

Cvičení č. 1

Úvod
Biologický materiál
Protilátky

Mgr. Julie Štíchová
424773@mail.muni.cz

ÚKIA

Ústav Klinické Imunologie a Alergologie

Alergologická ambulance
Alergická onemocnění

Imunologická ambulance
Autoimunity, imunodeficience

Laboratoř

Buněčná část

Serologická část

Rozdělení imunologických laboratorních metod

Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



Lymphocyte



Monocyte



Eosinophil



Basophil



Neutrophil

- Absolutní a relativní počty
- Funkční vlastnosti

Serologická laboratoř

Stanovení proteinů v séru

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

Laboratorní vyšetření

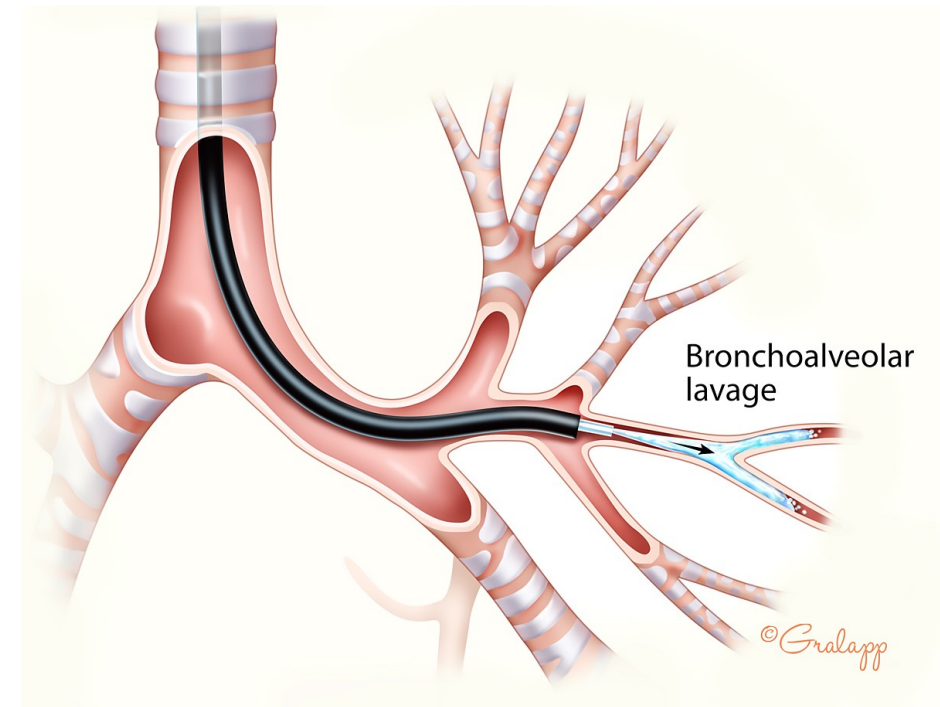
- **Fáze preanalytická**
 - **Mimolaboratorní** – příprava pacienta, odběr, žádanka, transport
 - **Laboratorní** – příjem materiálu, centrifugace, vytvoření alikvotů se štítky
- **Fáze analytická**
 - Vlastní laboratorní vyšetření, kalibrace metody + kontroly, dokonalý technický stav přístrojů
- **Fáze postanalytická**
 - Laboratorní – skladování vzorku, zisk výsledků → vydání nálezu
 - Mimolaboratorní – účelné využití výsledků k diagnostice/léčbě

Biologický materiál

- **Žilní krev** – uzavřené odběrové systémy
- Méně často BAL (bronchoalveolární laváž)

- Každý biologický materiál doprovází žádanka

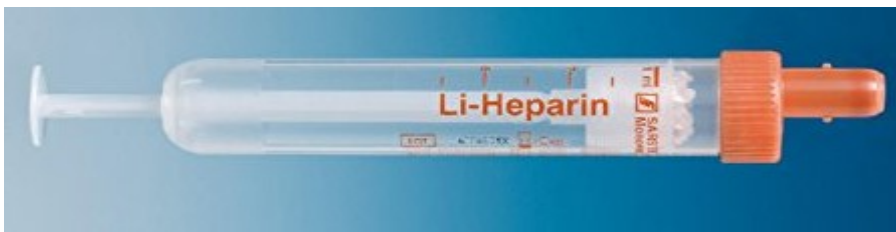
- Svoz:
 - V rámci nemocnice – ruční donáška
 - Externí materiál – svoz autem (2krát za den)



Biologický materiál

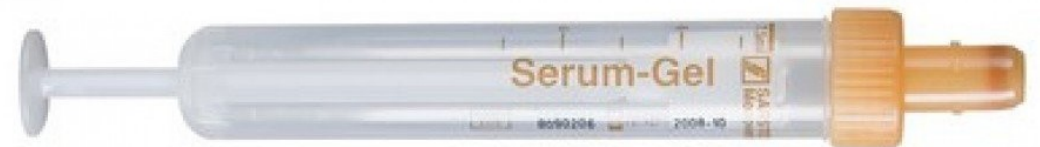
Plazma

- 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

Buněčná laboratoř

EDTA



Vyšetření
lymfocytárních
subpopulací

HEPARIN



Funkční testy
leukocytů

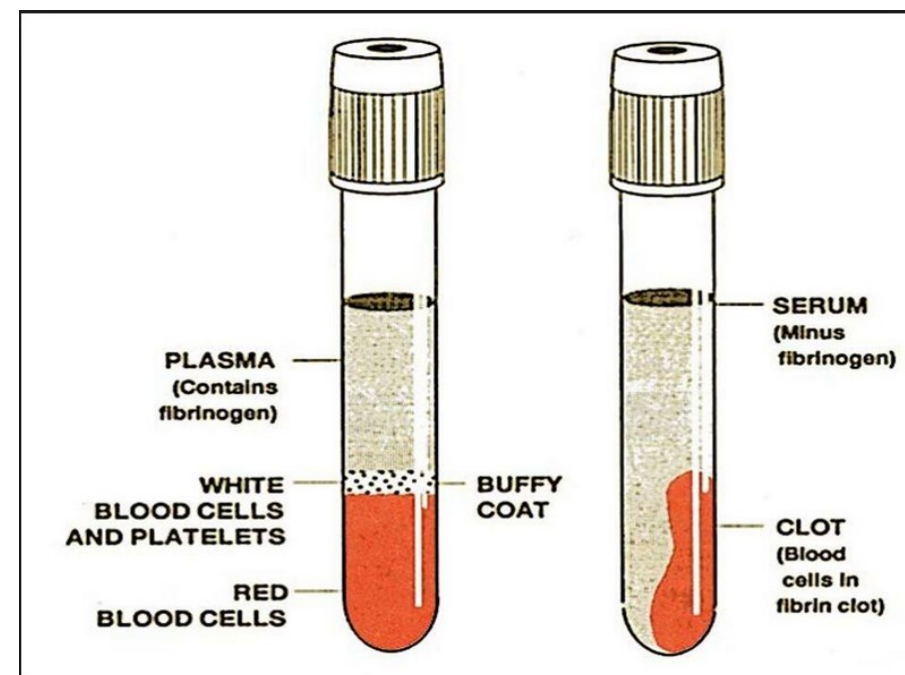
Serologická laboratoř

SERUM-GEL



Příjmová laboratoř - sanitáři

- Příprava séra – centrifugace (2000 otáček/min, 10 min)
- Příprava alikvotů pro metody → štítky
- Kontrola, zda je objem séra dostatečný pro všechny požadované metody
- Speciální metody – zamrazení sér



Imunoglobuliny

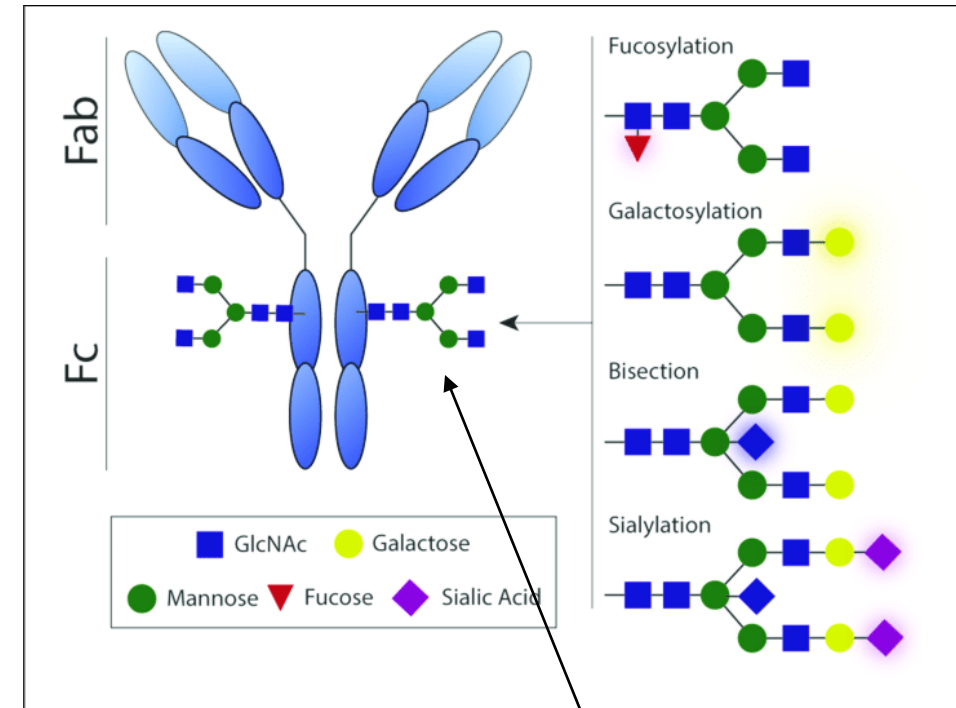
Chemické složení: **glykoproteiny**

Význam pro obratlovce:

