

# Izolácie buniek a funkčné testy lymfocytov

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)  
Ústav klinické imunologie a alergologie  
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



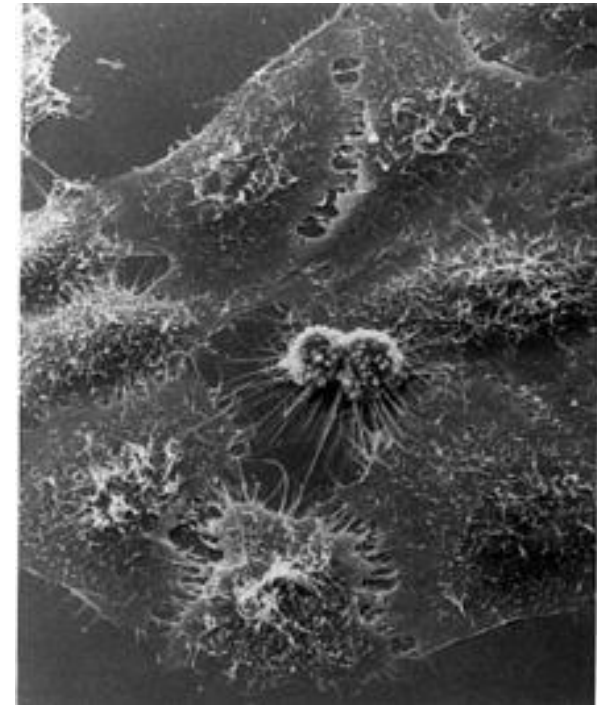
Neutrophil



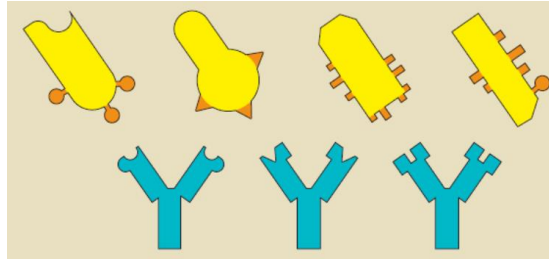
Eosinophil



Basophil



# Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy  $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunečné- počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

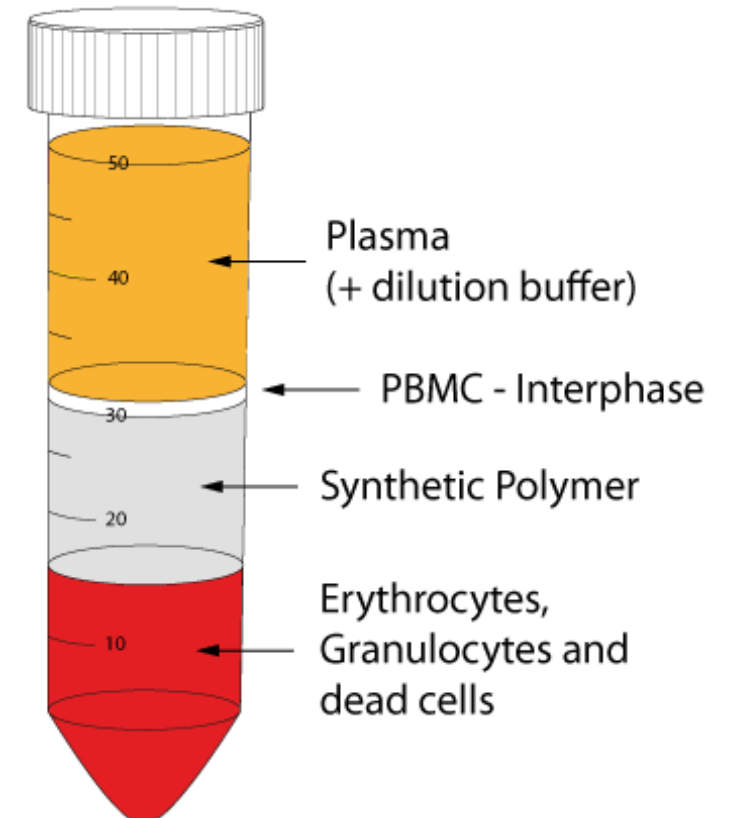
# Izolácia PBMC

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 guličky s naviazanou monoklonálnou protilátkou proti určitému CD znaku hľadaného typu buniek
- Bunky sa naviažu na tieto guličky 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 (test blastickej transformácie) – 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**

Video: proliferácia BHK

# 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 sa 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 $\gamma$ C deficit	-	+	-	XL
JAK3 deficit	-	+	-	AR
IL-7R $\alpha$ 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!

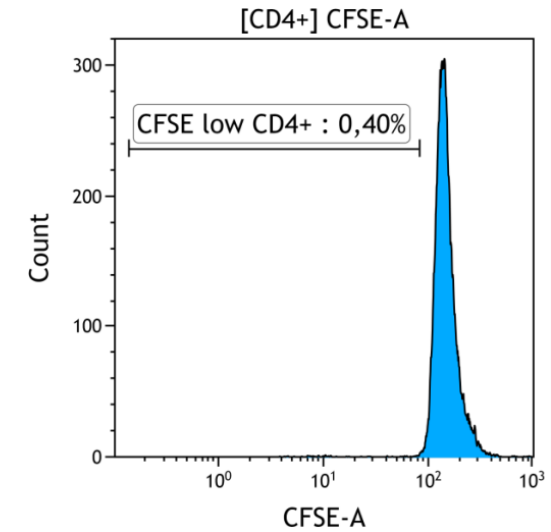
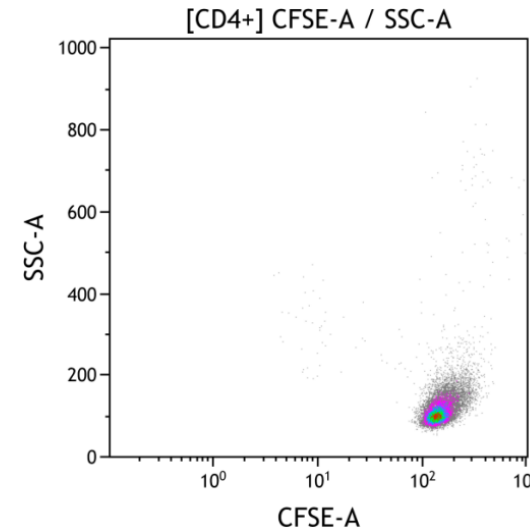
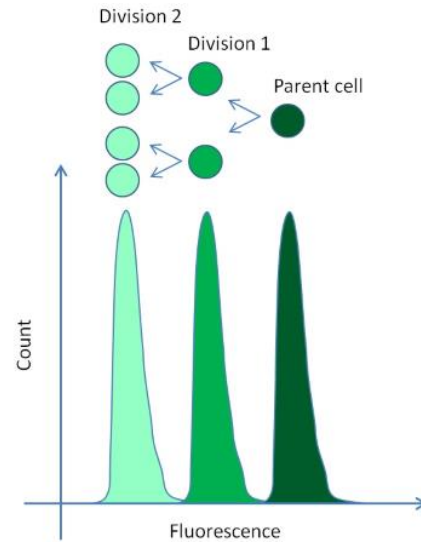


# Metódy

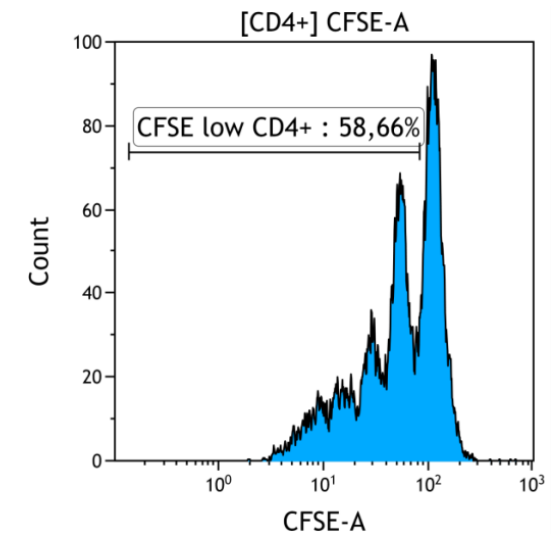
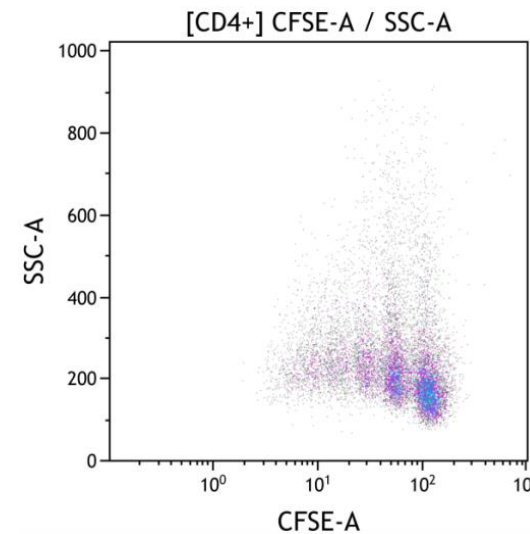
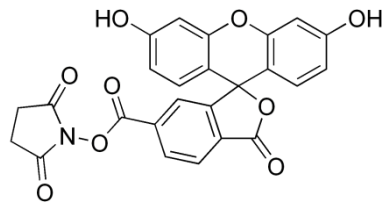
- Detekcia novo syntetizovanej DNA pomocou **thymidínu** značeného radioaktívne (**trícium**)- meranie na beta-counteru (scintilačný detektor)



