

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 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

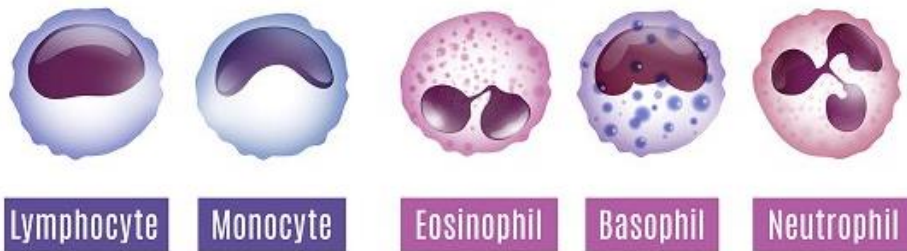


IgE, komplement,
autoproti látky, atd.

Rozdělení imunologických laboratorních metod

Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



- Absolutní a relativní počty
- Funkční vlastnosti

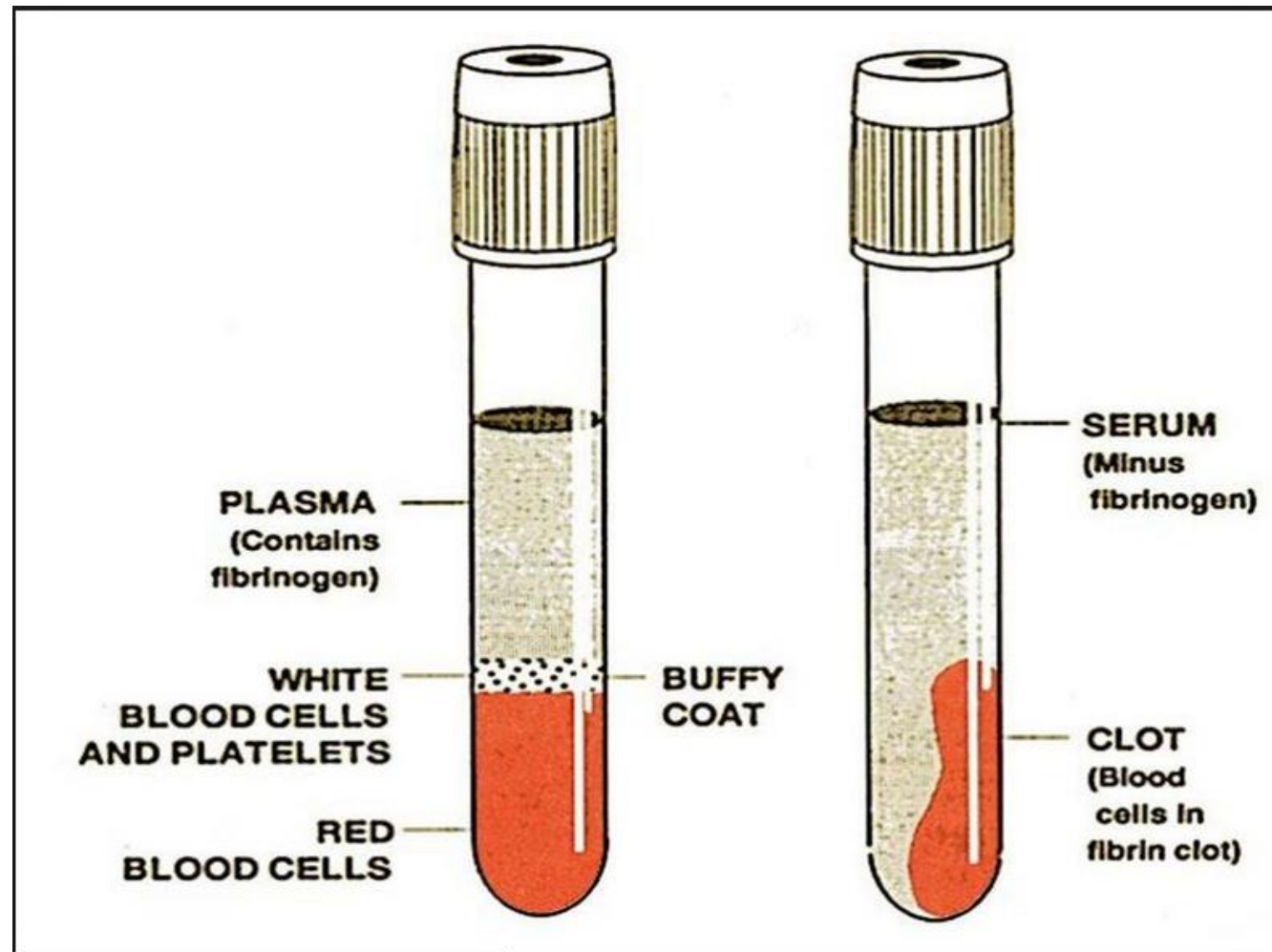
Serologická laboratoř

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:

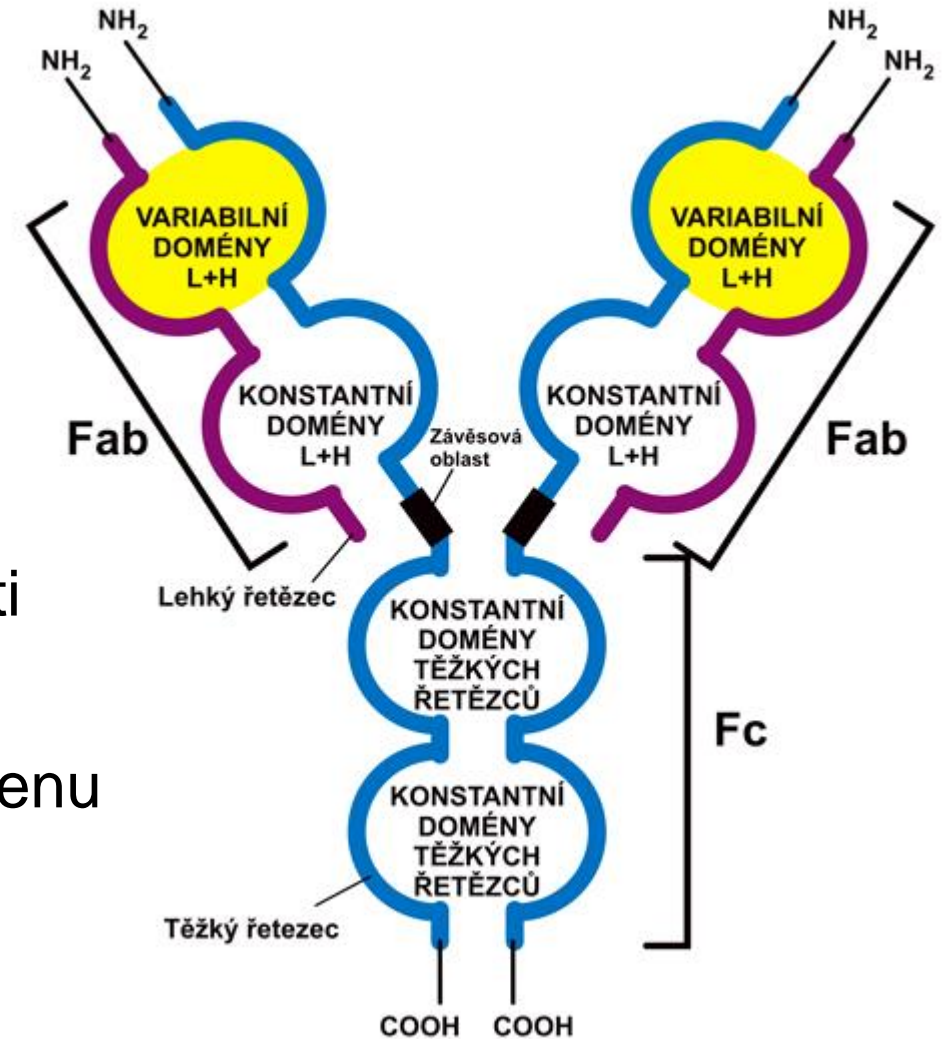
- Humorální složka adaptivní imunity
- Ochrana před extracelulárními patogeny