- Humorální složka adaptivní imunity
- Ochrana před extracelulárními patogeny
- Neutralizace virů a toxinů
- Odstraňování poškozených struktur

Význam pro medicínu:

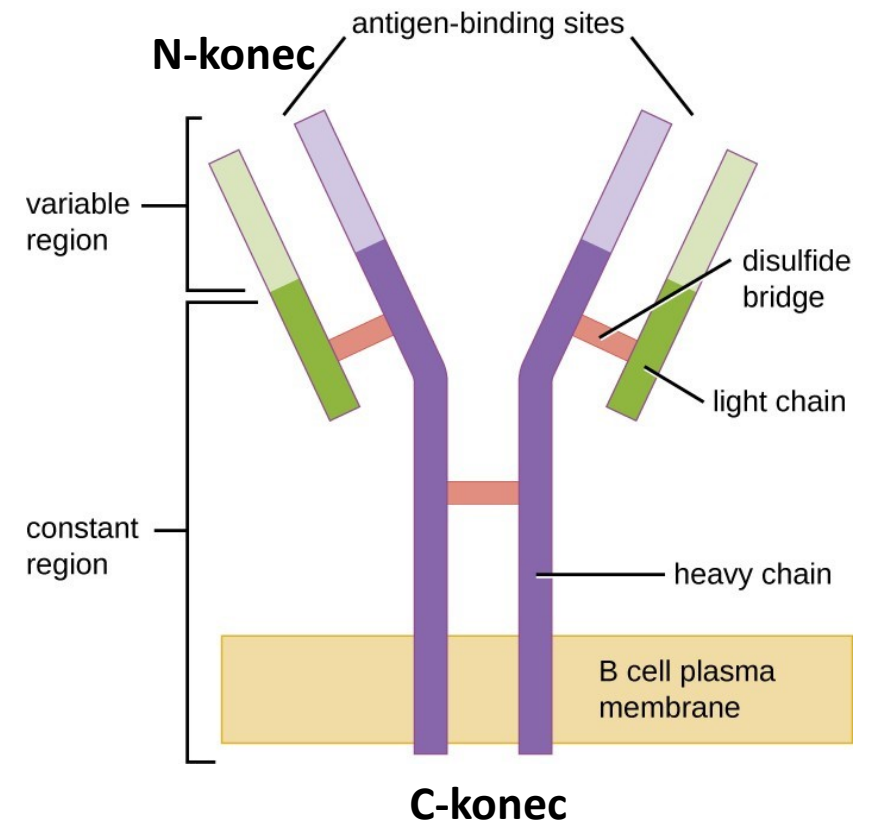
- Reakce protilátky s antigenem je základem mnohých laboratorních testů
- Biologická léčba

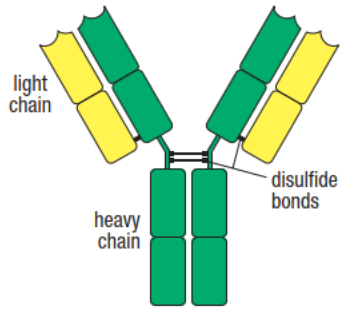


Glykosylace v
Fc fragmentu

Imunoglobuliny

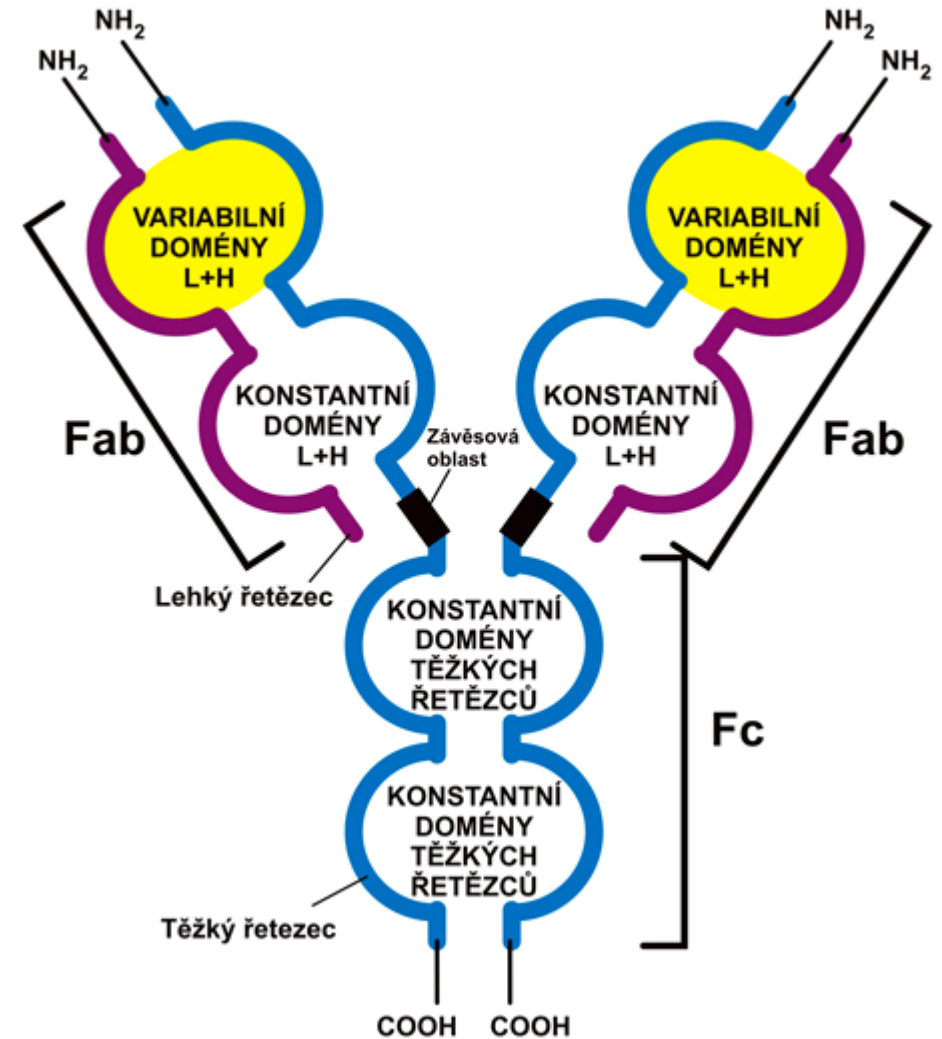
- Produkty terminálně diferencovaných B-lymfocytů
- Sekretovaná forma B-cell receptoru (BCR)
 - Membránová forma – karboxy konec těžkého řetězce obsahuje úsek cca 20 hydrofobních AK – ukotvení
 - Sekretovaná forma – hydrofilní AK – umožňují sekreci





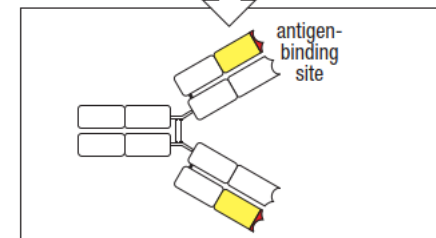
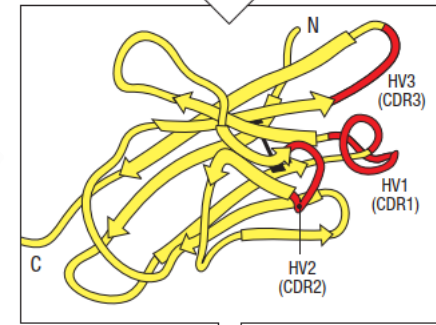
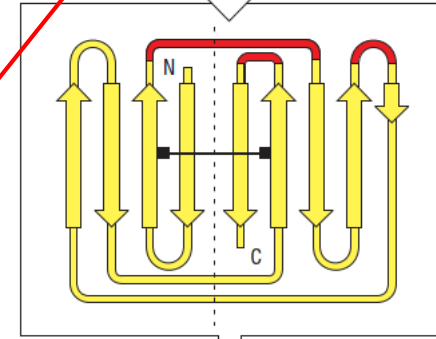
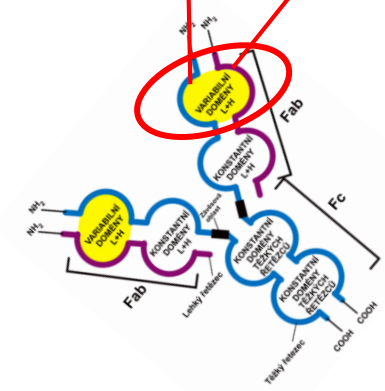
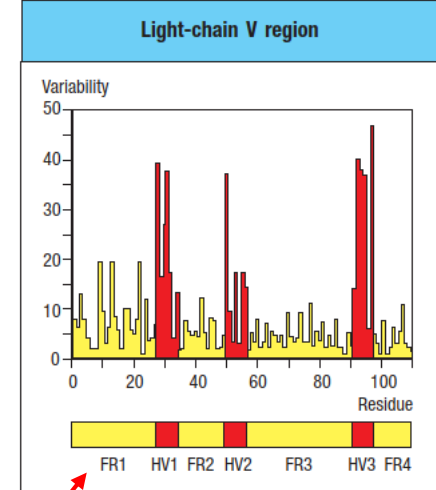
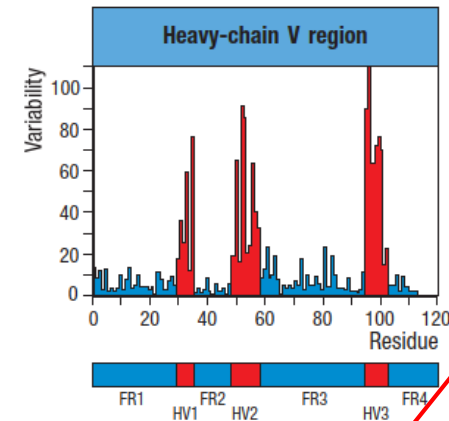
Struktura imunoglobulinu