# Metódy

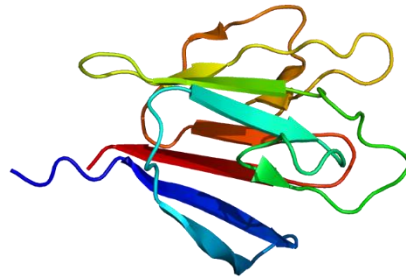
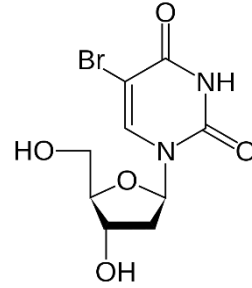


- Cytometrická detekcia pomocou fluorescenčného farbiva **CFSE** (karboxyfluoresceinsukcinimidylester), ktoré sa viaže nešpecificky na rôzne štruktúry v bunkách, sleduje sa nárast fluorescence po delení buniek

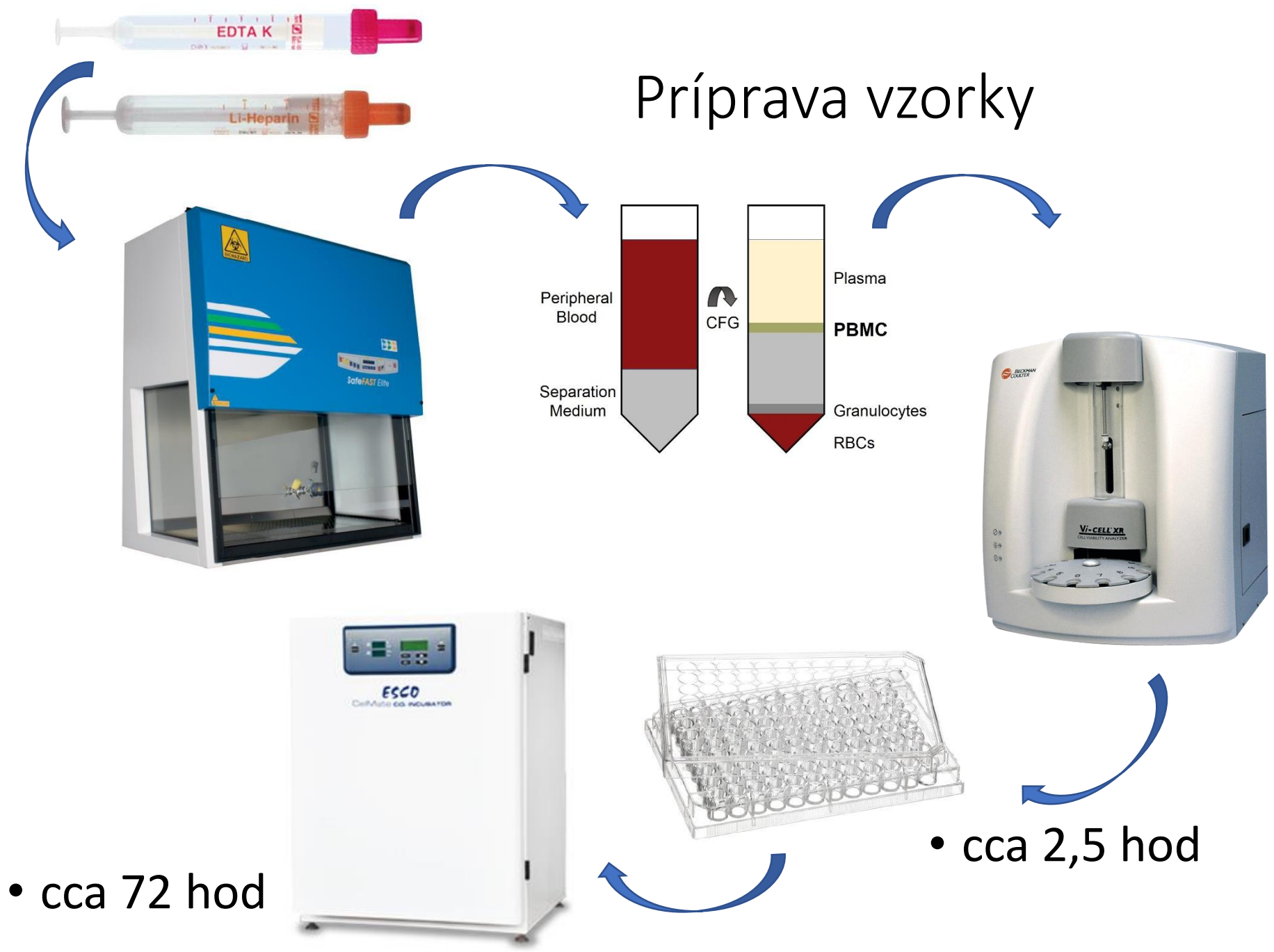


# Metódy

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



# Príprava vzorky

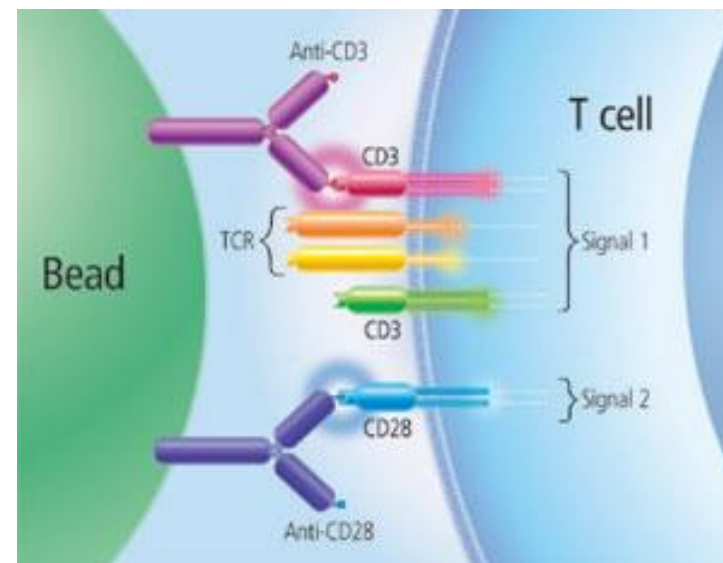
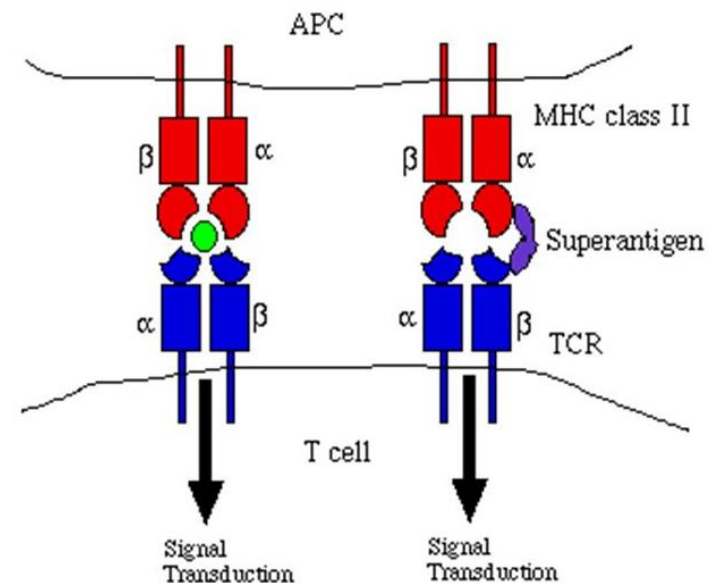


• cca 72 hod

• cca 2,5 hod

# Stimulancia

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



# Kultivácia lymfocytov in vitro



- Pestovanie prebieha v definovanom bazálnom médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ ATB – penicilín, streptomycín) pri 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% vlhkosť
- Normálne bunky majú obmedzenú dĺžku života- obmedzený počet delení
- Pomocou karcinogénnych látok alebo vírus (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