Význam pro medicínu:

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

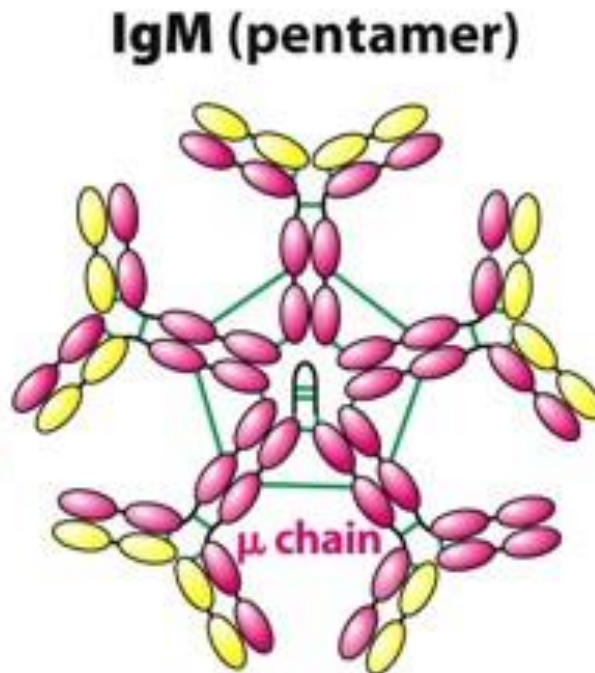
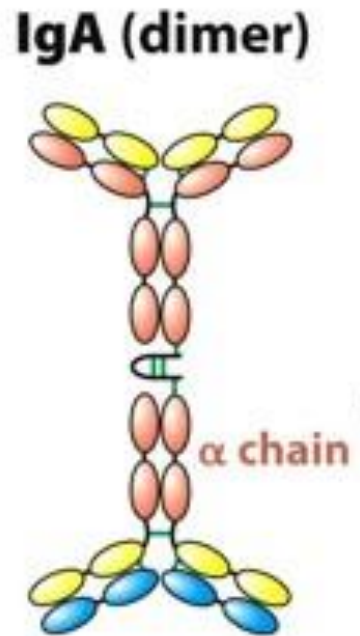
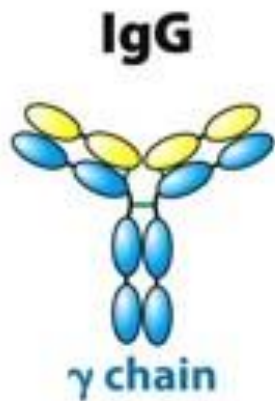
Struktura protilátky