- 2 těžké (H) + 2 lehké řetězce (L)
- Spojení – kovalentní disulfidické můstky
- Pantová / závěsová oblast - flexibilita
- L řetězec – 1 variabilní + 1 konstantní doména
- H řetězec – 1 variabilní + 3-4 konstantní domény
- 2 Fab fragmenty – variabilní oblasti – **vazba antige**
- 1 Fc fragment – **efektorová funkce**



Struktura imunoglobulinu

- H i L řetězec – domény
- Každá doména cca 110-120 aminokyselin
- Ve variabilních oblastech H a L řetězce
 - **Hypervariabilní úseky** – místa s nejvyšší variabilitou AK
 - Ve 3D struktuře vytvářejí vazebné místo pro Ag
 - Variabilní oblasti H a L řetězce mají 3 hypervariabilní úseky



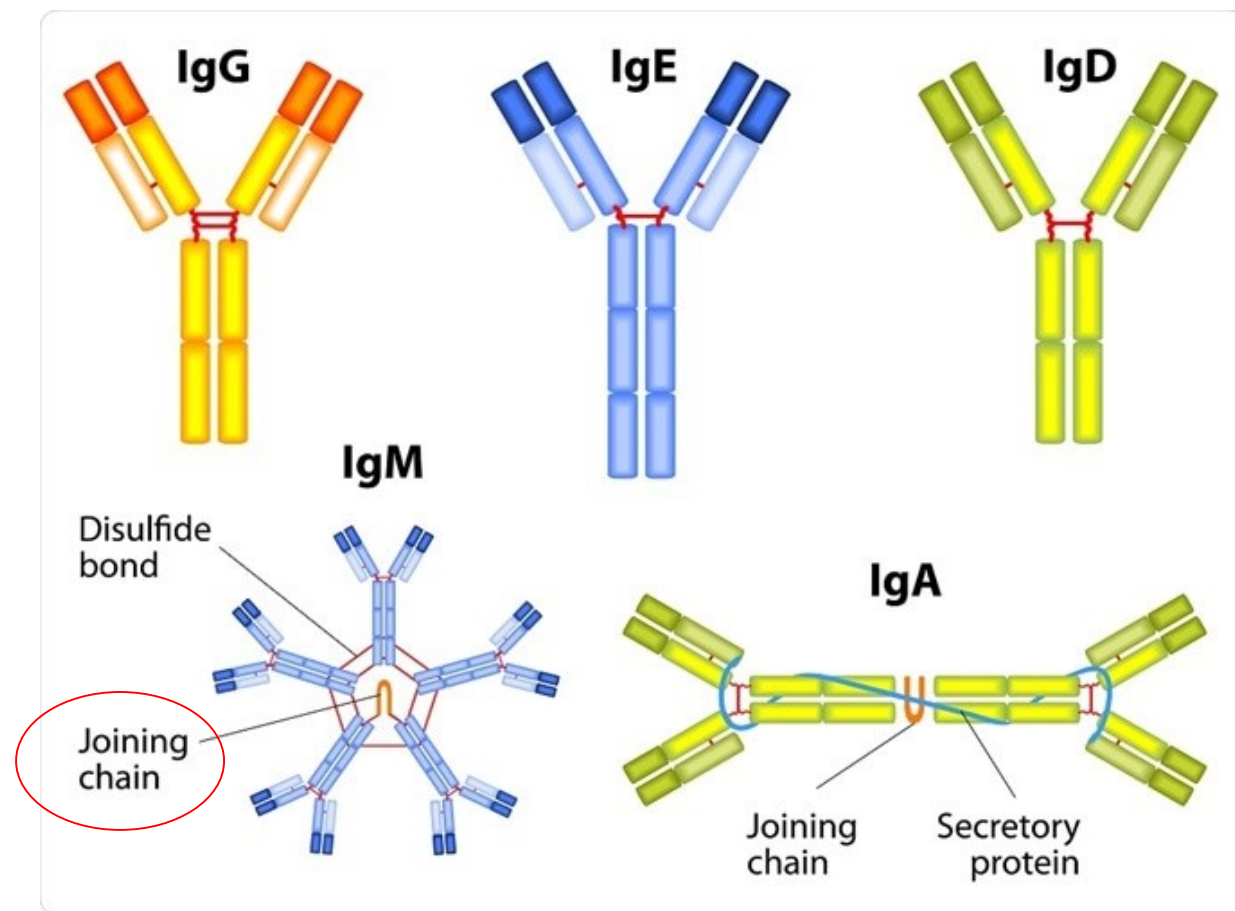
Třídy imunoglobulinů

- 5 tříd – podle typu **konstantní** části těžkého řetězce
- IgG - monomer
 - 4 podtřídy IgG₁-IgG₄
- IgA - monomer, dimer
 - 2 podřidy IgA₁, IgA₂

IgE - monomer

IgD - monomer

IgM - monomer, pentamer – při imunizaci se tvoří jako první

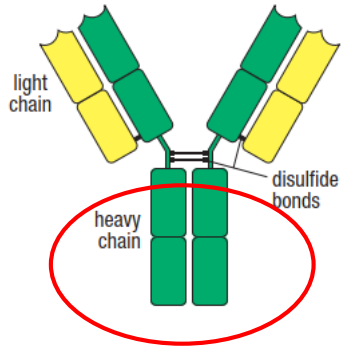


Lehké řetězce

- Jsou dvojího typu – lambda (λ) a kappa (κ)
- Funkčně mezi nimi není rozdíl
- U člověka je jejich poměr **2:1**
- Odlišnosti v poměru mohou upozornit na malignitu z B-lymfocytů
- V 1 molekule imunoglobulinu jsou vždy stejné lehké řetězce!

Imunoglobuliny různých tříd mají specifické funkce

efektorové funkce určuje Fc fragment



Functional activity	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralization	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonization	+	-	++	*	++	+	+	-
Sensitization for killing by NK cells	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensitization of mast cells	-	-	+	-	+	-	-	+++
Activates complement system	+++	-	++	+	+++	-	+	-

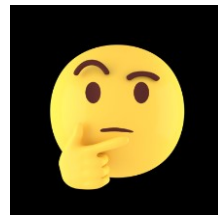
Imunoglobuliny různých tříd mají různý biologický poločas

- Imunoglobuliny jsou v těle postupně metabolizovány
- Ztráty jsou doplňovány tvorbou nových protilátek (plazmatické buňky v kostní dřeni, B-1 lymfocyty)

- Nejdéle v těle setrvává IgG – **21 dní**
- IgM a IgA - 6 dní
- IgD – 3 dny
- Nejrychleji se metabolizuje IgE - 2 dny

Referenční meze pro dospělého

- IgG – 7,5 - 15,5 g/l
 - IgG1 → IgG2 → IgG4 → IgG3
- IgA - 0,8 – 4,5 g/l
 - IgA1 → IgA2
- IgM – 0,5 – 3 g/l
- IgE < 100 kU/l
- IgD < 100 IU/ml

