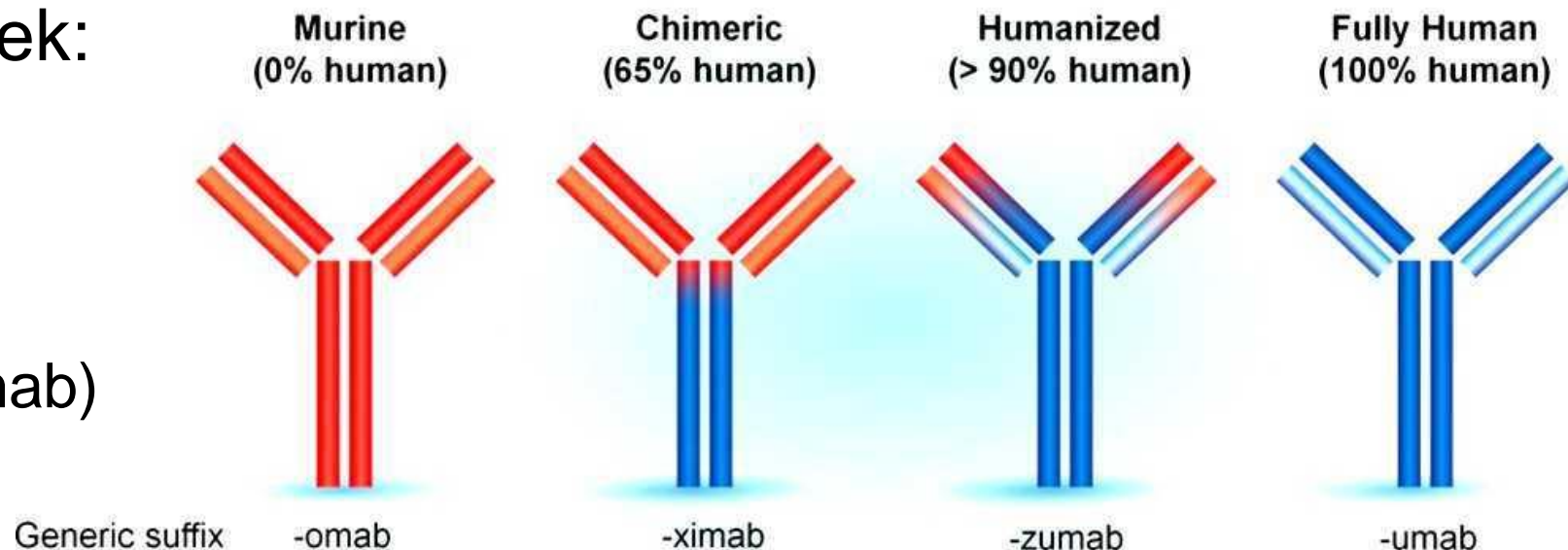


# Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

- Myší (omab)
- Chimérické (ximab)
- Humanizované (zumab)
- Lidské (umab)