- 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



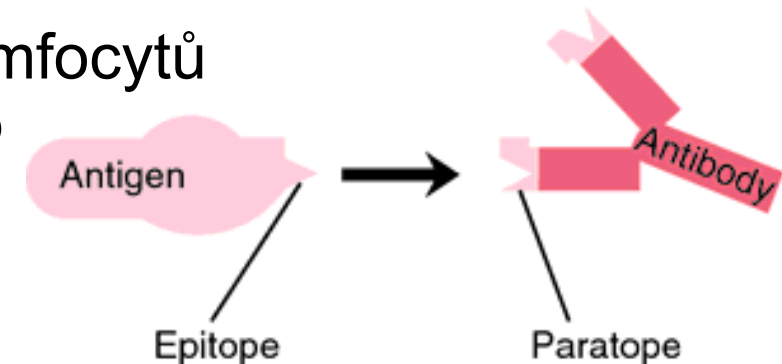
Principy reakce antigen-protilátka

- 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 nevazebné interakce

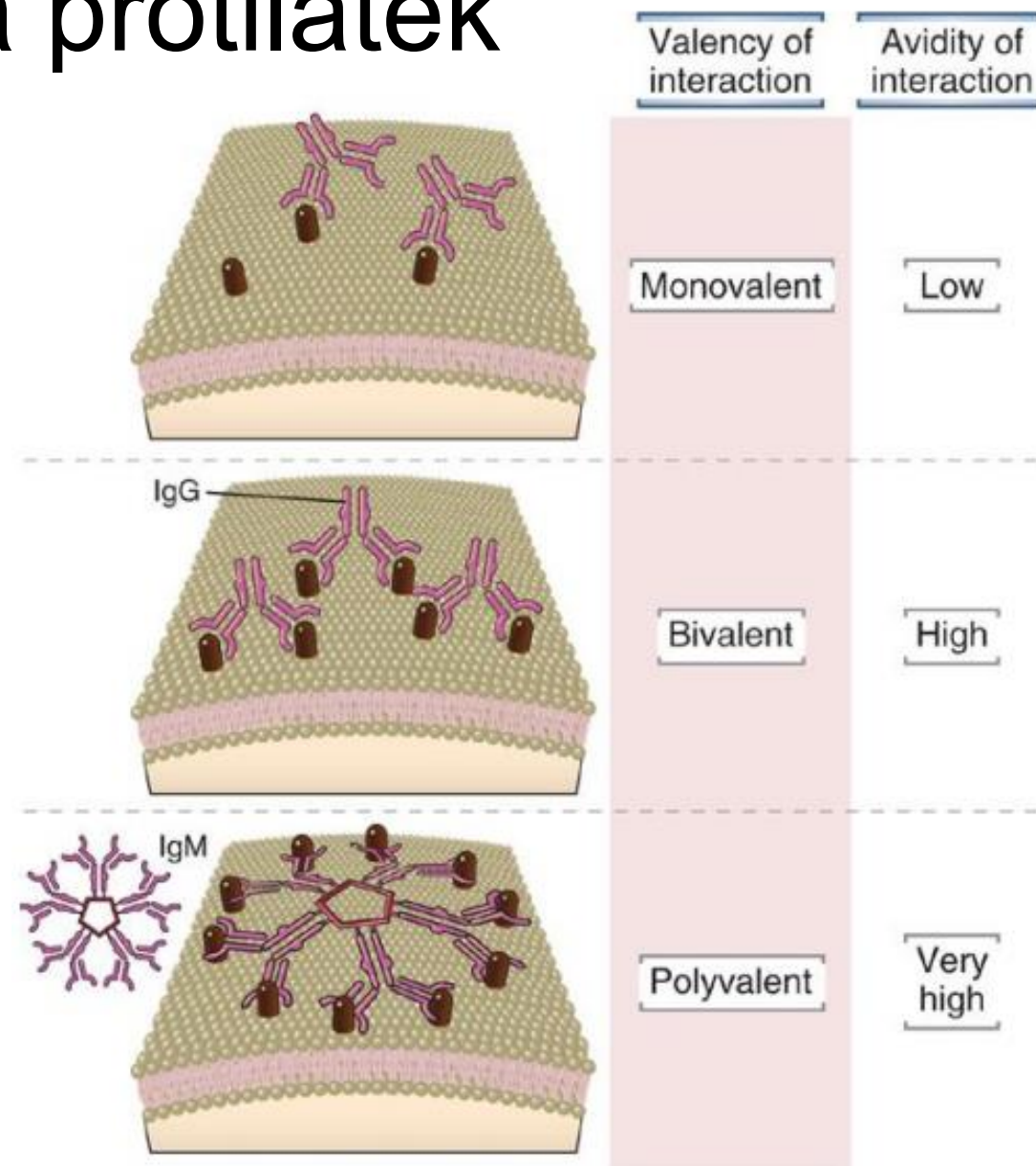
Afinita vs avidita protilátek

- 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

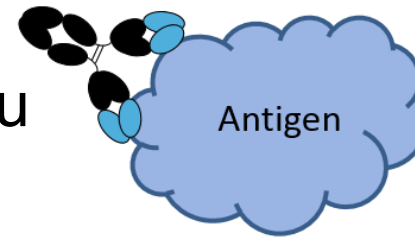


Protilátky mohou být

- Monoklonální

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

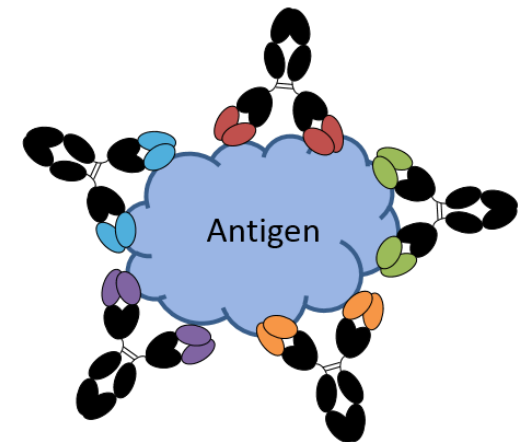
Monoclonal antibody



- 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 Al_2O_3
 - Freudovo adjuvans – adsorpce antigenu na kapičky minerálního oleje (s/bez přídavku usmrcených mykobakterií)

Výroba polyklonálních protilátek

3. Výběr vhodného zvířete

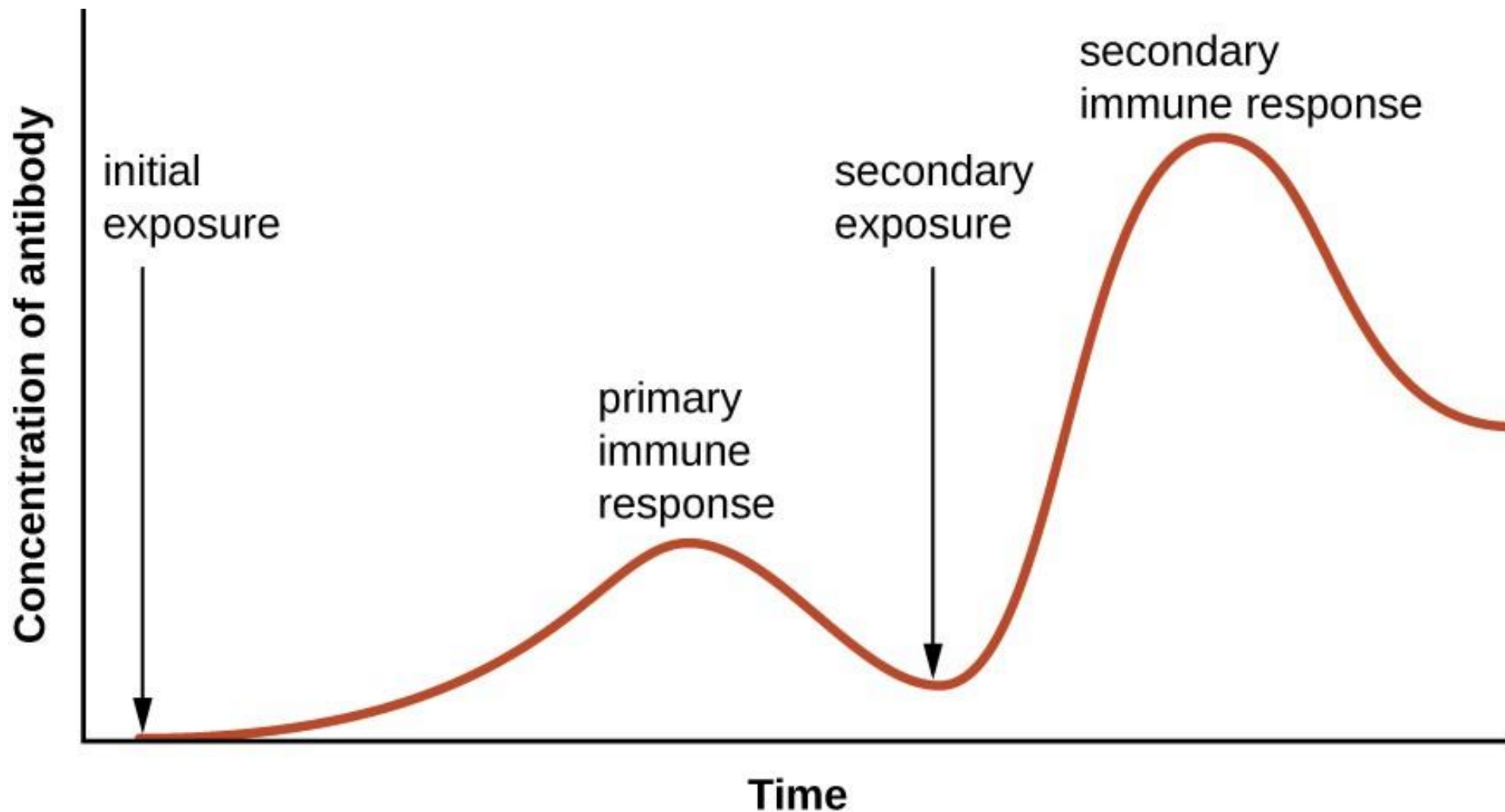
- Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu