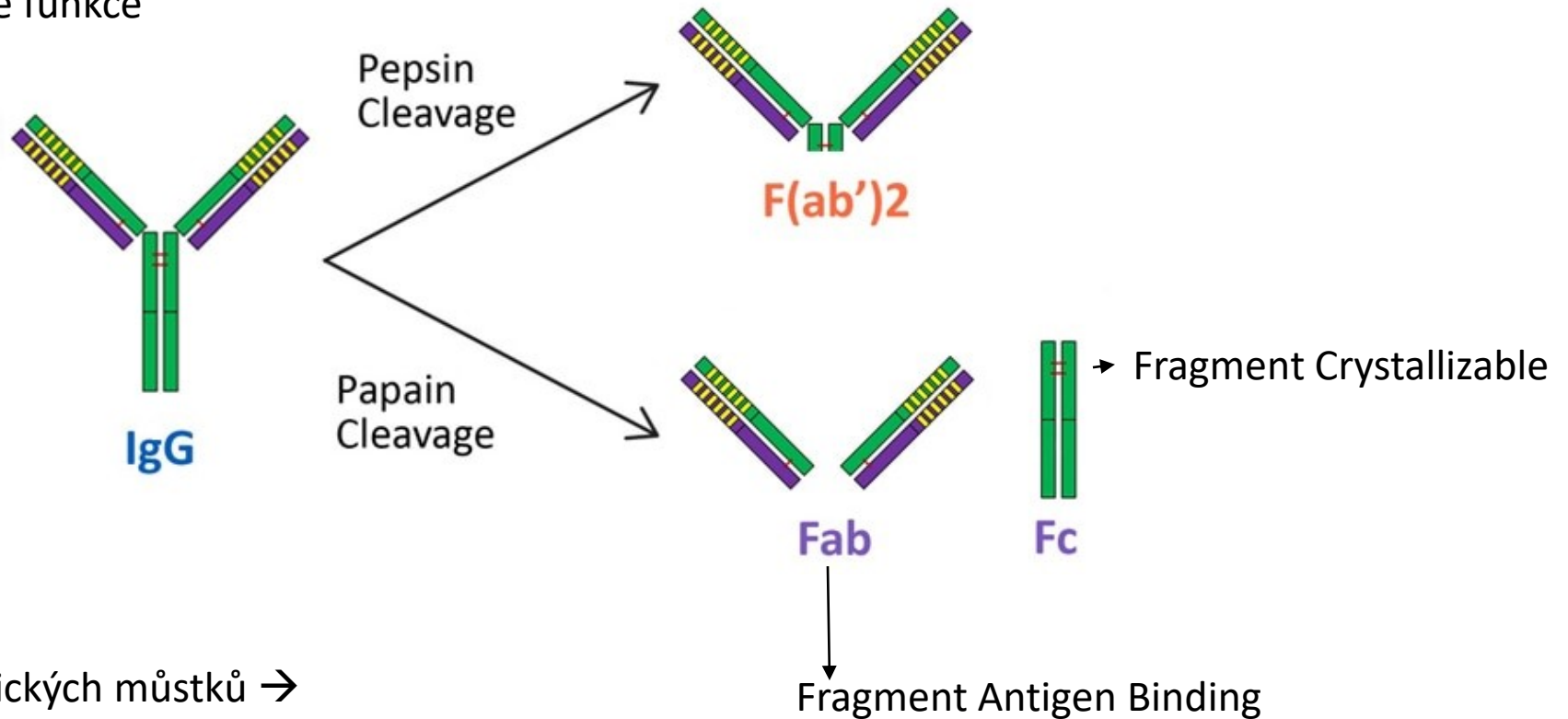


Kterou třídu Ig vytvoří lidské tělo nejvíce za 24 h?

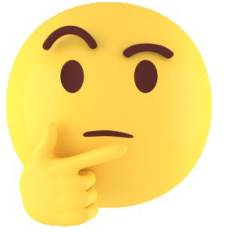
Štěpení imunoglobulinů enzymy (historické poznání struktury)

Pepsin štěpí C-konce disulfidických můstků →

Fab fragmenty spojeny (stejná funkce jako v originální molekule), Fc fragment degradován, ztráta efektorové funkce



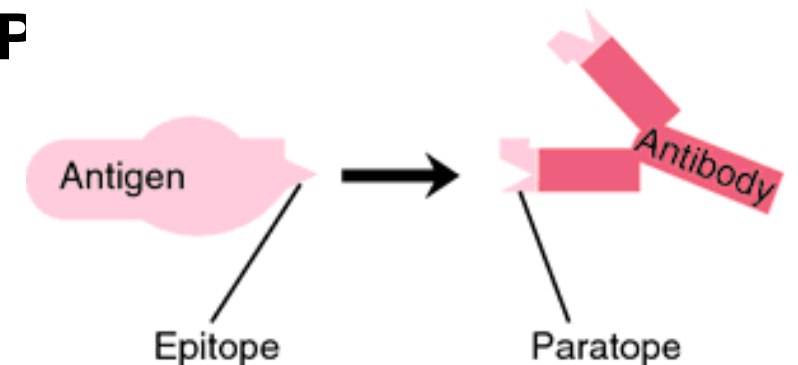
Papain štěpí N-konce disulfidických můstků →
2 identické oddělené fragmenty Fab a 1 Fc



Jaký je rozdíl mezi imunoglobulinem a protilátkou?

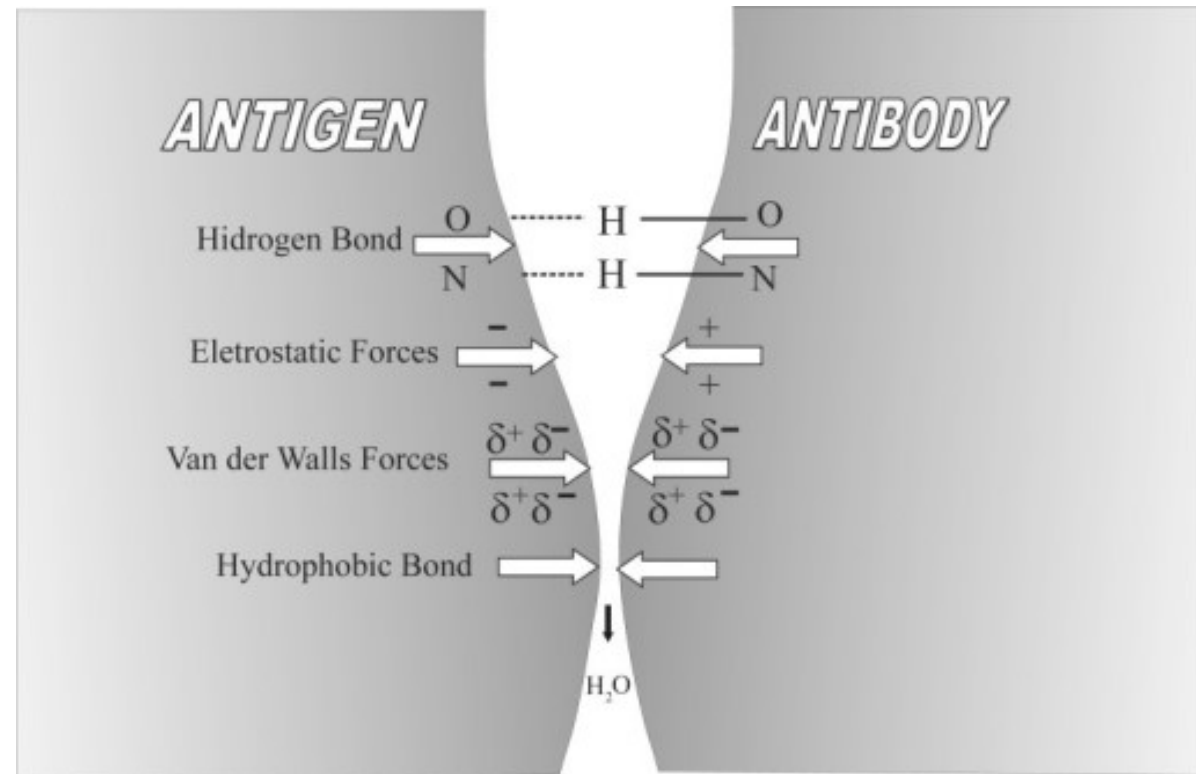
Principy reakce antigen-protilátka

- **Imunogen** – látka na niž imunita reaguje (např. aktivace fagocytů)
- **Antigen (Ag)**
 - Látka schopná vyvolat tvorbu **protilátek**
 - Konkrétní místo na jeho povrchu, kam se váže protilátka – **EPITOP**
- **Protilátka (Ab)**
 - Specifický produkt terminálních vývojových stádií B lymfocytů
 - Místo, které reaguje s epitopem antigenu – **PARATOP**



Vazba mezi Ag a Ab je reverzibilní

- Slabé nevazebné interakce
- Vazba se vyznačuje určitou rychlostí vzniku a rozpadu
- Jejich poměr:
Rovnovážná konstanta K_{as}
- Čím je K_{as} vyšší, tím je afinita protilátky k antigenu vyšší