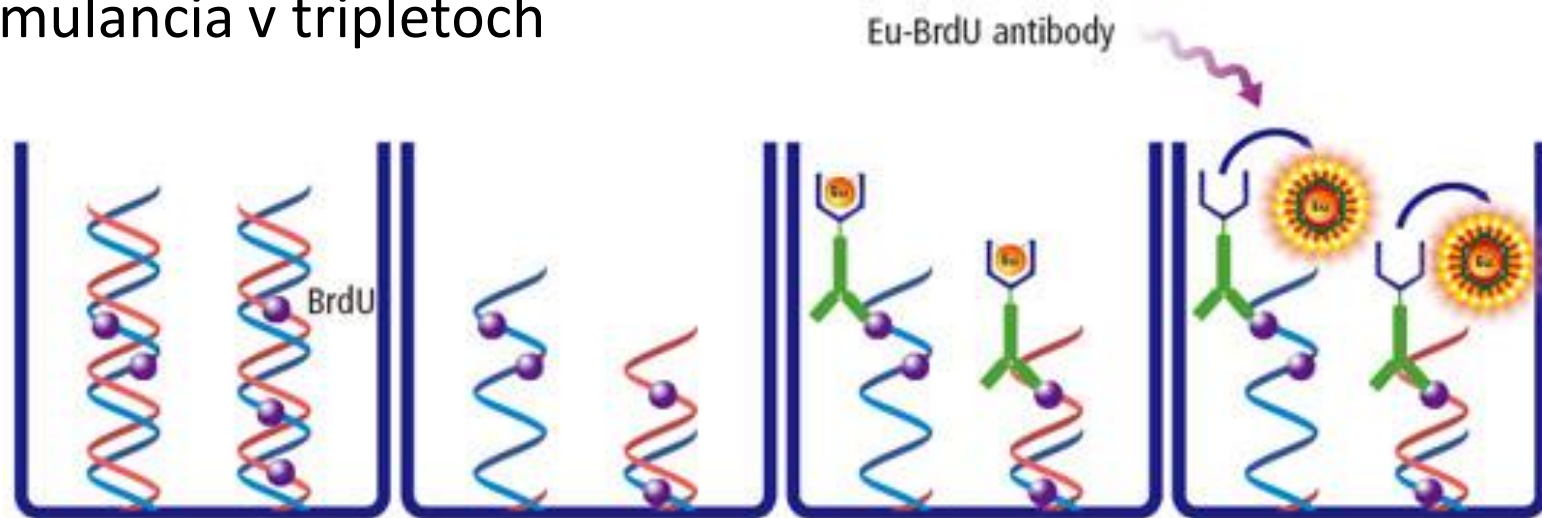
# DELFI (PerkinElmer)

- BrDU- **B**romo**D**eoxy**U**ridin
  - analóg Tymidínu

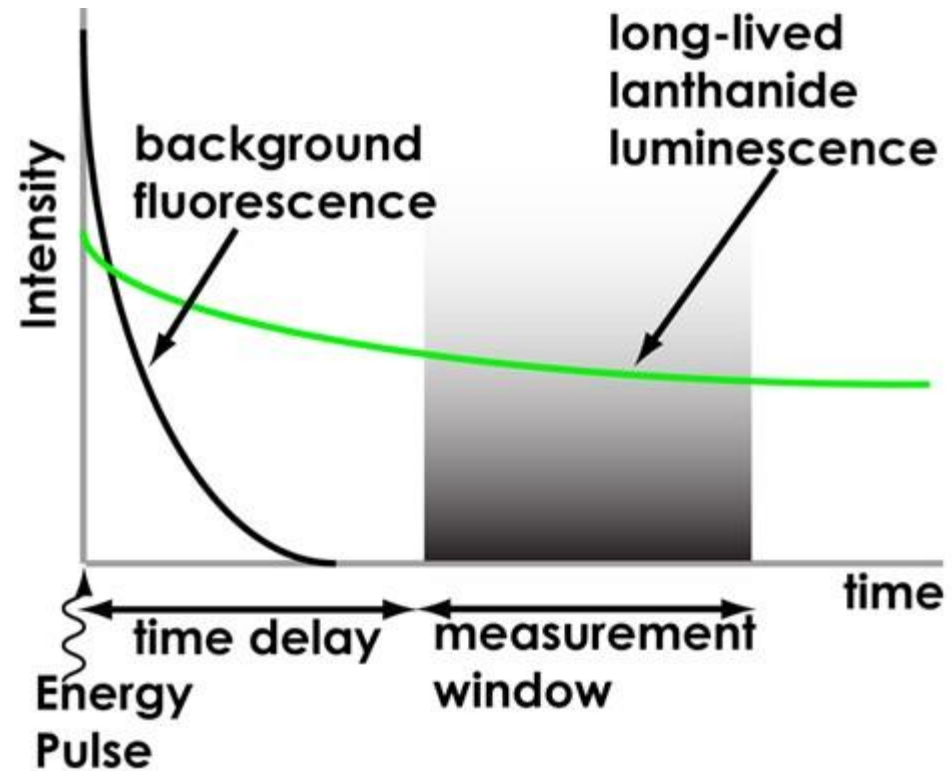
- Eu- Európium

- 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



# TRF- Time resolved fluorescence



# Výsledok DELFIA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	316	390	490	475	510	400	445	595	470	335	470	485
B	N <sub>1</sub>	2000	2080	2610	1940	1995	1885	455	520	595	465	545
C	CD3 <sub>149</sub>	140195	151055	123360	108725	118525	118470	300	610	500	475	610
D	PHA <sub>5</sub> <sup>425</sup>	82790	109785	98380	55570	54025	54945	655	470	445	520	440
E	PHA <sub>2</sub> <sup>470</sup>	43145	47395	38225	11450	9575	12840	470	425	375	520	605
F	ConA <sub>2,5</sub> <sup>500</sup>	61915	68675	55965	78825	58895	89895	525	540	525	570	555
G	ConA <sub>1</sub> <sup>585</sup>	30045	30015	29490	36655	43855	44170	490	375	450		
H		425	495	475	345	310	545	530	495	535	395	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	295	320	415	270	345	440	405	525	345	255	310	445
B	N <sub>1</sub> <sup>770</sup>	1785	1700	1510	1595	2790	2200	365	425	485	400	325
C	CD3 <sub>239</sub>	108820	62780	68980	115415	112115	108780	375	390	475	325	430
D	PHA <sub>5</sub> <sup>450</sup>	32295	28635	24970	105190	109035	90855	365	320	380	415	370
E	PHA <sub>2</sub> <sup>320</sup>	7185	6475	4490	50205	47085	45995	435	300	345	365	405
F	ConA <sub>2,5</sub> <sup>395</sup>	48090	49870	45200	191990	116575	100390	445	290	500	455	450
G	ConA <sub>1</sub> <sup>365</sup>	25230	23305	19890	98295	78885	80965	480	425	610	300	370
H		330	455	440	375	385	380	495	500	425	490	450

# Cytometrické stanovenie

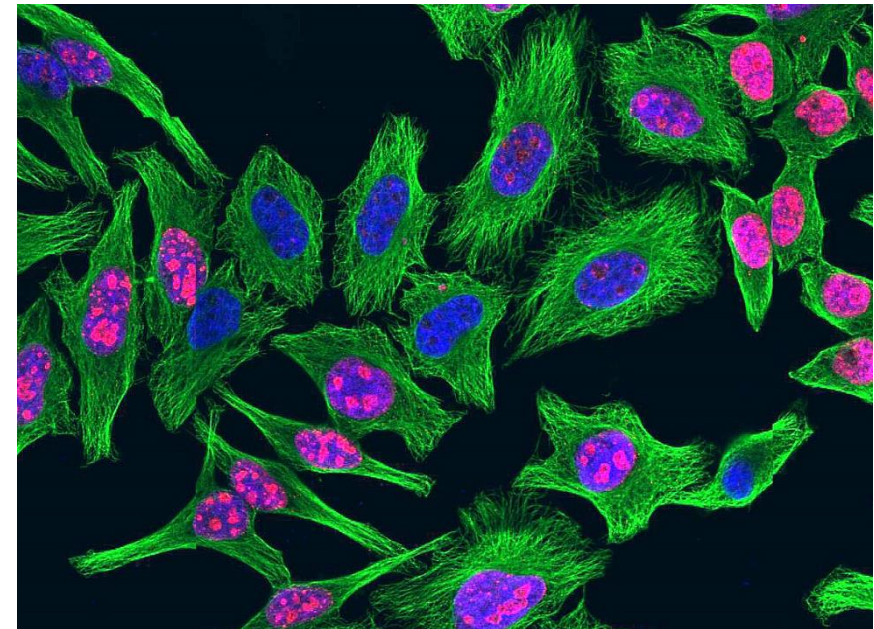
- Ki-67 - jadrový proteín
- asociovaný (možno nevyhnutný) s bunečnou proliferáciou a s transkripciou rRNA
- interfáza- bunečné jadro
- mitóza- povrch chromozómov
- prítomnosť G1, S, G2, mitóza
- absencia G0

HeLa cells

Ki-67 proteín (červená)

tubulín (zelená)