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. Získ 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

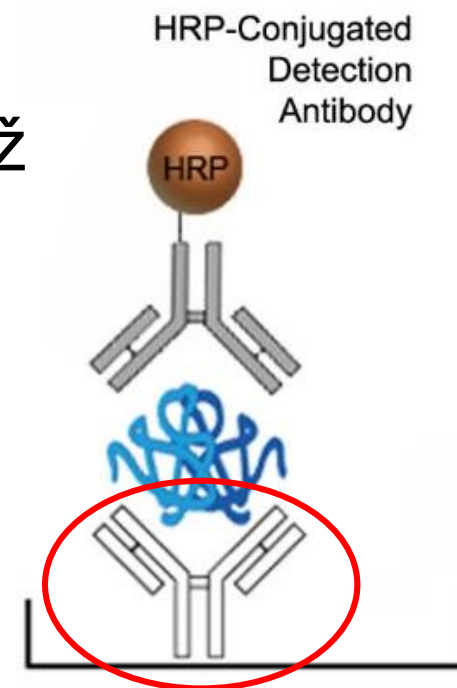
Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



ELISA

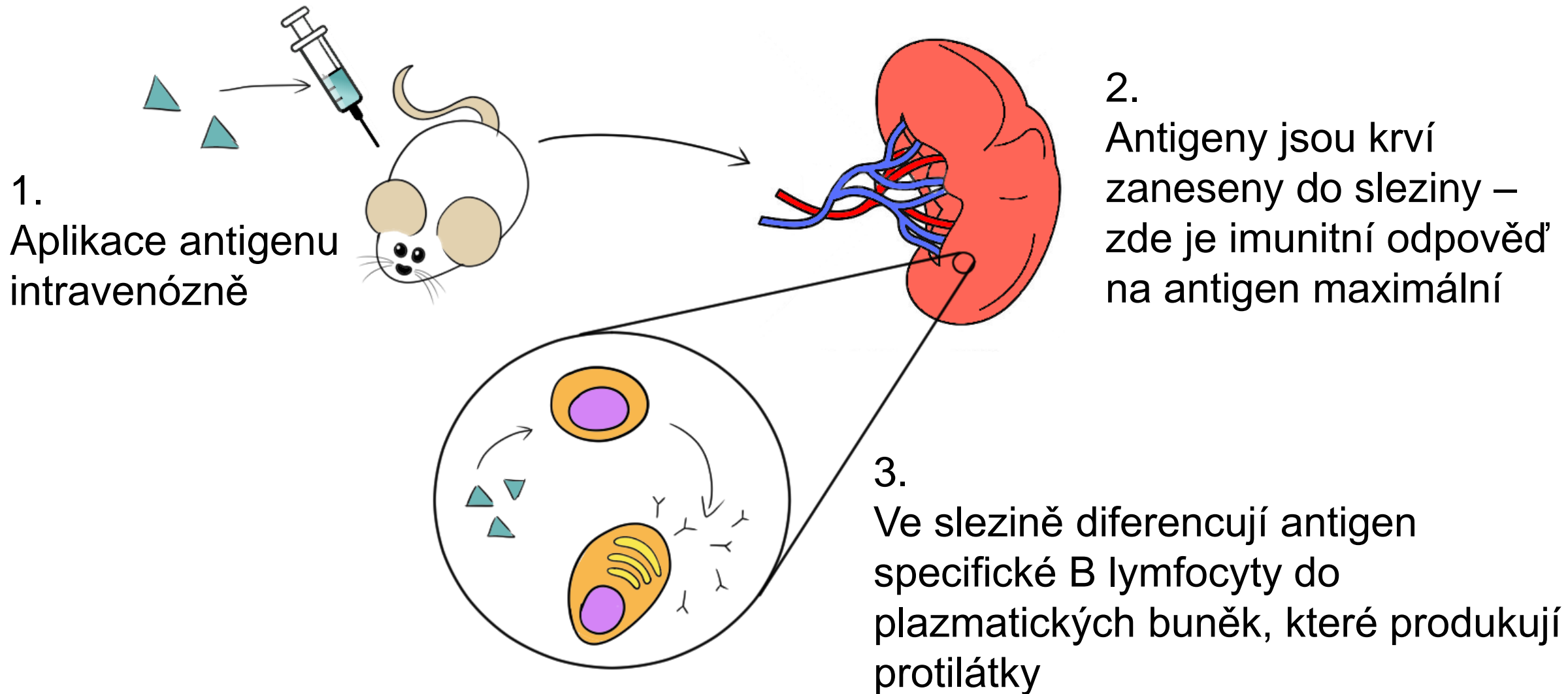
- Záchytné protilátky
- Záchyt různých variant antigenu
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita



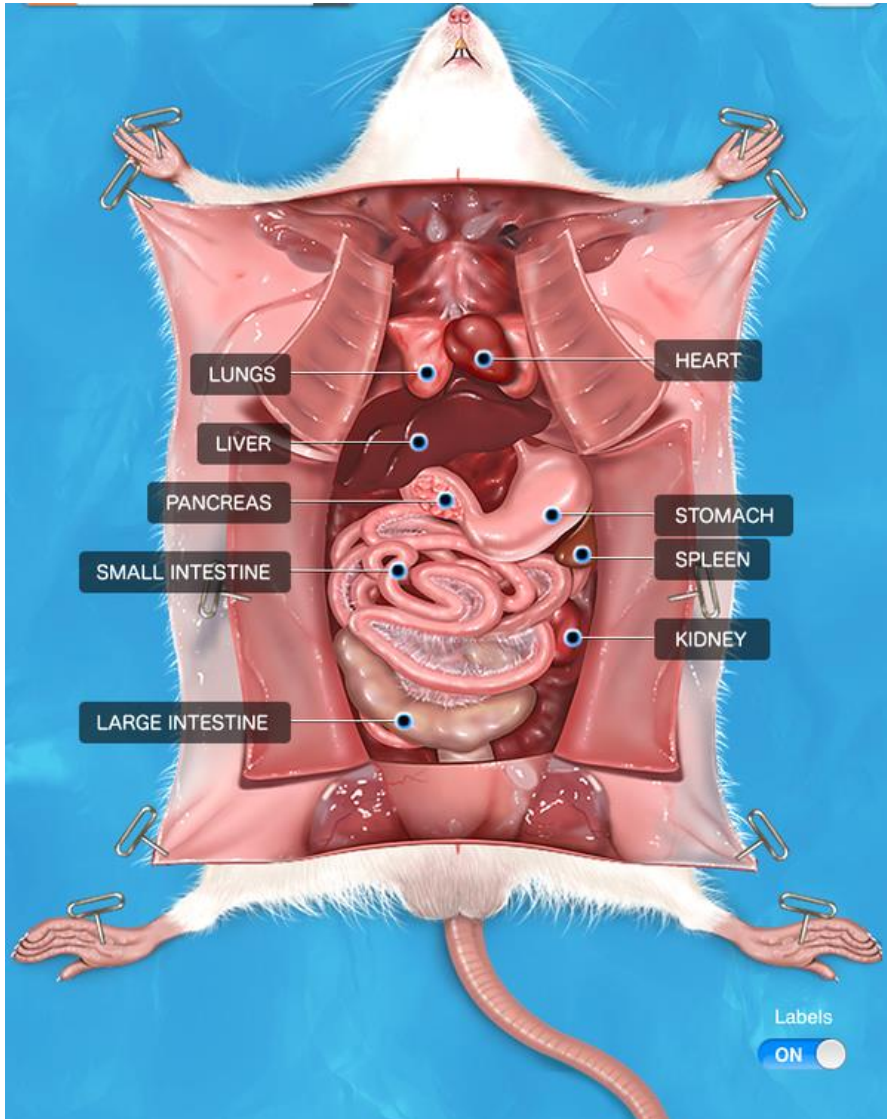


Výroba monoklonálních protilátek

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

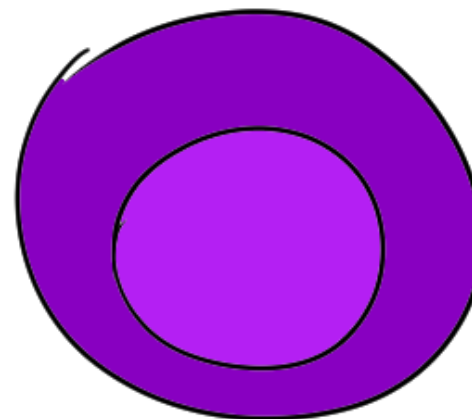
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

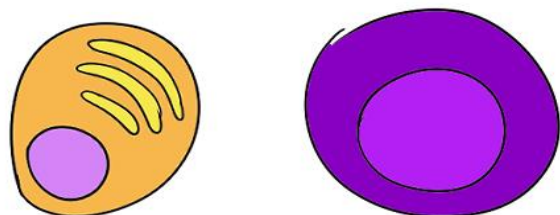


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

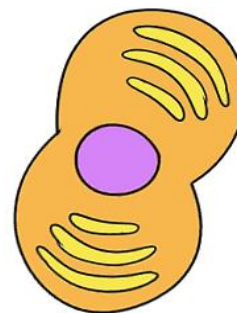
6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

Výroba monoklonálních protilátek

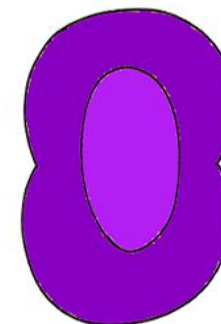
Nezfúzované B lymfocyty
a myelomové buňky