Afinita vs avidita protilátek

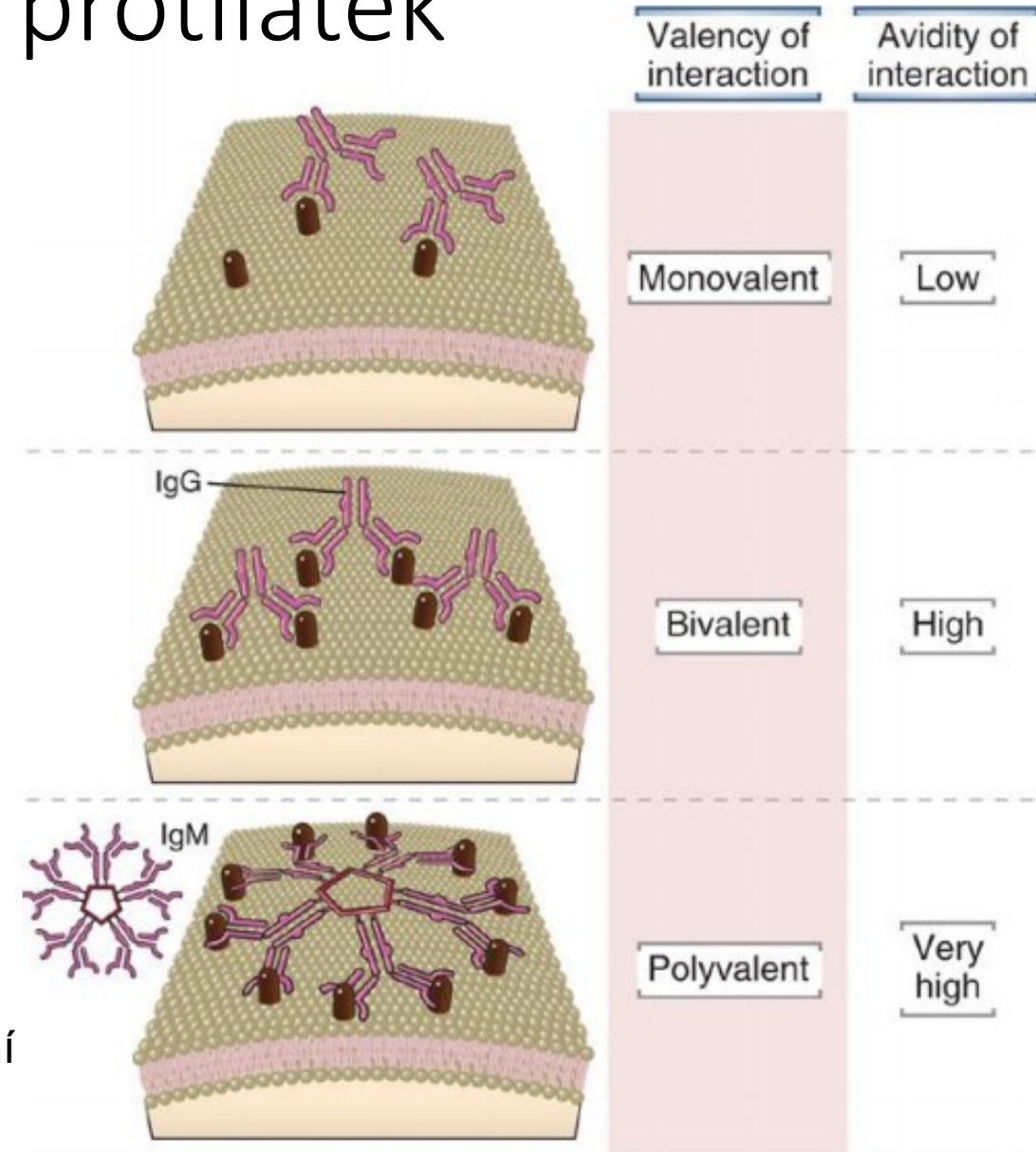
- **Afinita**

- síla interakce mezi 1 paratopem Ab a 1 epitopem 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

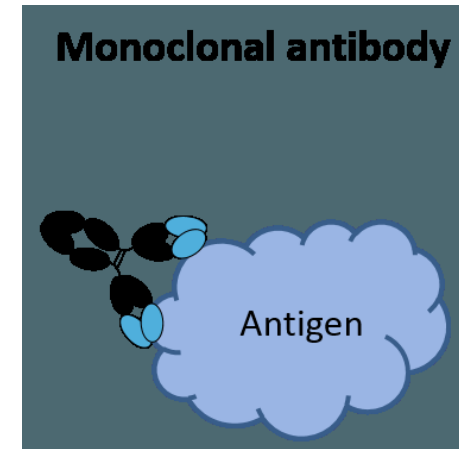
- IgM má nízkou afinitu k antigenu, ale vyrovnává ji vyšším počtem vazebných míst
- IgG – vysoká afinita (viz proces izotypový přesmyk, afinitní turace)



Protilátky mohou být

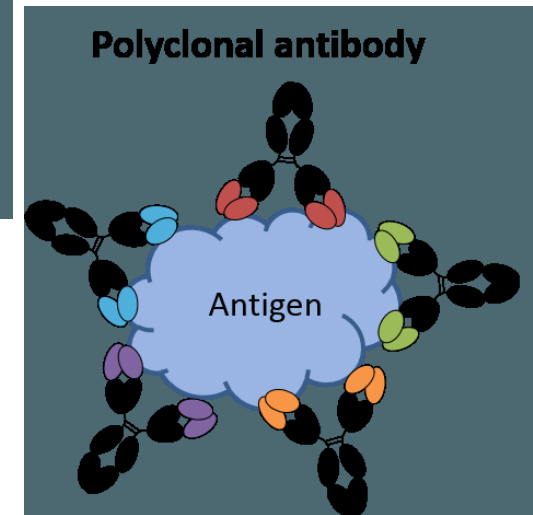
- Monoklonální

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



- Polyklonální

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



Výroba polyklonálních protilátek

Výroba polyklonálních protilátek

1. Výběr vhodného antigenu

- Nutná vysoká čistota – přečištění chromatografie, ELFO

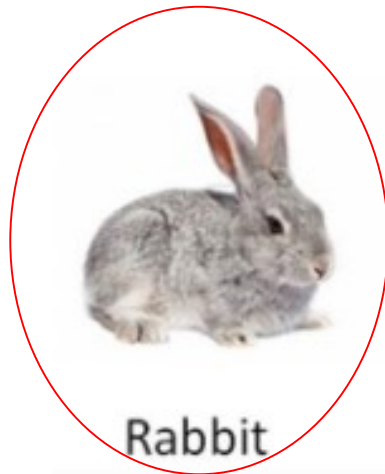
2. Zvýšení afinity antigenu k buňkám imunitního systému

- Problém – solubilní antigeny špatně aktivují imunitní systém
- **ADJUVANCIA** – zvyšují imunogenost 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 nejdálenější druh vzhledem k povaze antigenu