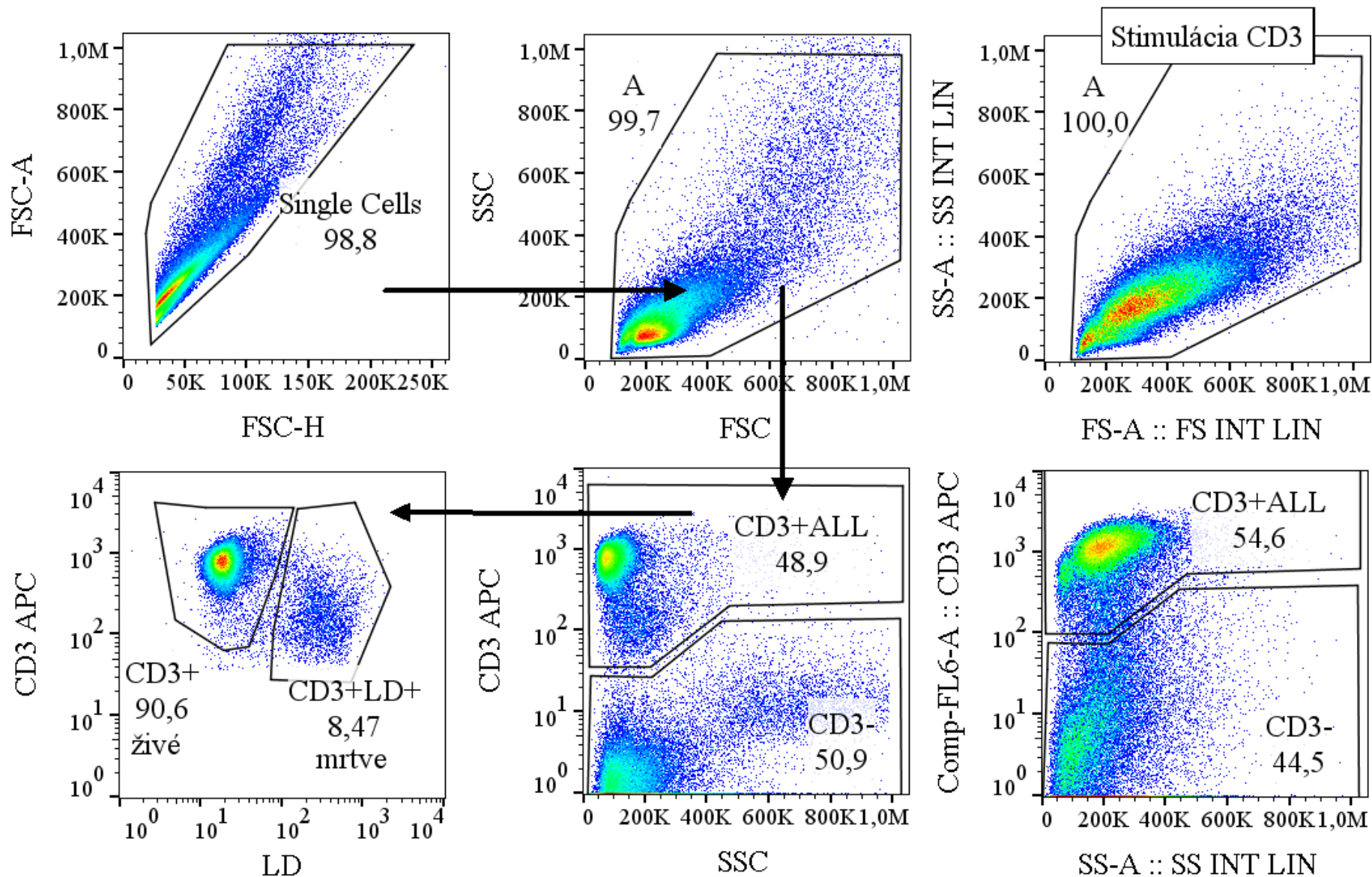
DNA (modrá)