Zfúzované
B lymfocyty



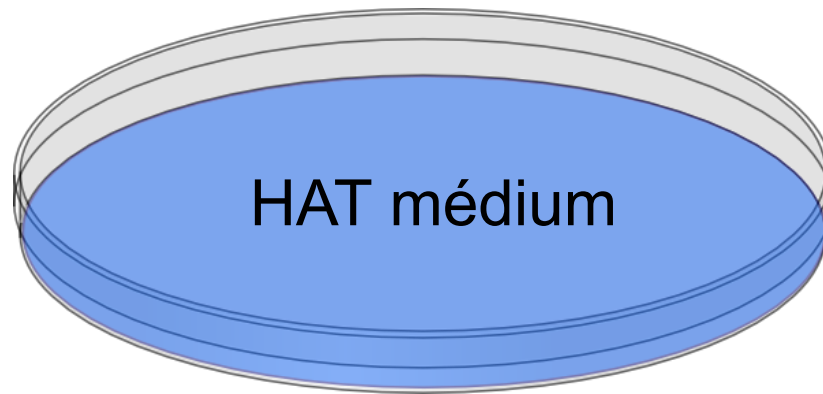
Zfúzované myelomové
buňky



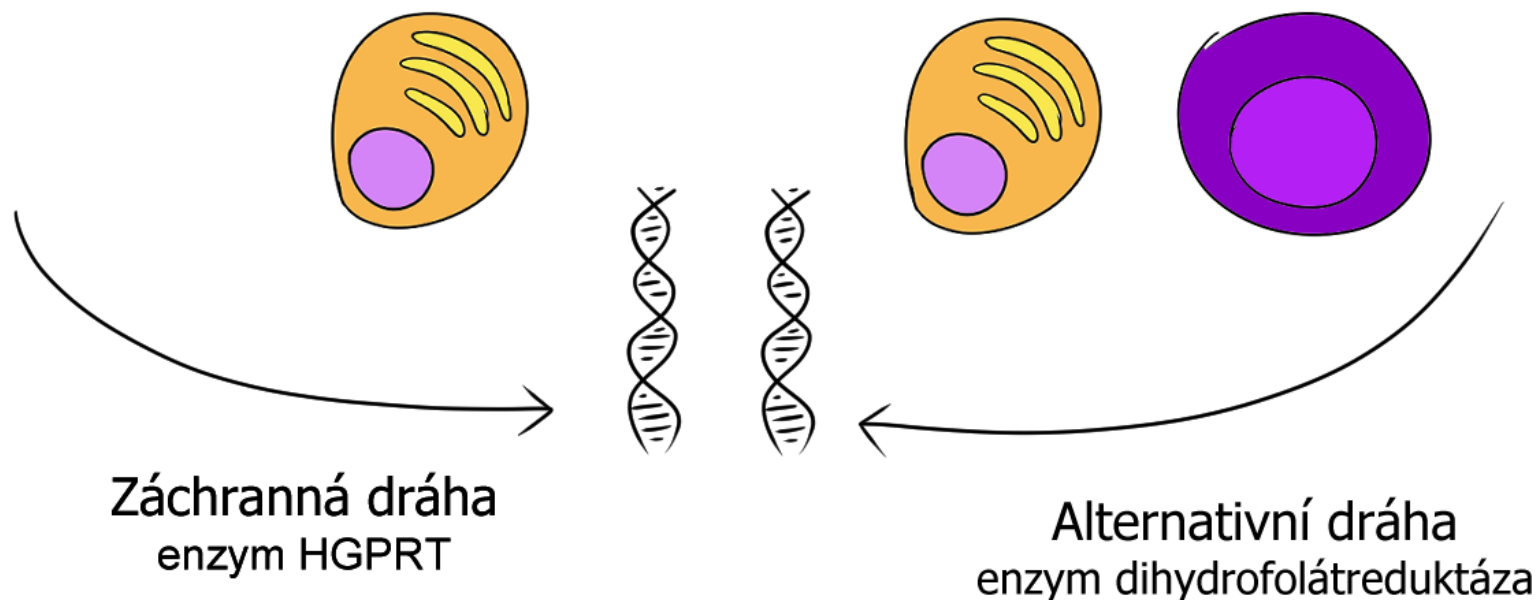
HYBRIDOM



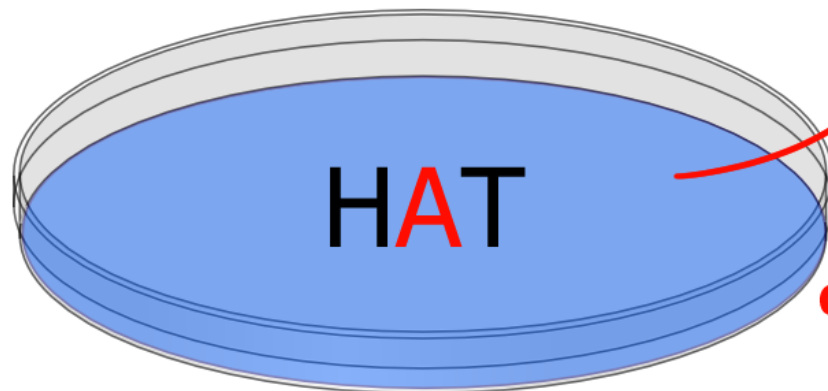
7. Buněčná směs je
kultivována v selekčním
HAT médiu
(Hypoxantin, Adenosin,
Thymidin)