Rabbit



Sheep



Goat



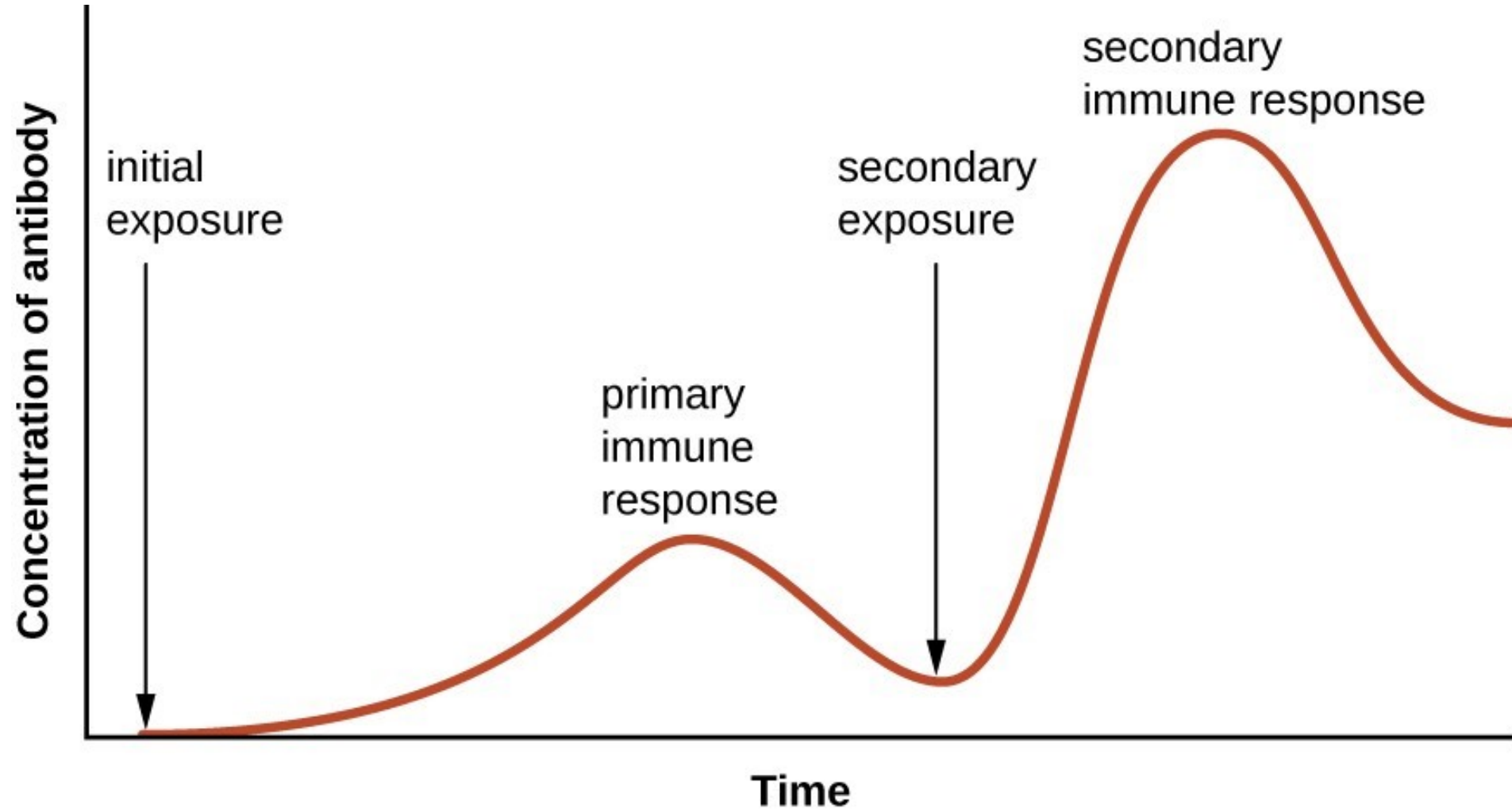
Llama

4. Způsob aplikace – nejčastěji intradermálně, subkutánně

- Antigen je vychytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

Výroba polyklonálních protilátek

opakovaná expozice antigenu – booster dávka



Výroba polyklonálních protilátek

5. Sběr krve

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

6. Získání 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

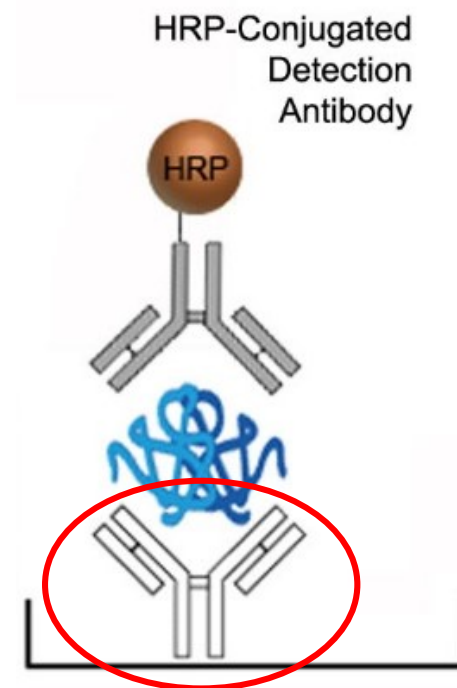
Léčba

- Antiséra proti hadím jedům

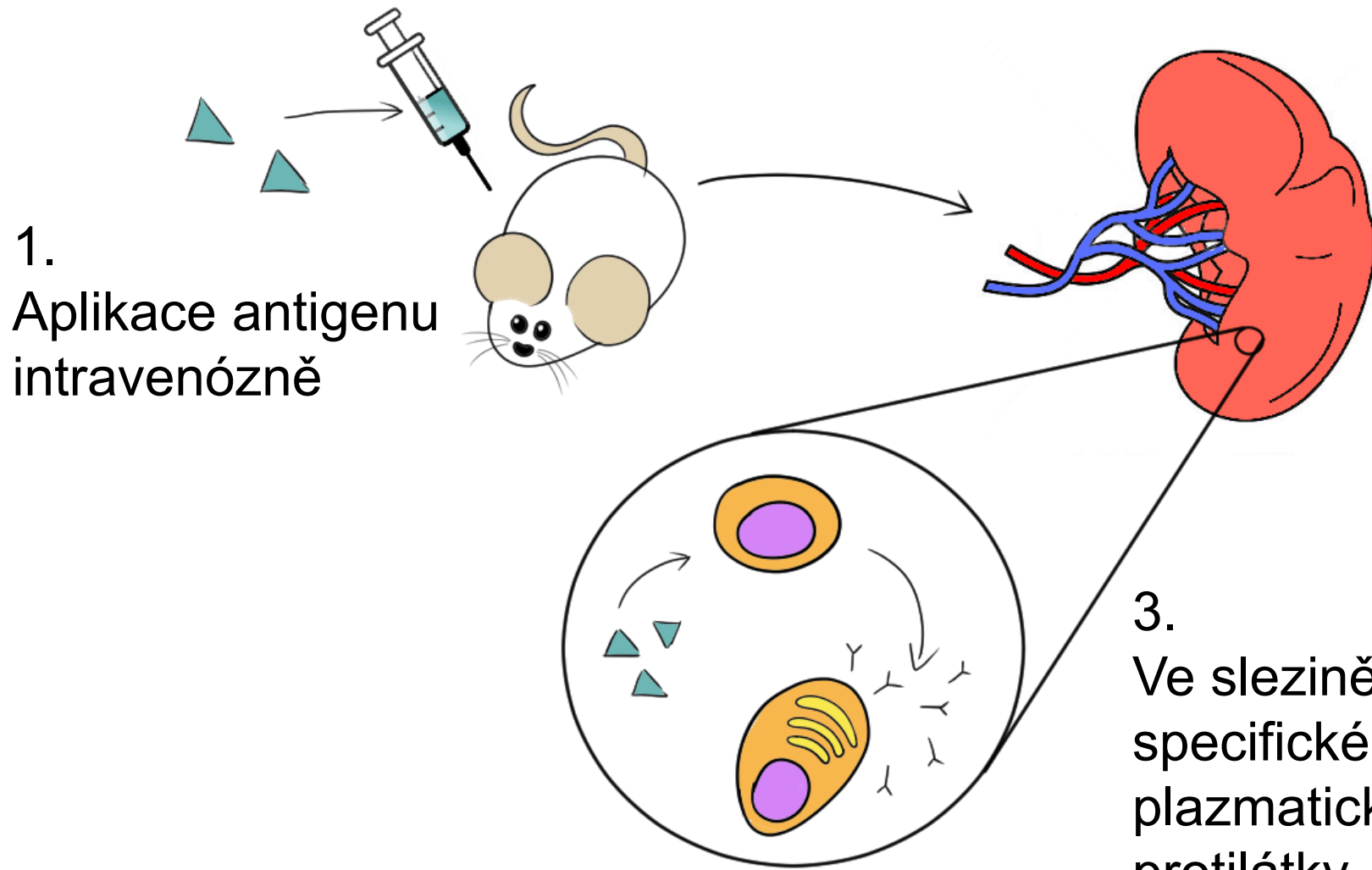


ELISA

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



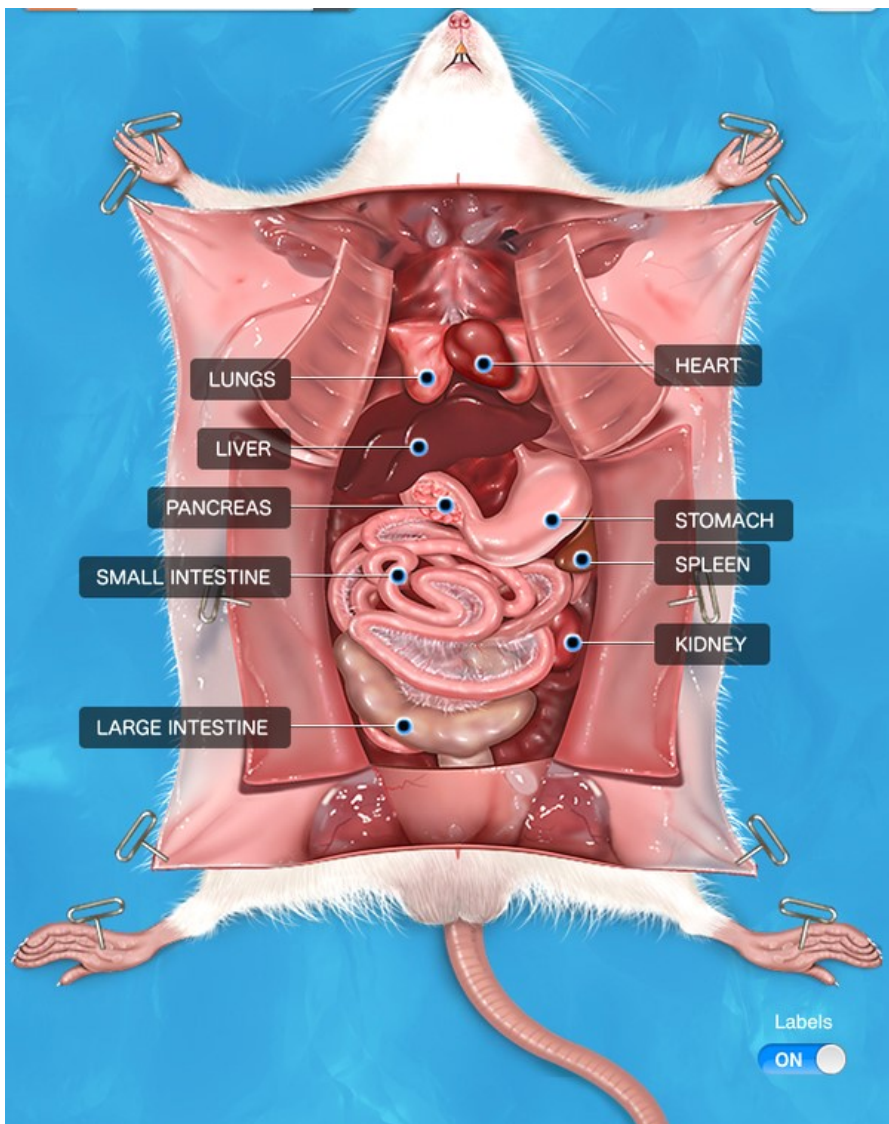
Výroba monoklonálních protilátek



2. Antigeny jsou krví zaneseny do **sleziny** – zde je imunitní odpověď na antigen maximální

3. Ve slezině diferencují antigen specifické B lymfocyty do plazmatických buněk, které produkují protilátky

Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny

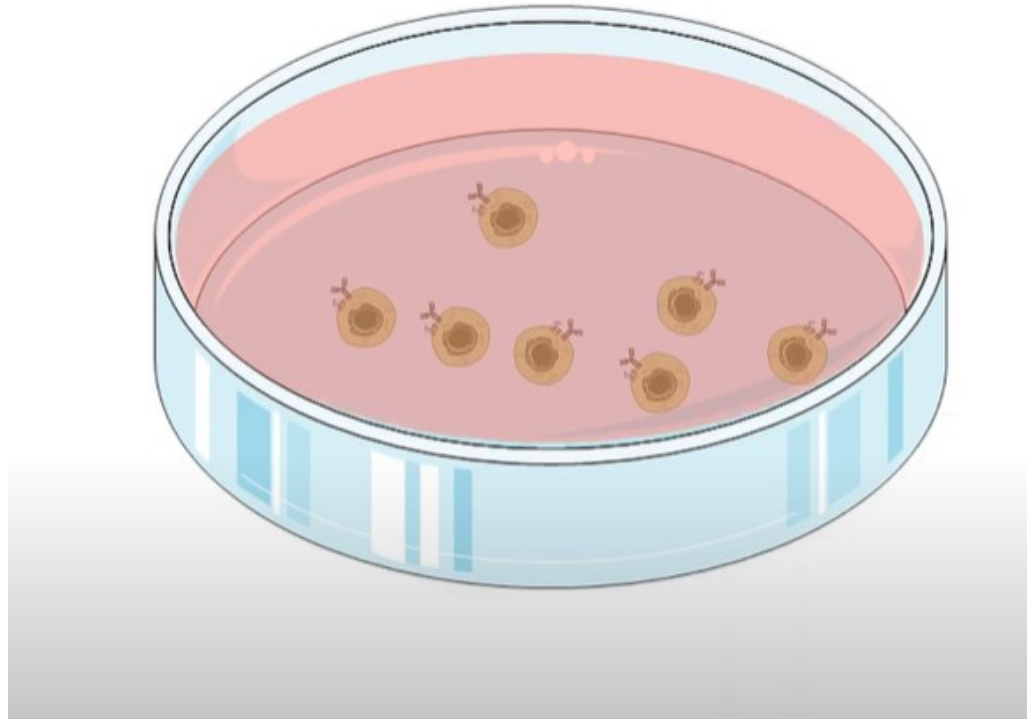


Problém

Izolované B-lymfocyty dlouho nepřežijí

Jak tedy získat dostatek protilátek?