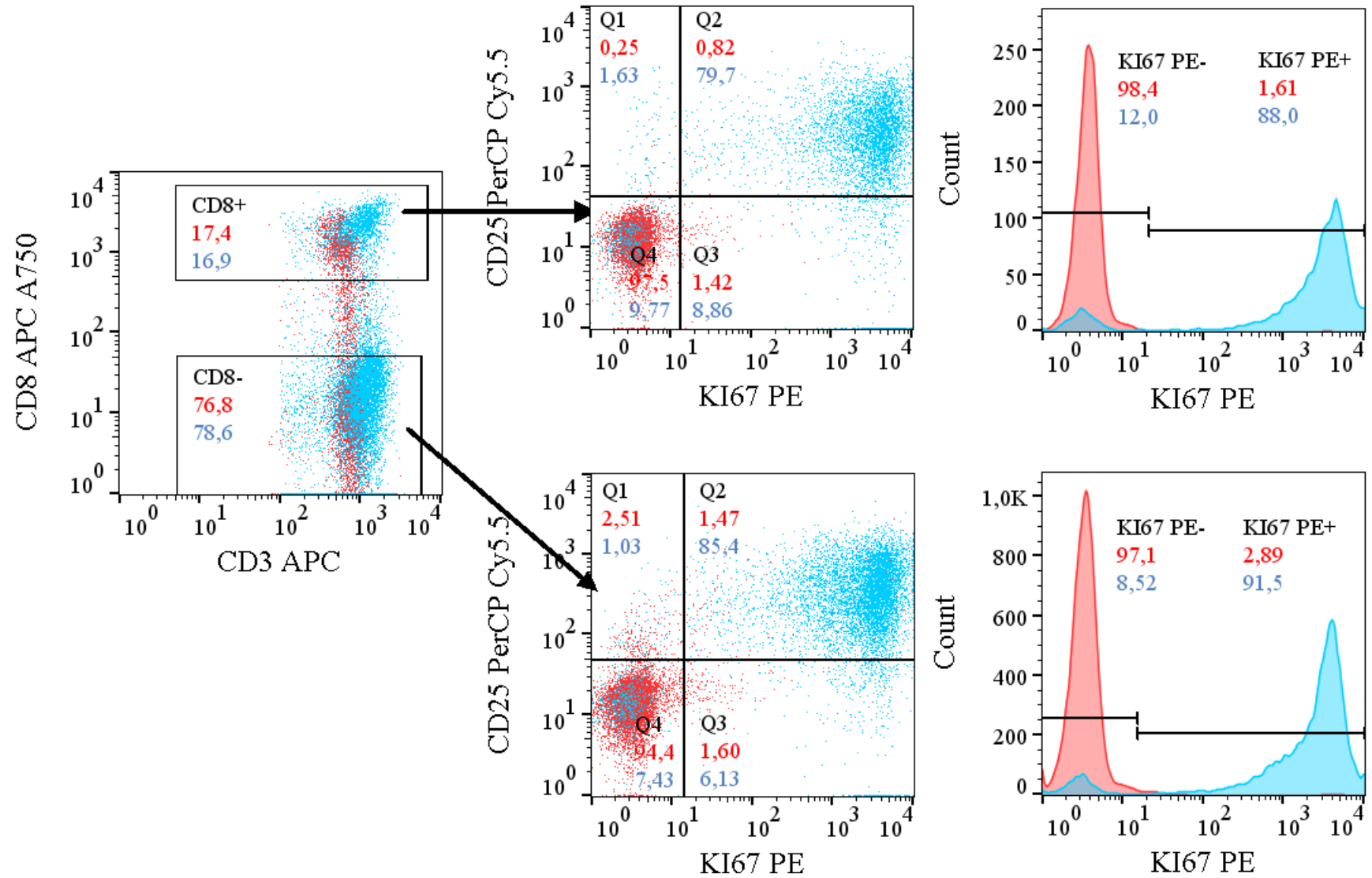
# Spracovanie

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

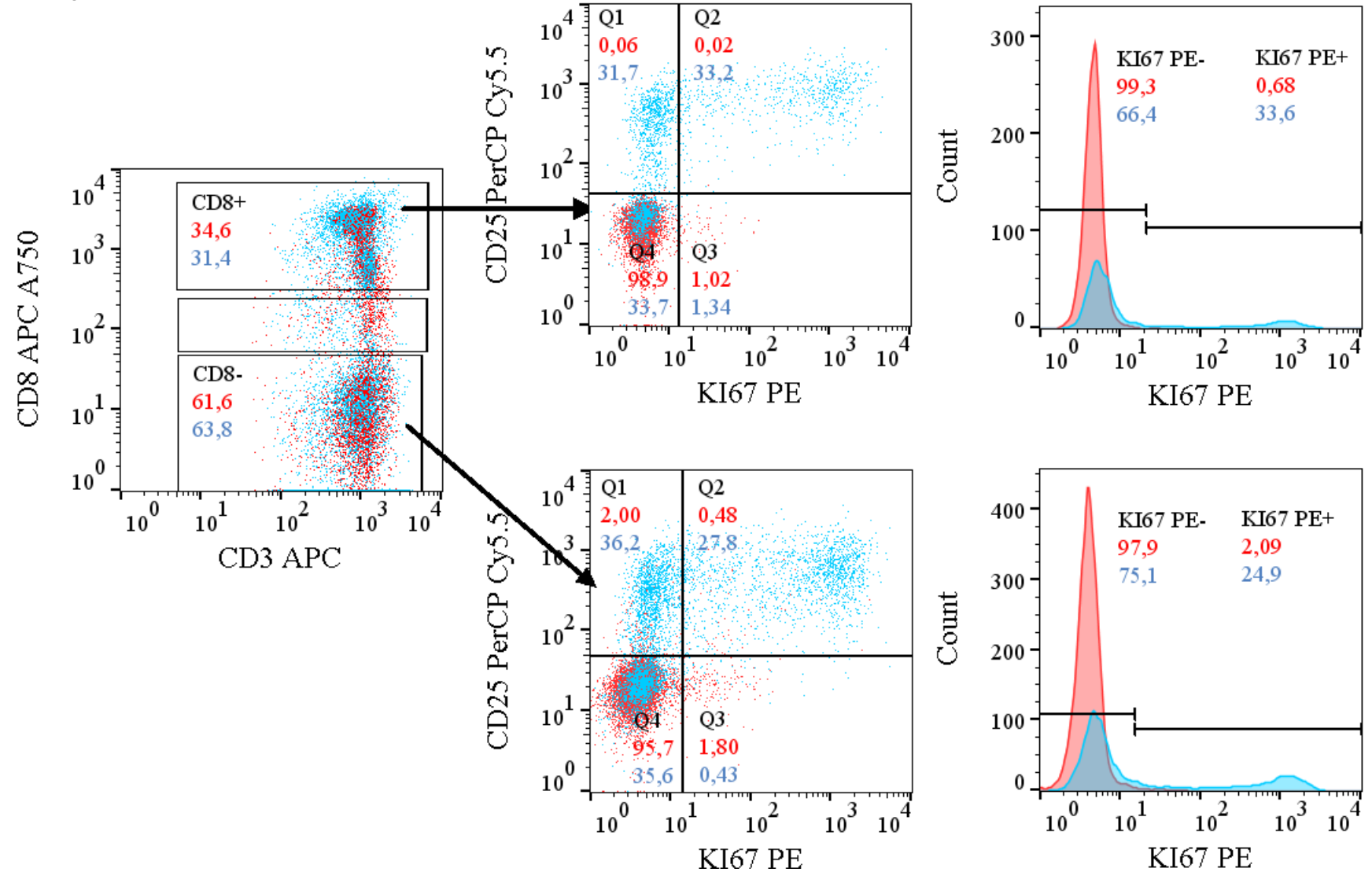
# Gatovacia stratégia



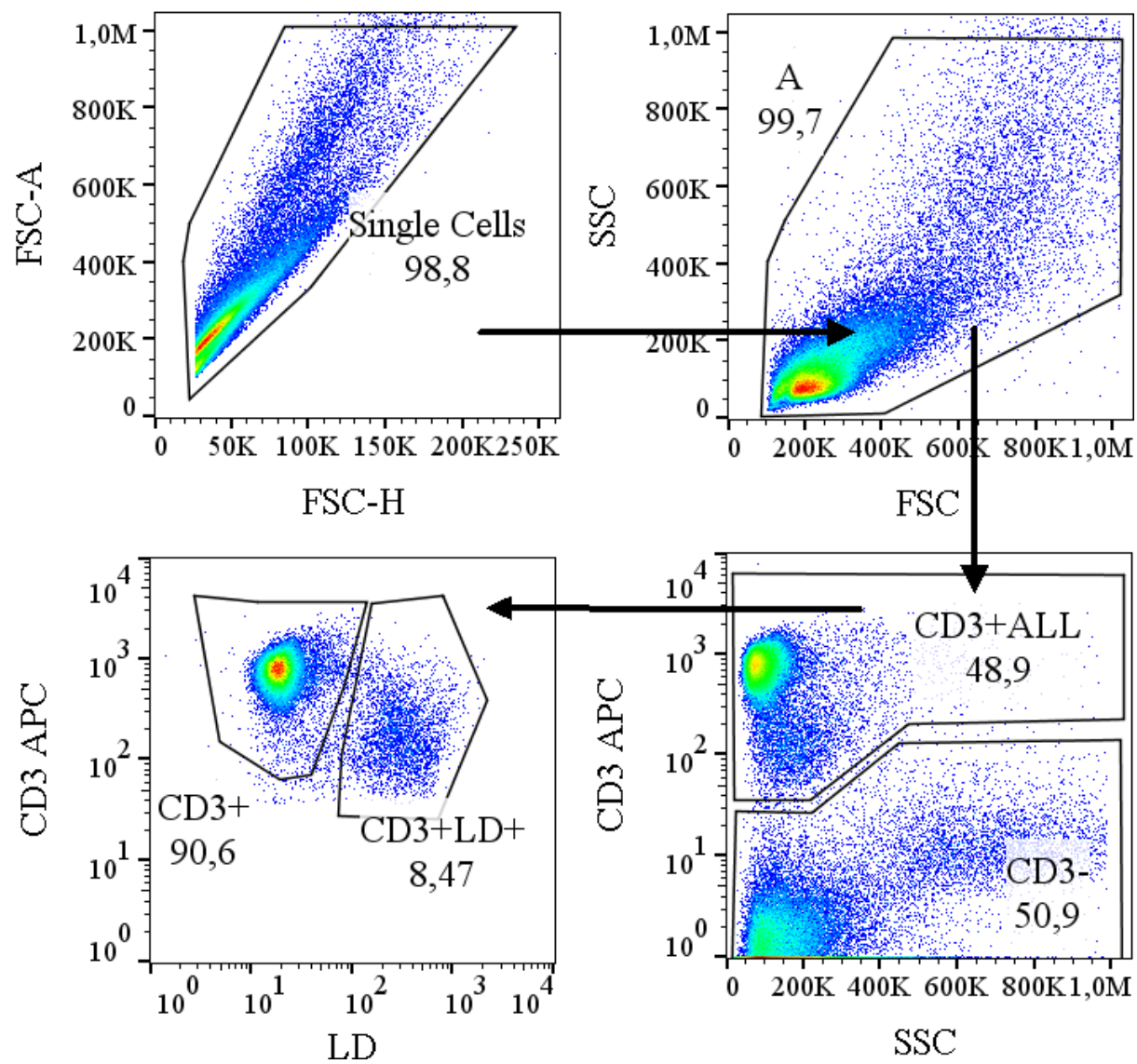
# Gatovacia estratègia



# Patient 1: ↓ expresia Ki-67



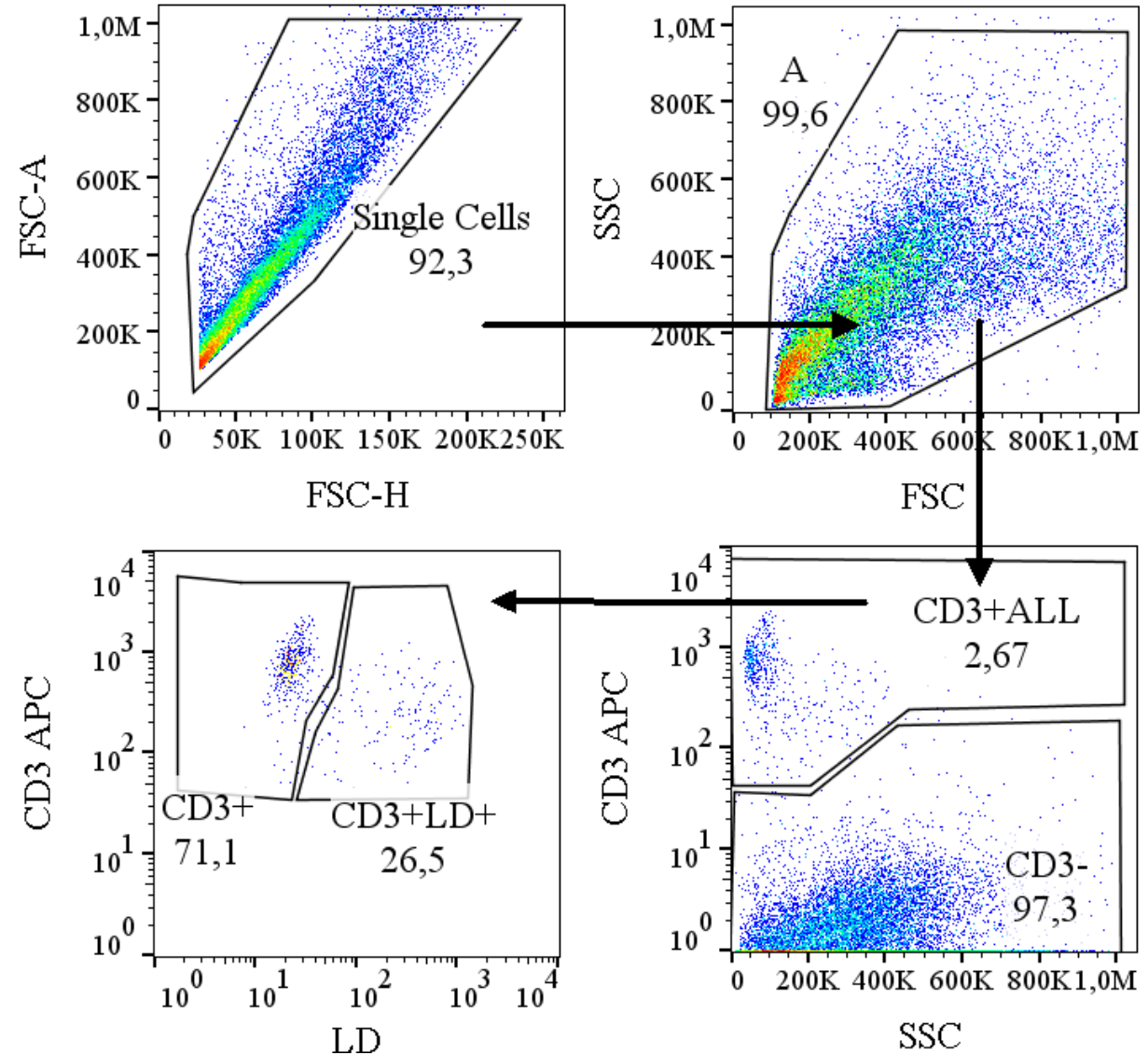




Pacient 2:

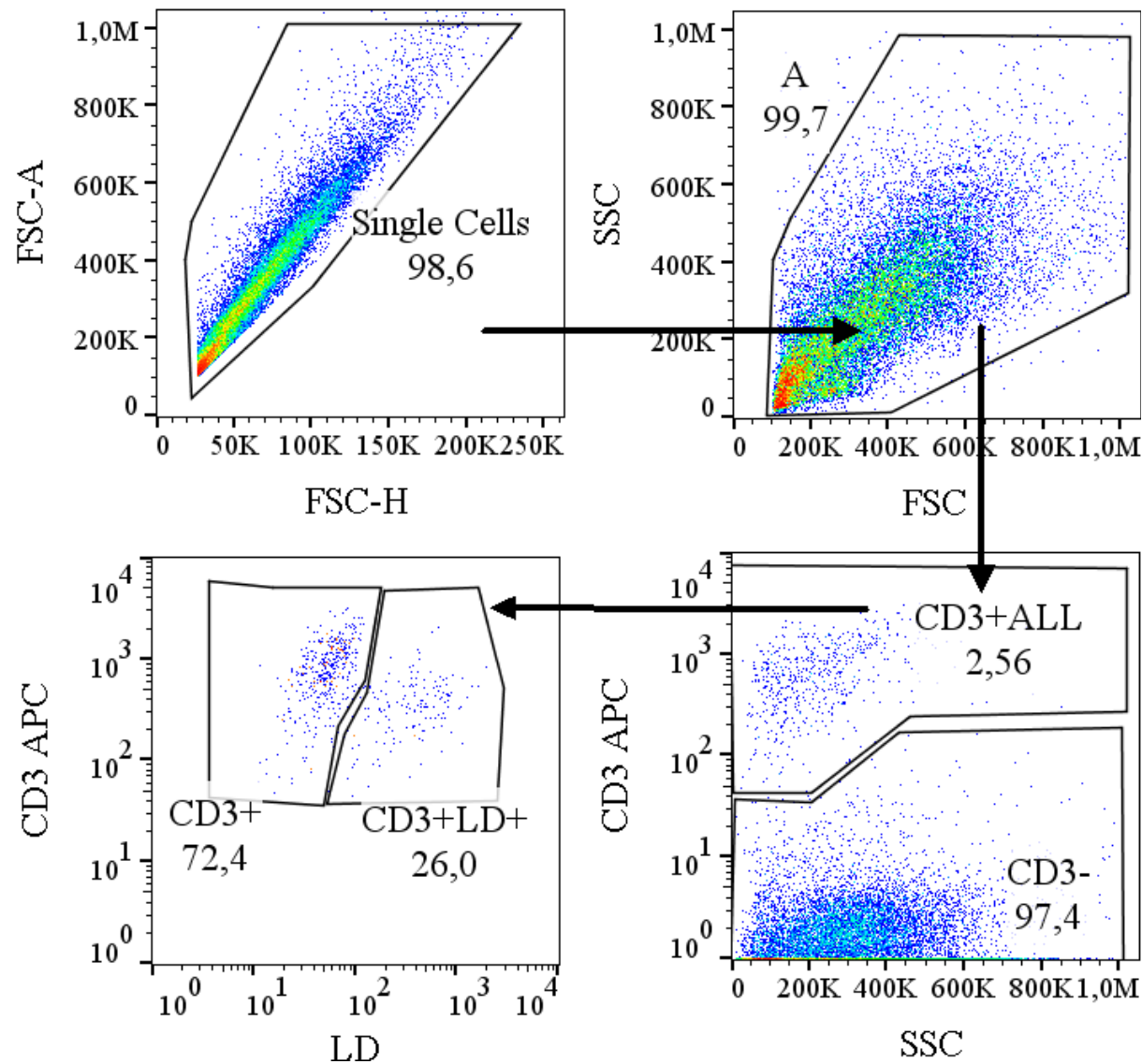
↑ apoptóza buniek

• nestimulované

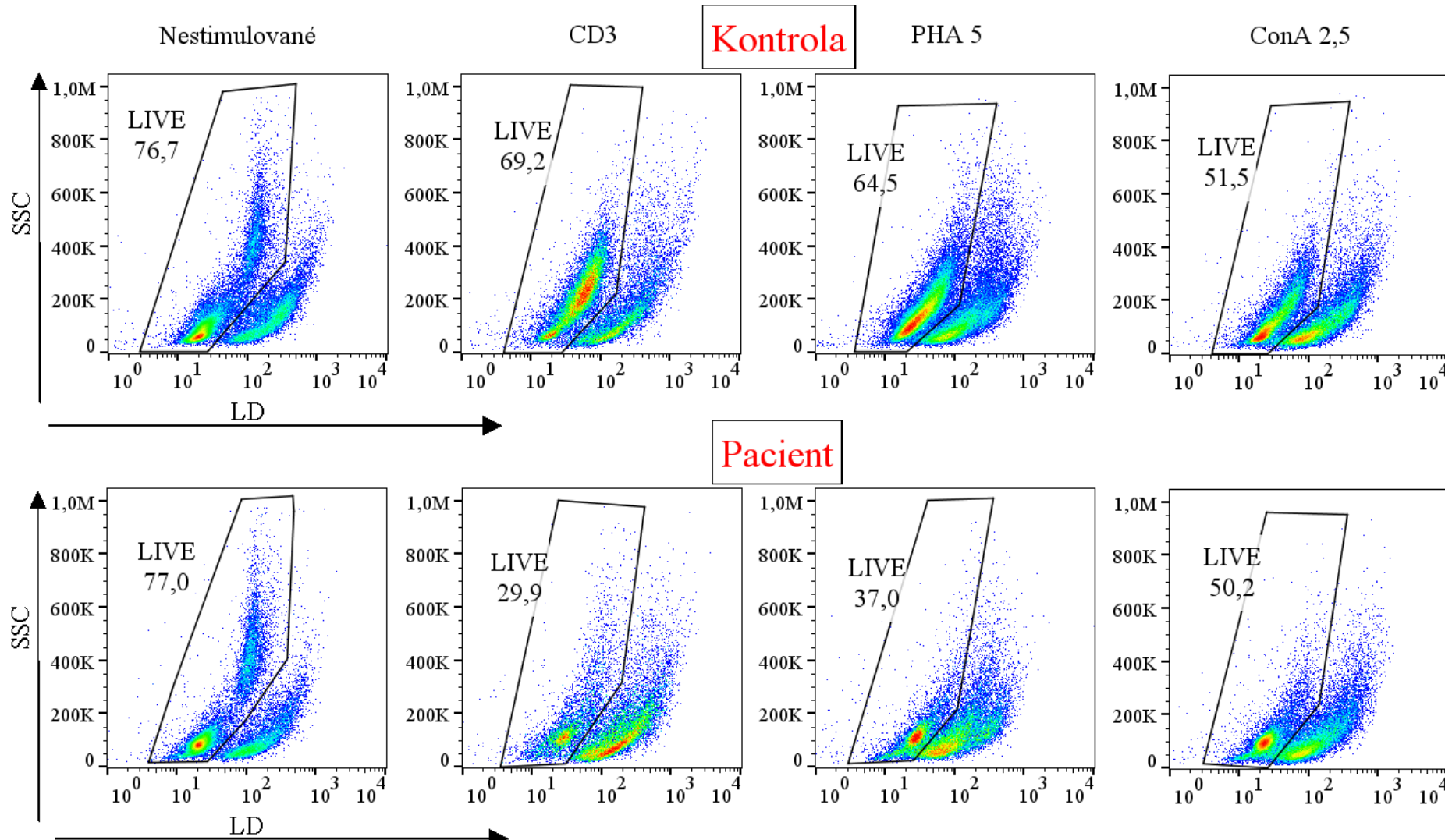


Pacient 2:  
↑ apoptóza buniek

- stimulácia aCD3

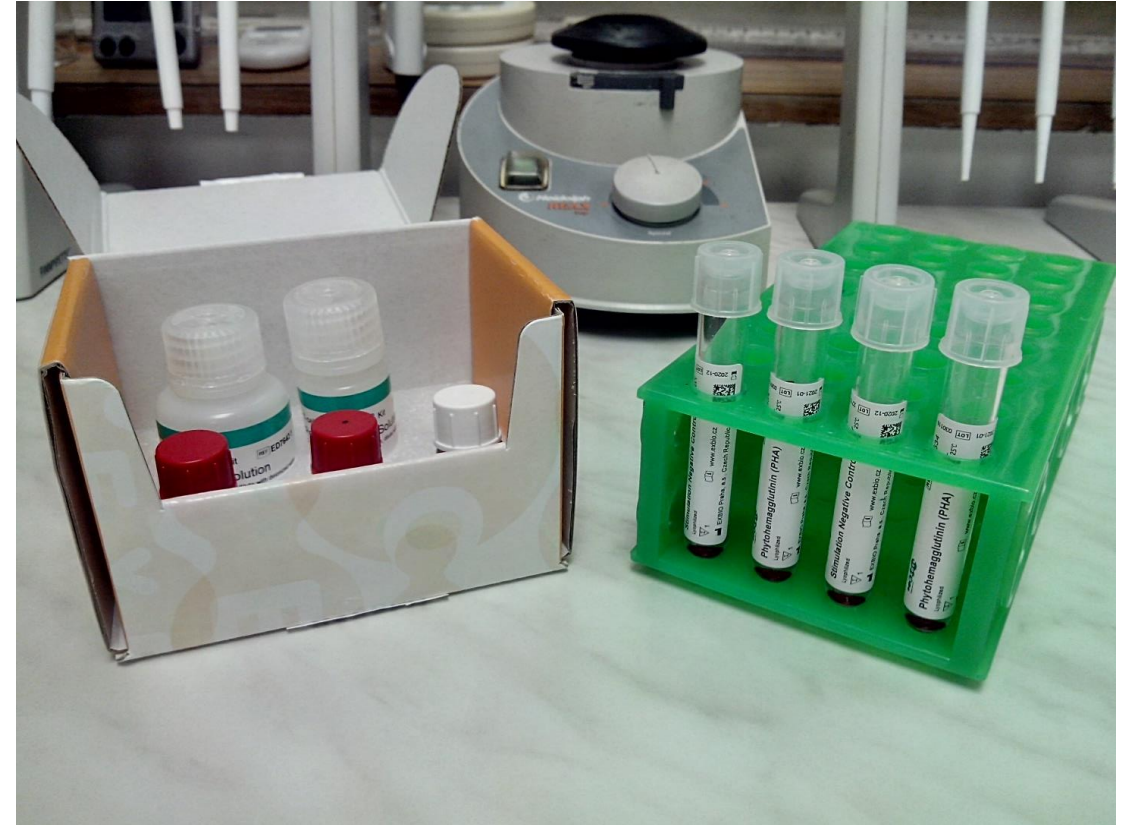


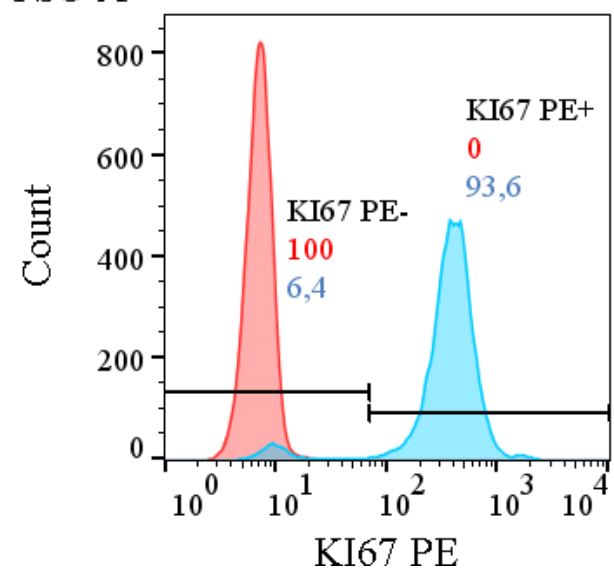
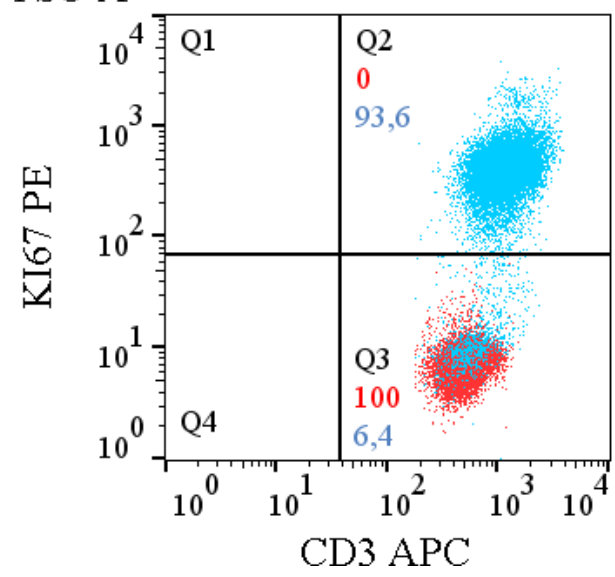
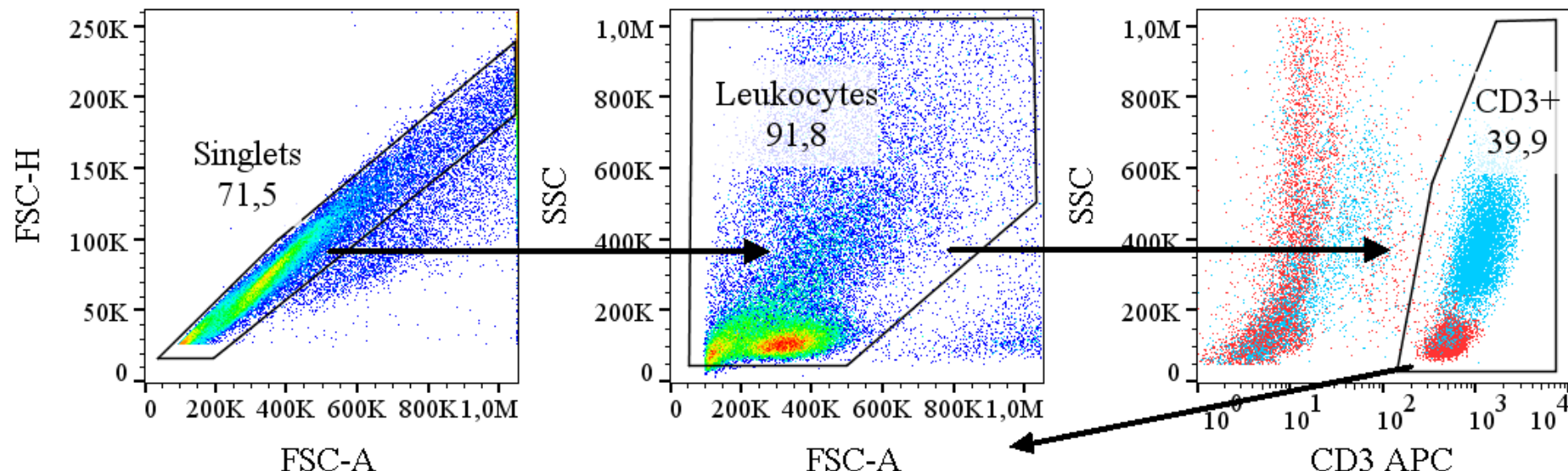
# Pacient 3: silnejšia stimulácia → zvýšená úmrtnosť bb



# EXBIO Ki-67 KIT

- Stimulancia lyofilizované v skúmavkách
- Krv odobraná do heparínu
- Všetky potrebné reagensie prítomné v sete
- Detekcia: CD3 + Ki67
- Štandardizovaný a testovaný postup





Gatovacia stratégia

# Porovnanie metód

Test	Čas			Cena	Výhoda	Nevýhoda
	nasadenia	spracovania	merania			
<b>DELFIG</b>	2,5 hod	2,5 hod	15 min	1500 Kč	cena	náročnosť
<b>Ki-67</b>	2,5 hod	3 hod	1 hod	2500 Kč	informácie	cena
<b>EXBIO</b>	15 min	1,5 hod	1 hod	1450 Kč	cena a čas	?