Selekce – enzymatický blok

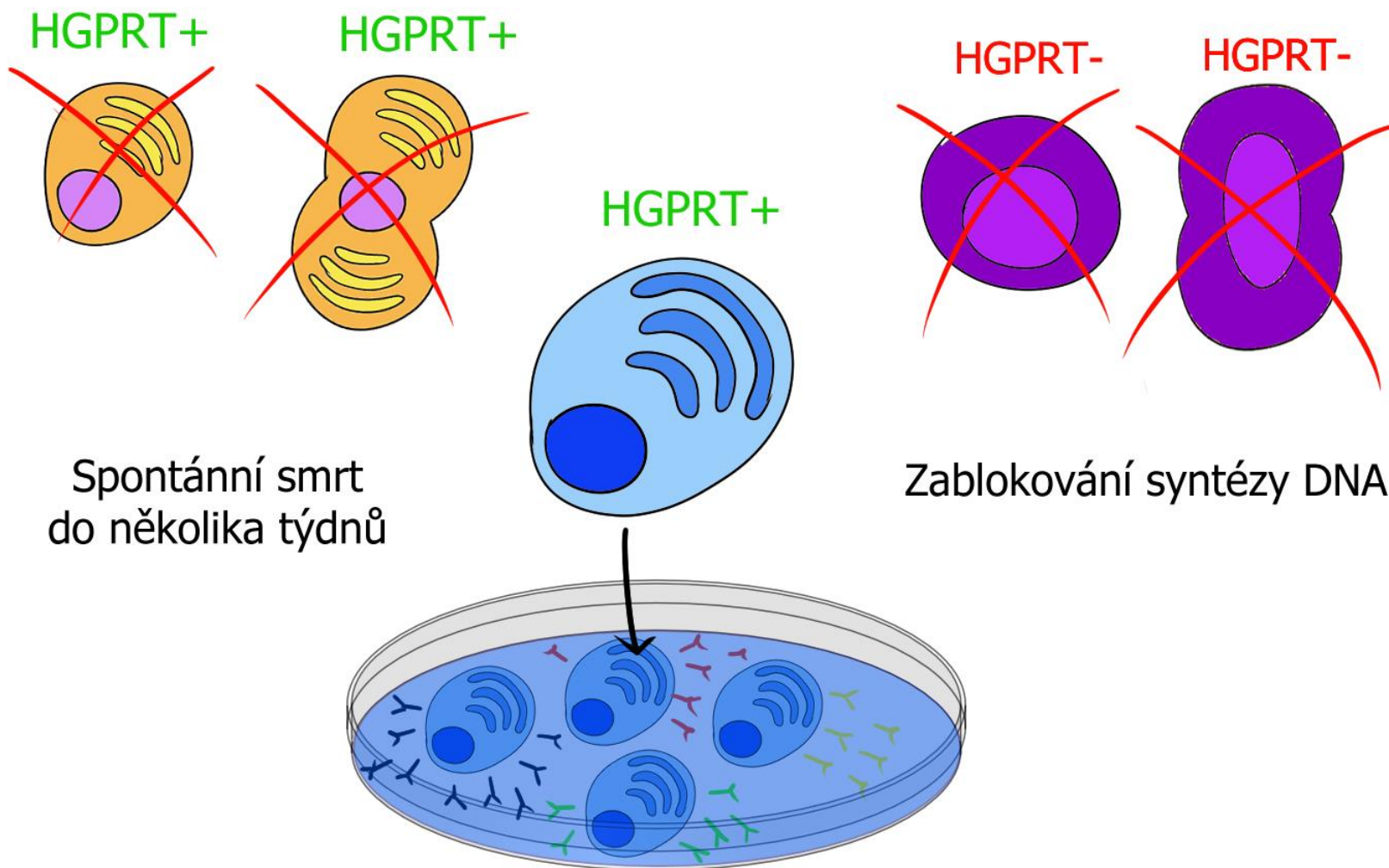


HGPRT = Hypoxantin Guanin
FosfoRibosyl Transferáza



**Aminopterin
blokuje
dihydrofolátreduktázu**

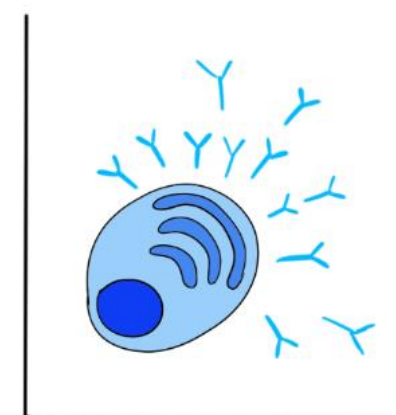
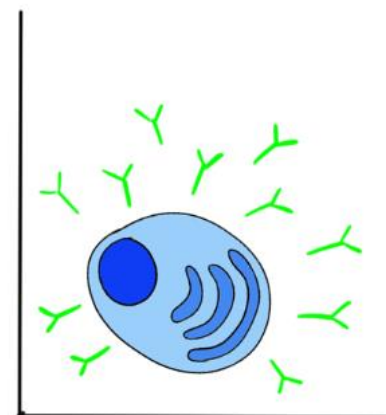
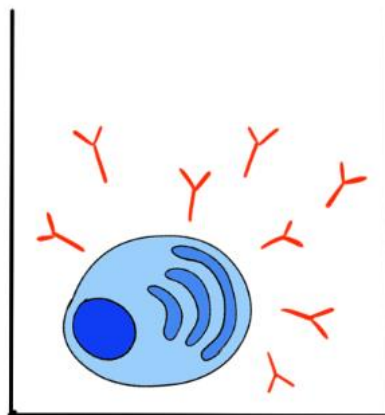
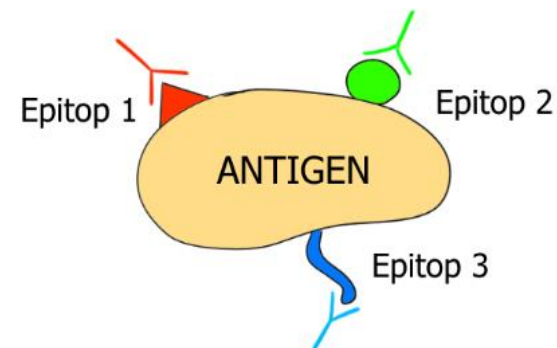
Selekce – enzymatický blok



Výroba monoklonálních protilátek

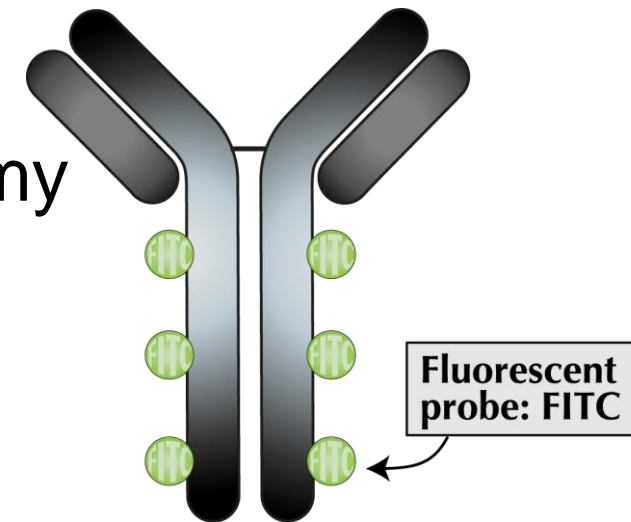
- Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek
- Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

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

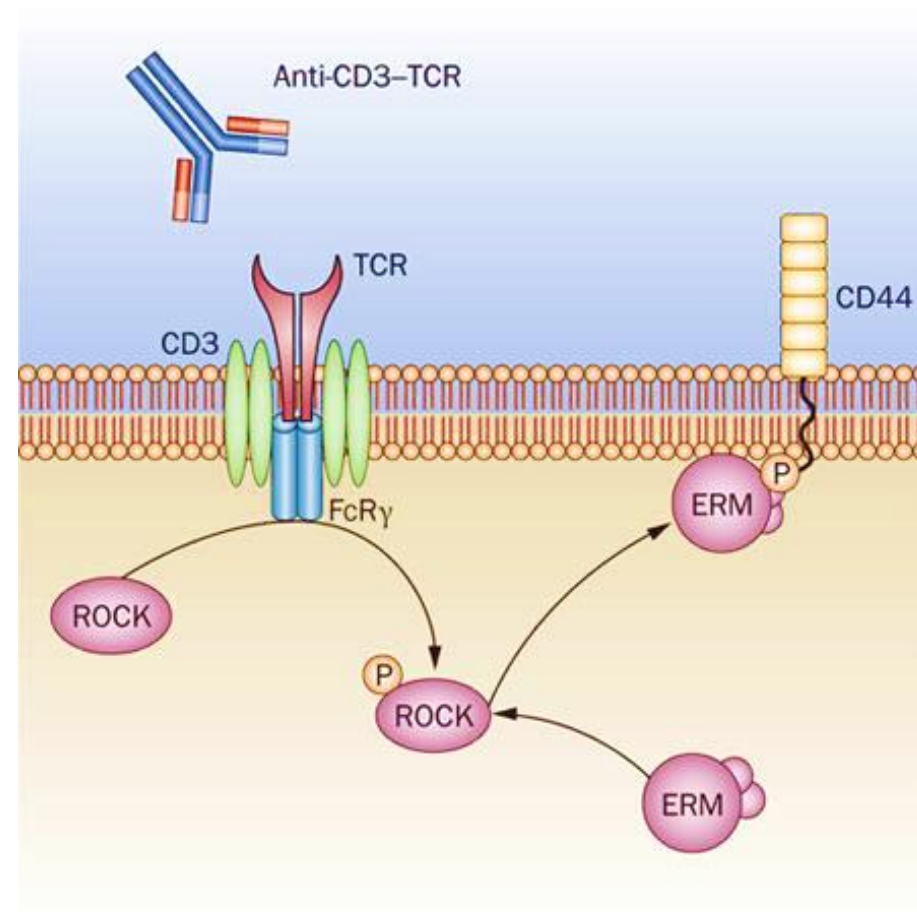
Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

Příklad:

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

- Produkce cytokinů – INF- γ , IL-2
- Proliferace

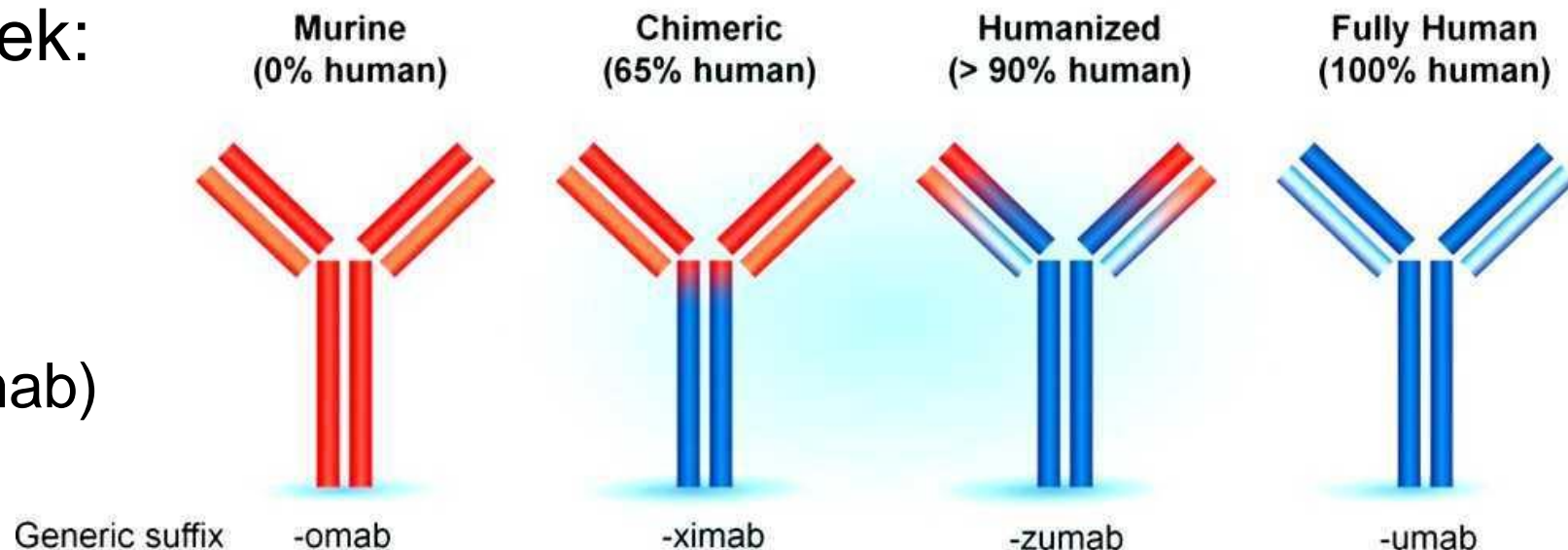


Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

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

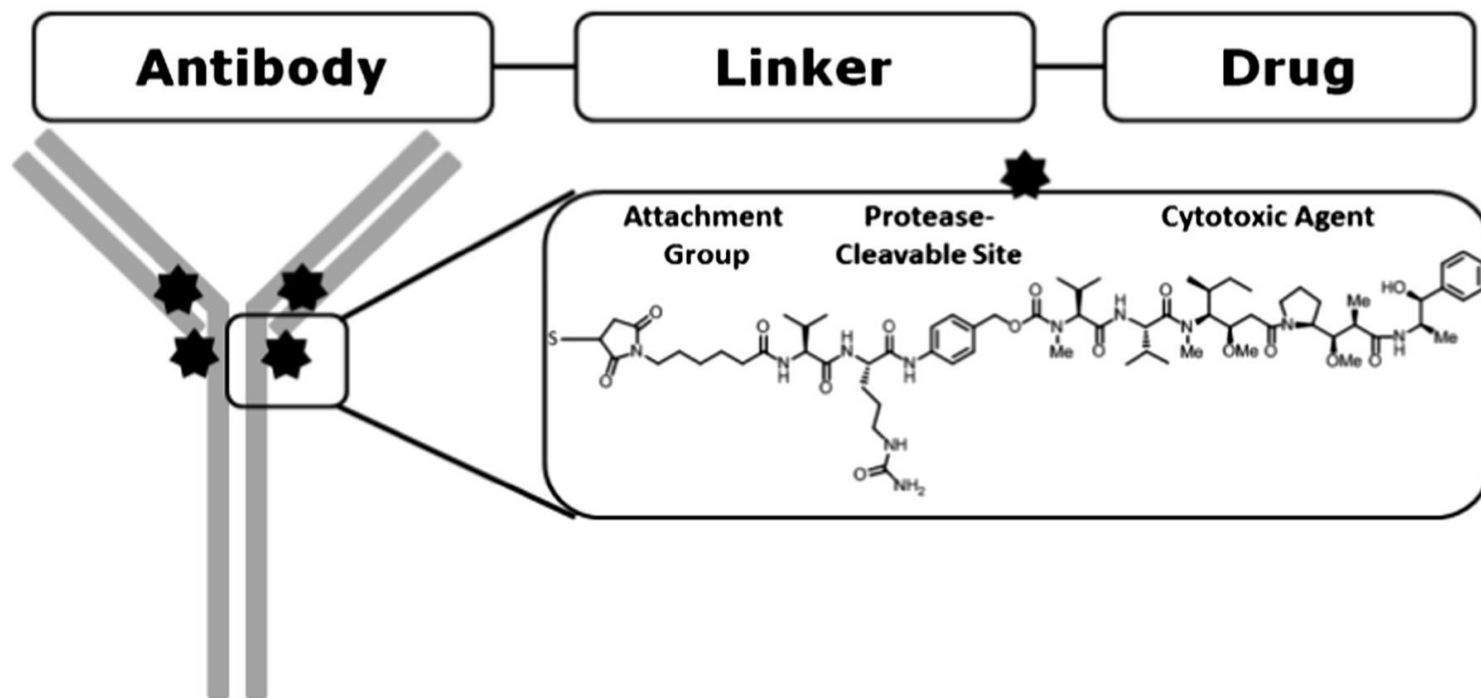
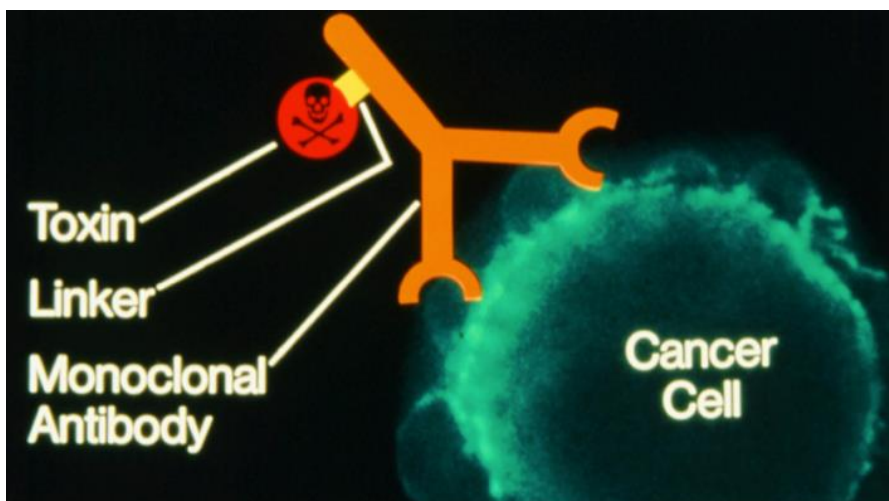


Využití monoklonálních protilátek

- Imunosuprese
 - Anti CD20 (Rituximab): B lymfocytární malignity
- Blokáda prozánětlivých cytokinů
 - Anti TNF- α (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