B cells survive for not more than a week!



Výroba monoklonálních protilátek

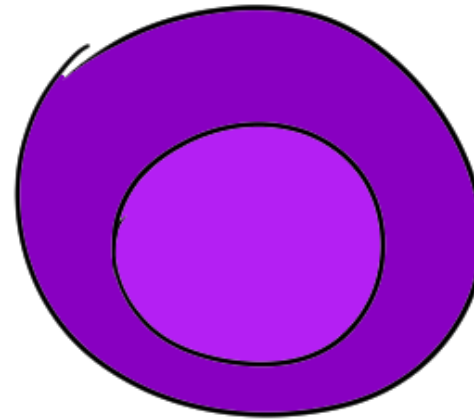
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

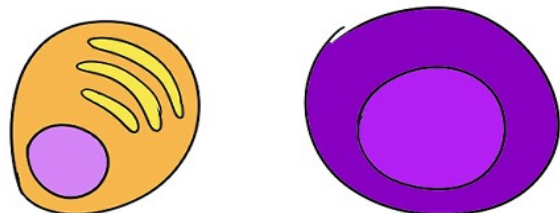


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

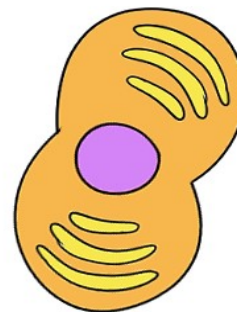
6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

Výroba monoklonálních protilátek

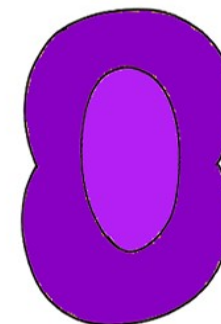
Nezfúzované B lymfocyty
a myelomové buňky



Zfúzované
B lymfocyty



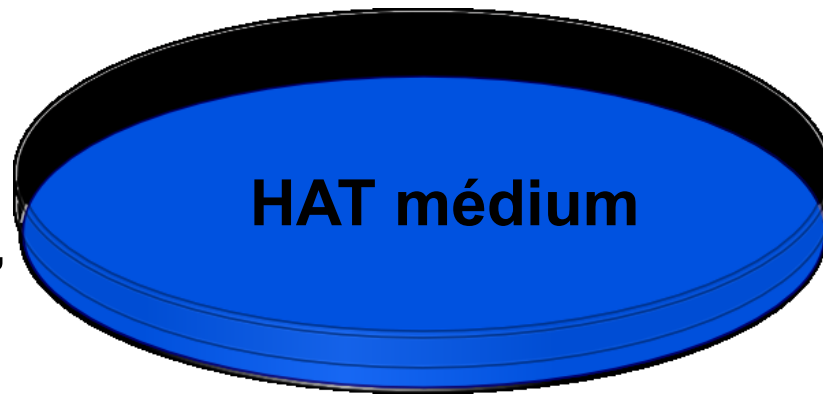
Zfúzované myelomové
buňky



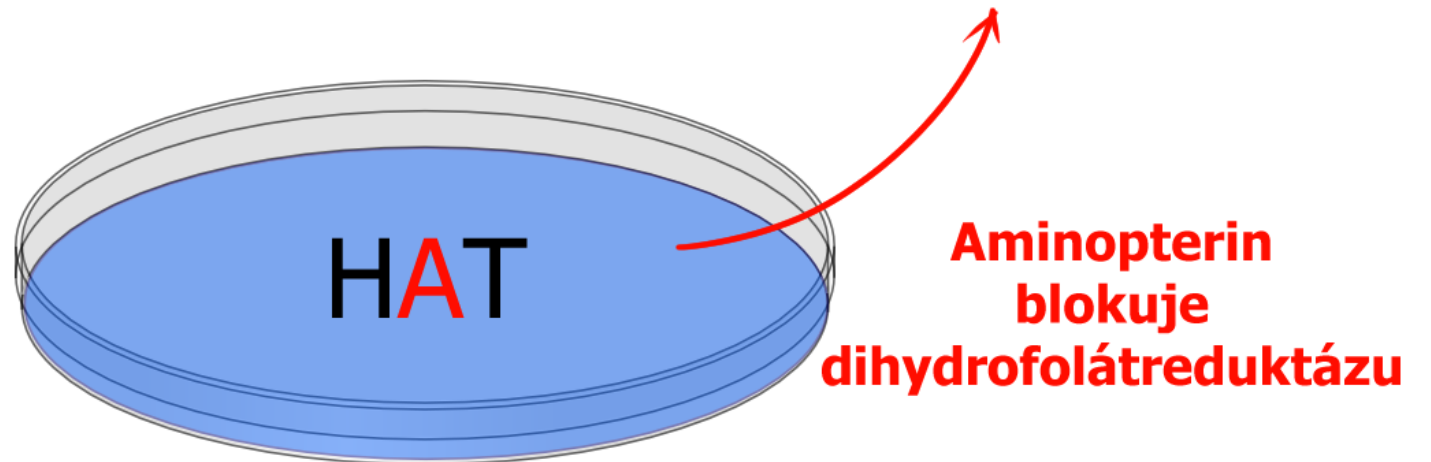
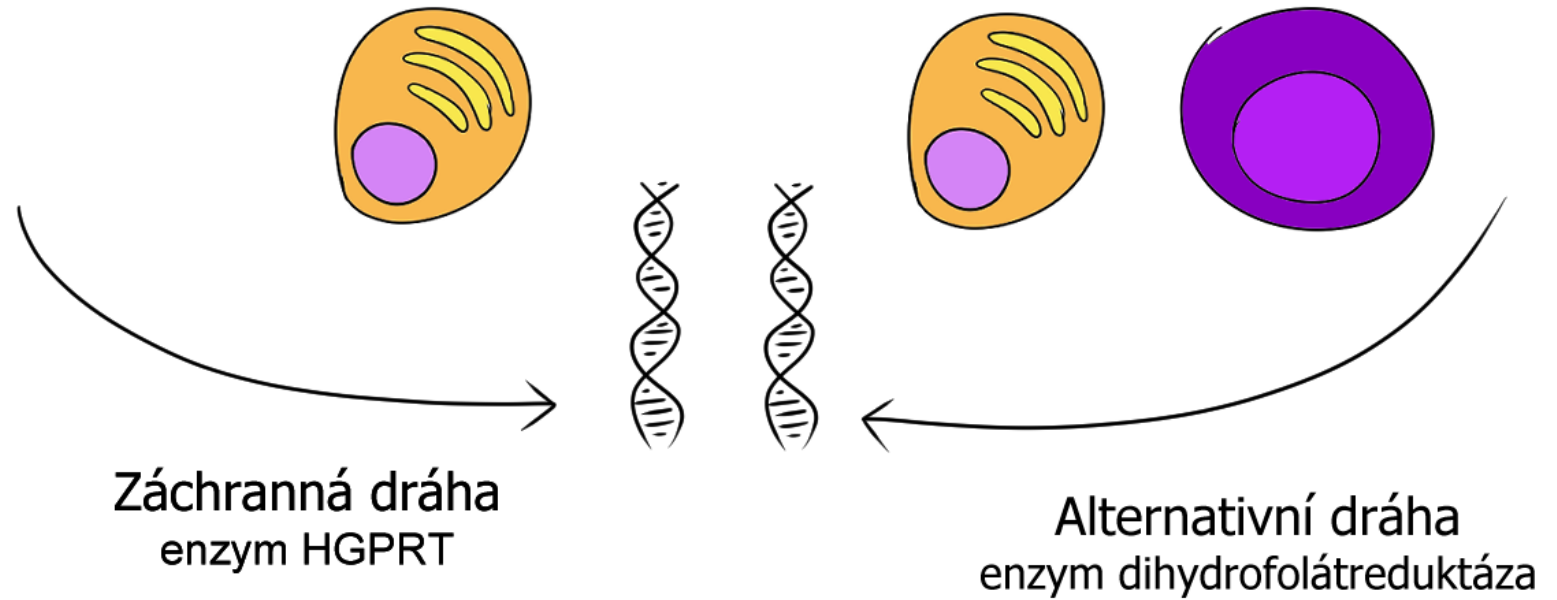
HYBRIDOM