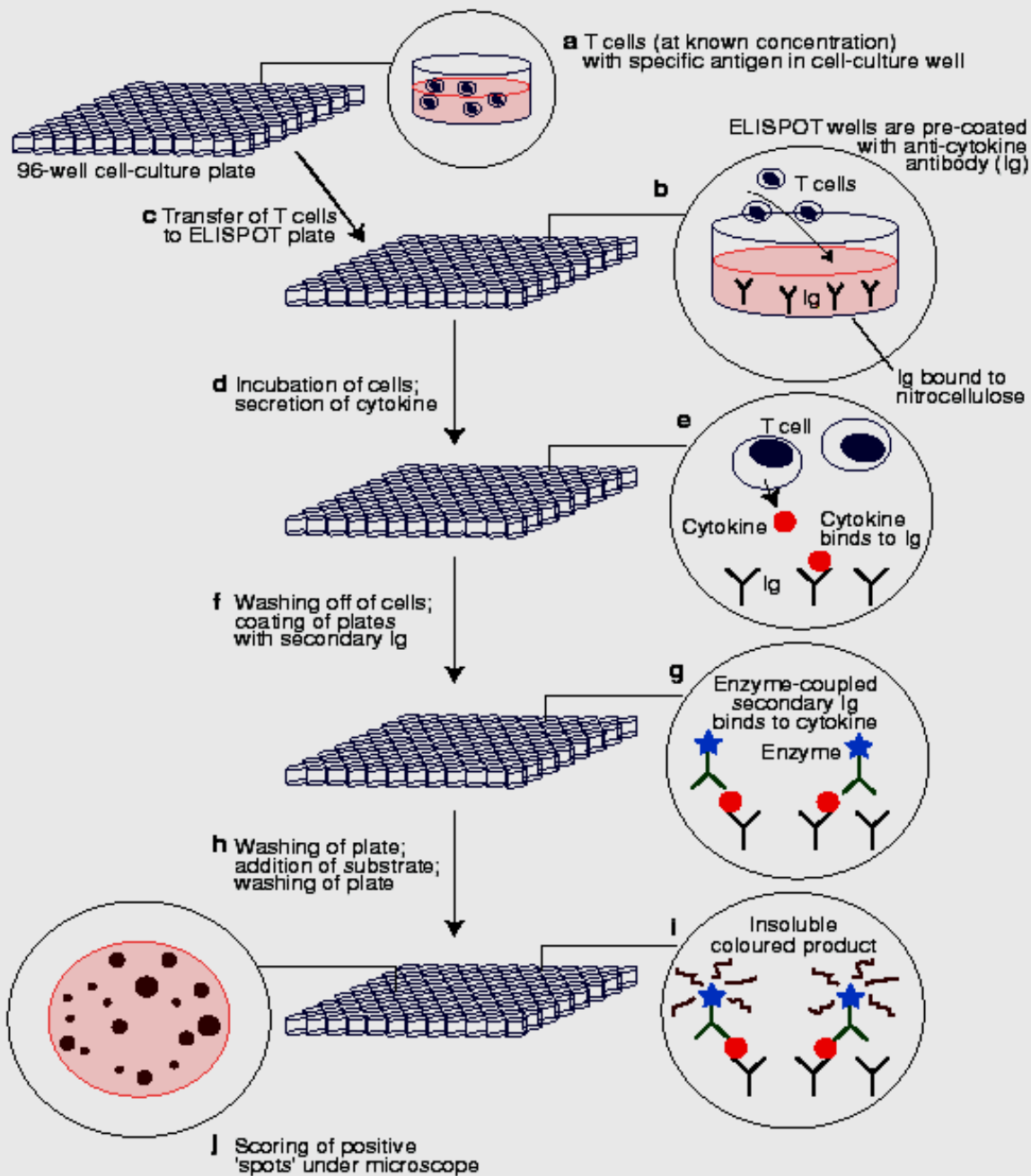
# Proliferačné vyšetrenie

- Výsledok: porovnanie kontrola vs. pacient
  - počet zábleskov (DELFI)
  - % Ki67<sup>+</sup> buniek (cyt. stanovenie)
- Kontrola prevedenia: odber?, viabilita buniek po izolácii PBMC?, spotrebované médium?,
- Cytometer: dostatok buniek na analýzu, veľkosť FSC vs. SSC, L/D, % Ki67<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> buniek
- Neg. výsledok = overenie a následné monitorovanie stavu (častejšie kontroly)



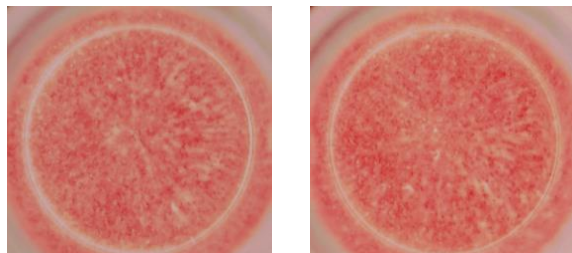
# ELISPOT

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

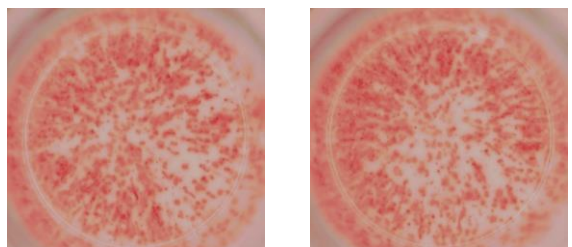


ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

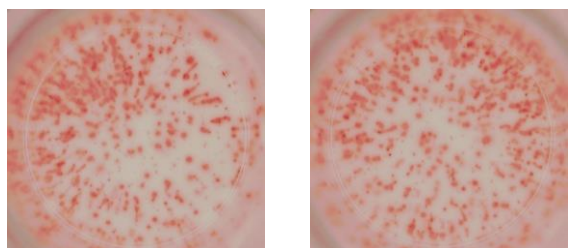
# ELISPOT



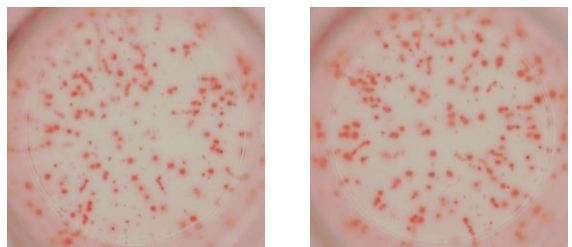
**$5 \times 10^5$**  7 dní po očkovaní



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



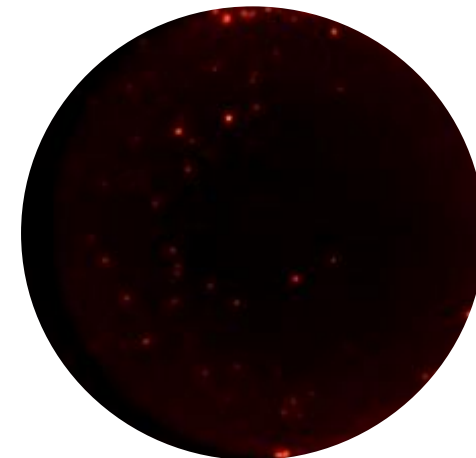
**$1,25 \times 10^5$**



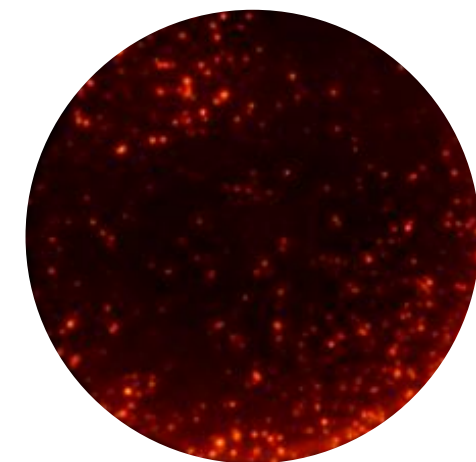
**$0,63 \times 10^5$**

Produkcia IL10 B lymfocytmi

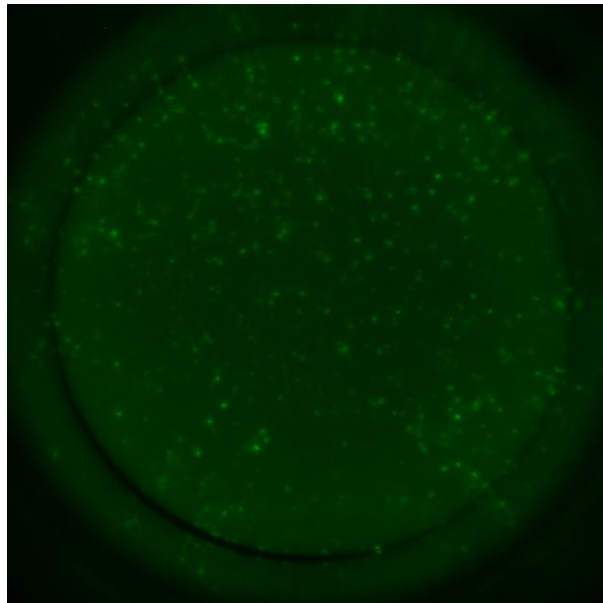
TNFR2-  
B cells



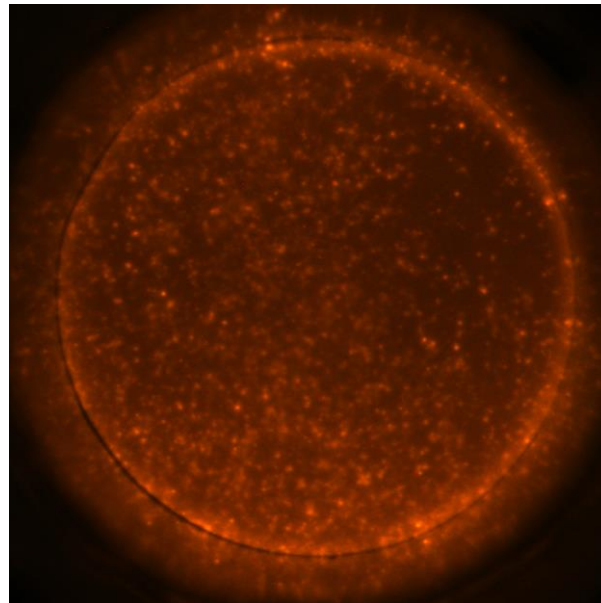
TNFR2+  
B cells



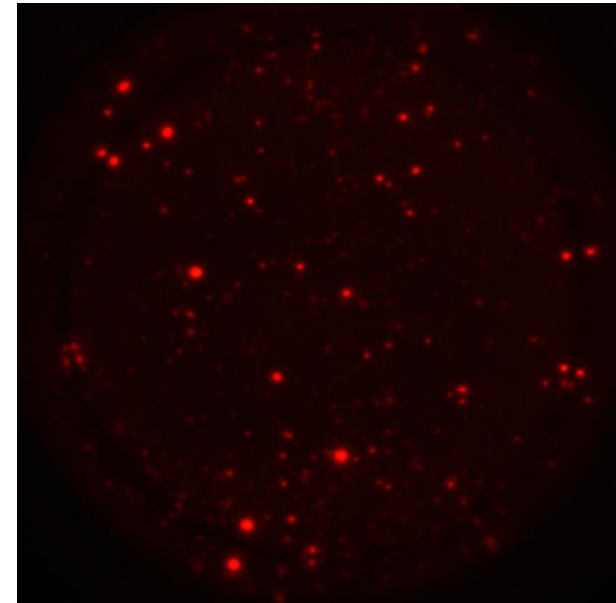
# FluoroSpot – B- lymfocyty



FITC – IgG



Cy3 – IL10



Cy5 – IgM

Po stimulácii CpG ODN