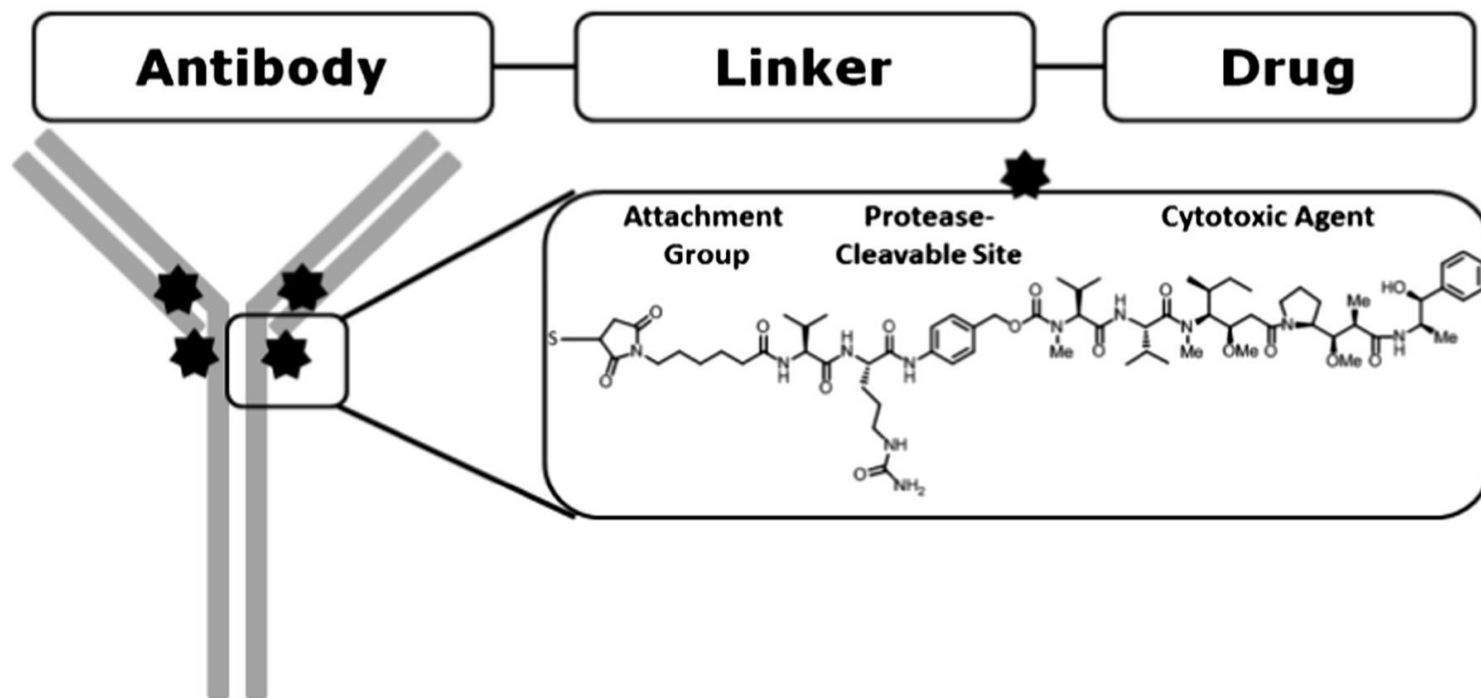
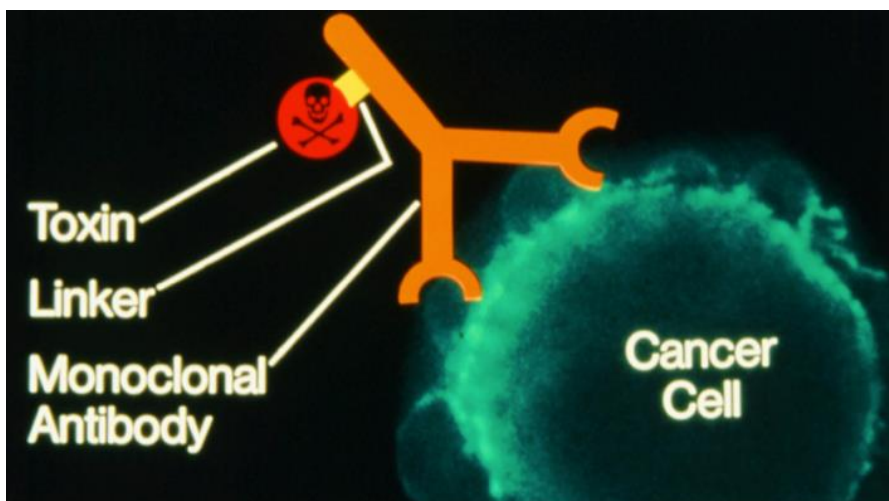


# Využití monoklonálních protilátek

- Imunosuprese
  - Anti CD20 (Rituximab): B lymfocytární malignity
- Blokáda prozánětlivých cytokinů
  - Anti TNF- $\alpha$  (Infliximab): léčba Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy
- Blokáda adhezivních molekul
  - Anti CD11a (Efalizumab): léčba lupénky
- Protialergická léčba
  - Anti-IgE (Omalizumab): léčba těžkých forem astmatu

# Využití monoklonálních protilátek

- Nová generace monoklonálních protilátek určených k biologické léčbě: konjugace s cytostatiky
- Zesílení cytotoxického účinku na maligní buňky



# Shrnutí

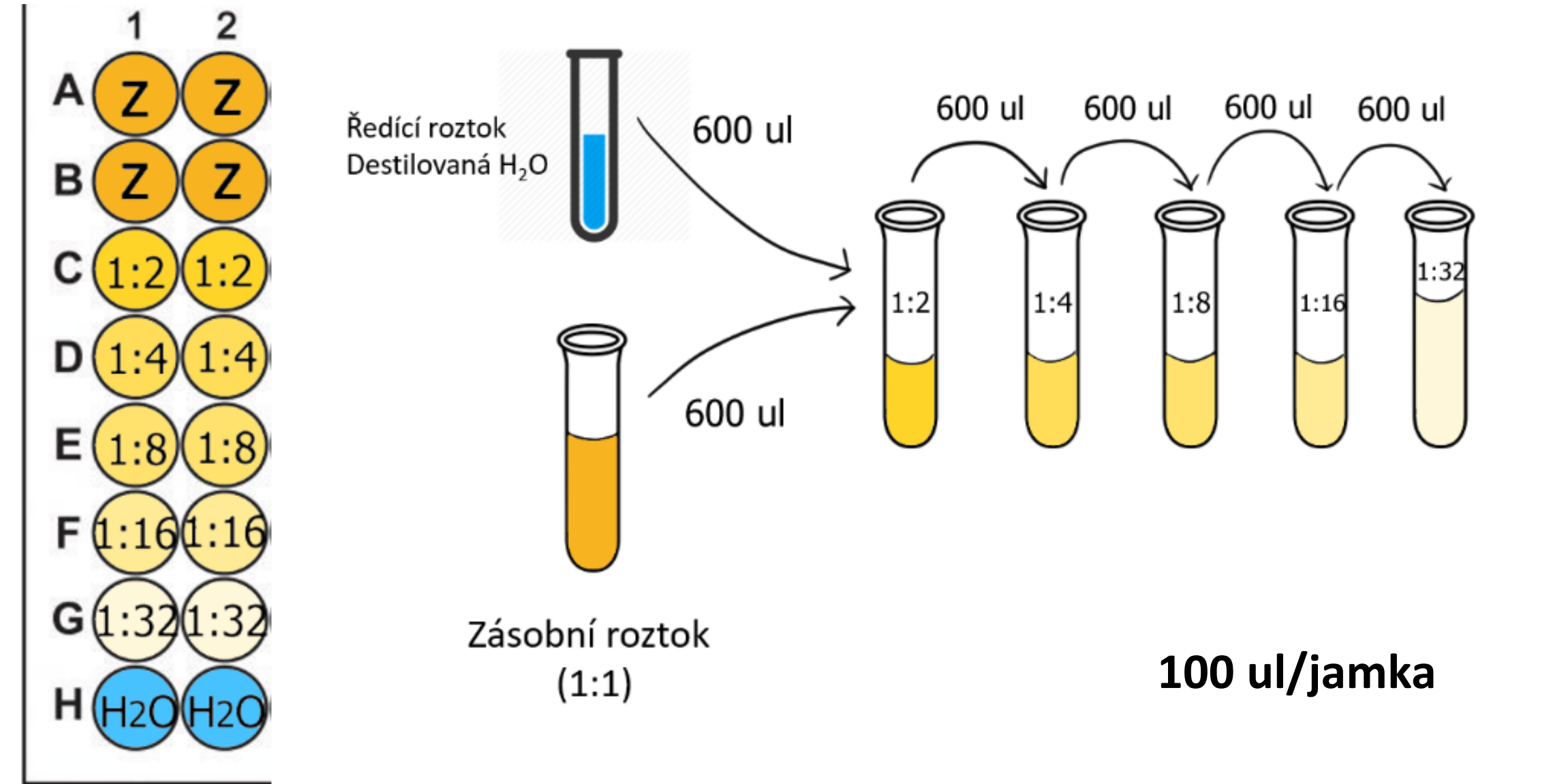
Polyklonální protilátky	Monoklonální protilátky
Snadnější výroba	Náročná výroba
Relativně levné	Drahé
Vyšší senzitivita	Nižší senzitivita
Nižší specifita	Vysoká specifita
Vyšší pravděpodobnost zkřížené reaktivity	Nízká pravděpodobnost zkřížené reaktivity

# Praktické cvičení č. 1

Úkol č. 1 Ředění geometrickou řadou

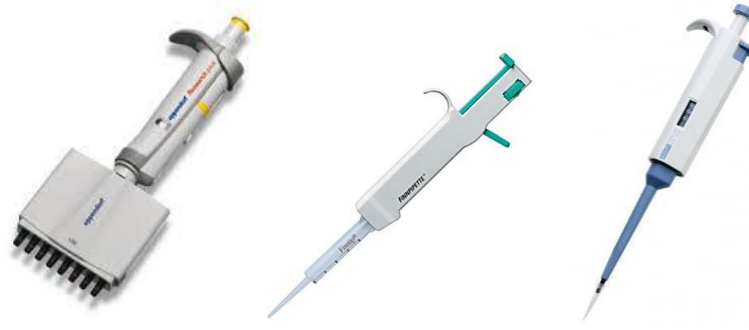
Úkol č. 2 Přesnost pipetování

# Úkol č. 1 Ředění geometrickou řadou



# Úkol č. 2 Pipetování

- 8 kanálová pipeta
- Stepper
- 1 kanálová pipeta



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Copyright © 2009 Edita Aksamitiene

Roztok: ředění 1:2

**100 ul/jamka**

# Protokol

- Hlavička:

- Jméno
- Datum
- Úloha č. ...
- Název úlohy

- Protokol:

- Princip
  - Pomůcky
  - Postup
  - Výsledky
  - Závěr
- 
- Zpracování na PC nebo ručně
  - Tisk → odevzdání při dalším cvičení

# Cvičení č. 1 Ředění, pipetování

## Úloha č. 1

## Úloha č. 2

Způsoby ředění, k čemu je to dobré

Druhy pipet, proč je důležitá přesnost pipetování

Graf – závislost absorbance na ředění (1:1, 1:2, 1:4 ...)

Pro každou pipetu spočítat průměr, směrodatnou odchylku, variační koeficient

Závěr: Jak se absorbance mění, čím je to způsobeno

Závěr: Která pipeta byla nejpřesnější