7. Buněčná směs je
kultivována v selekčním
HAT médiu
(Hypoxantin, Aminopterin,
Thymin)

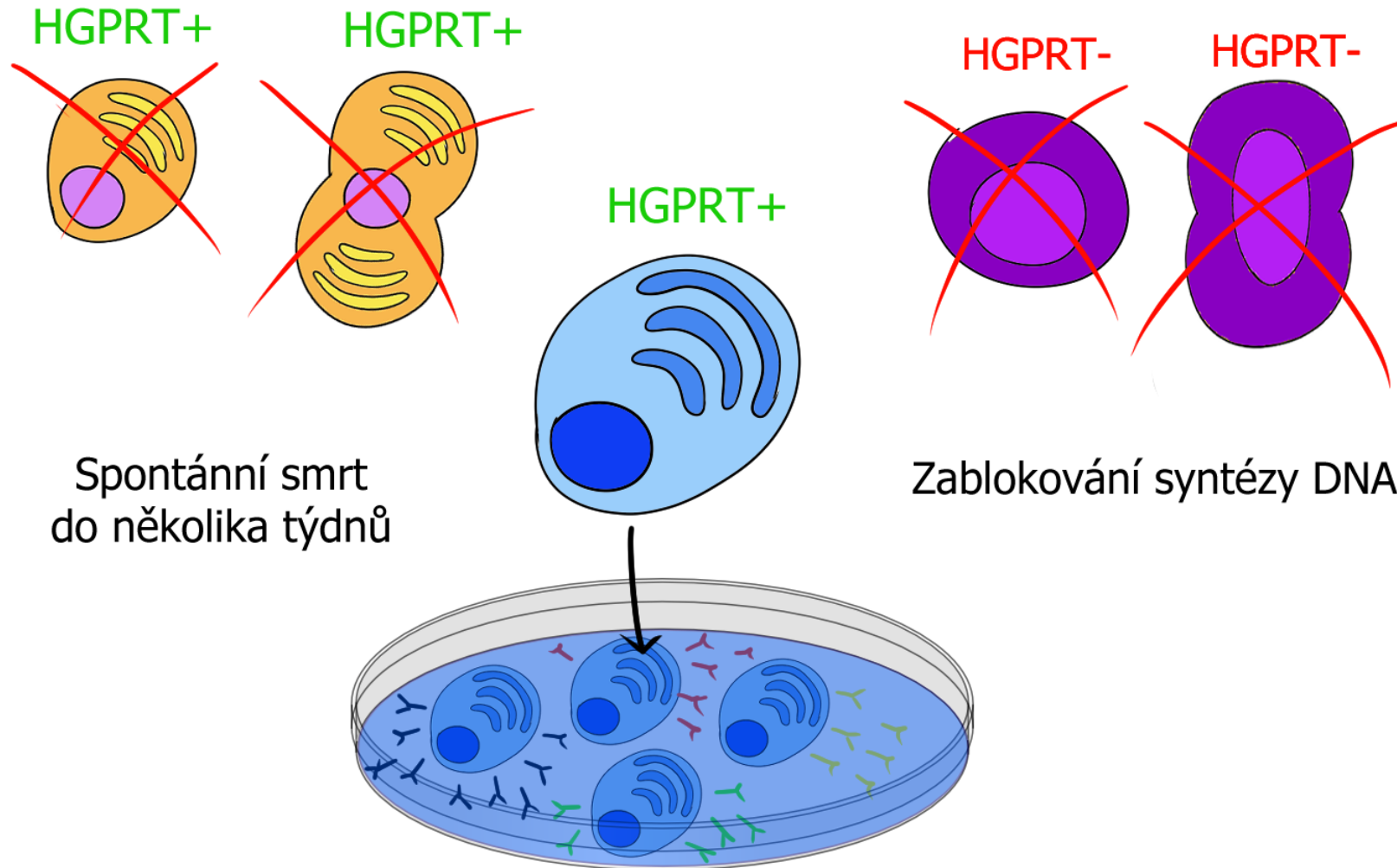


Selekce – enzymatický blok



HGPRT = Hypoxantin
Guanin
FosfoRibosyl Transferáza

Selekce – enzymatický blok

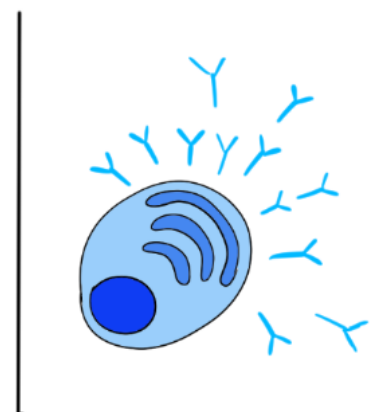
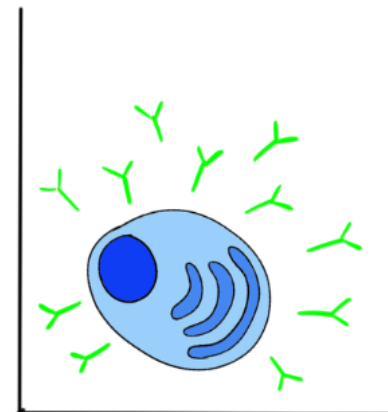
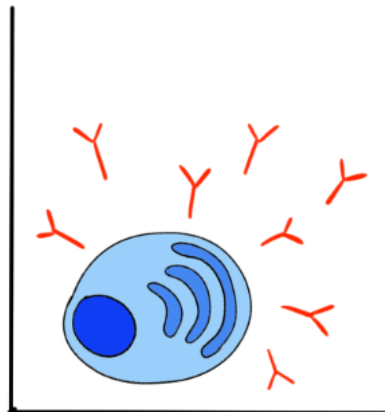
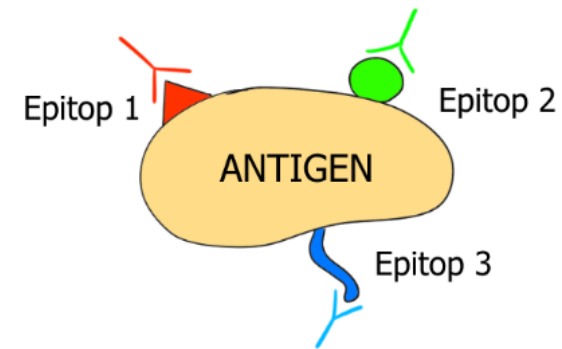


Výroba monoklonálních protilátek

8. Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek

9. Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

10. Přechištění, kvantifikace, validace



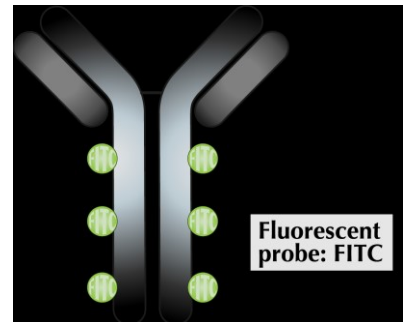
Využití monoklonálních protilátek

- 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

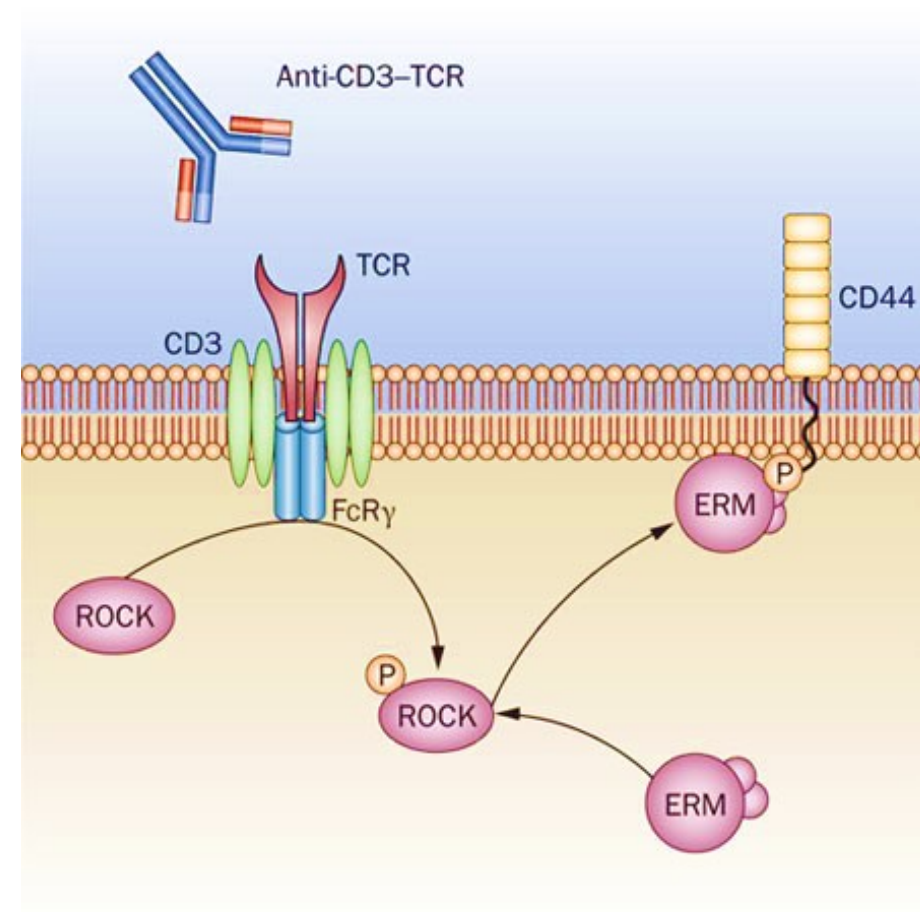
Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

Příklad:

- Anti CD3/CD28 – váže se na CD3 ko-receptor T lymfocytů a aktivuje je →

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

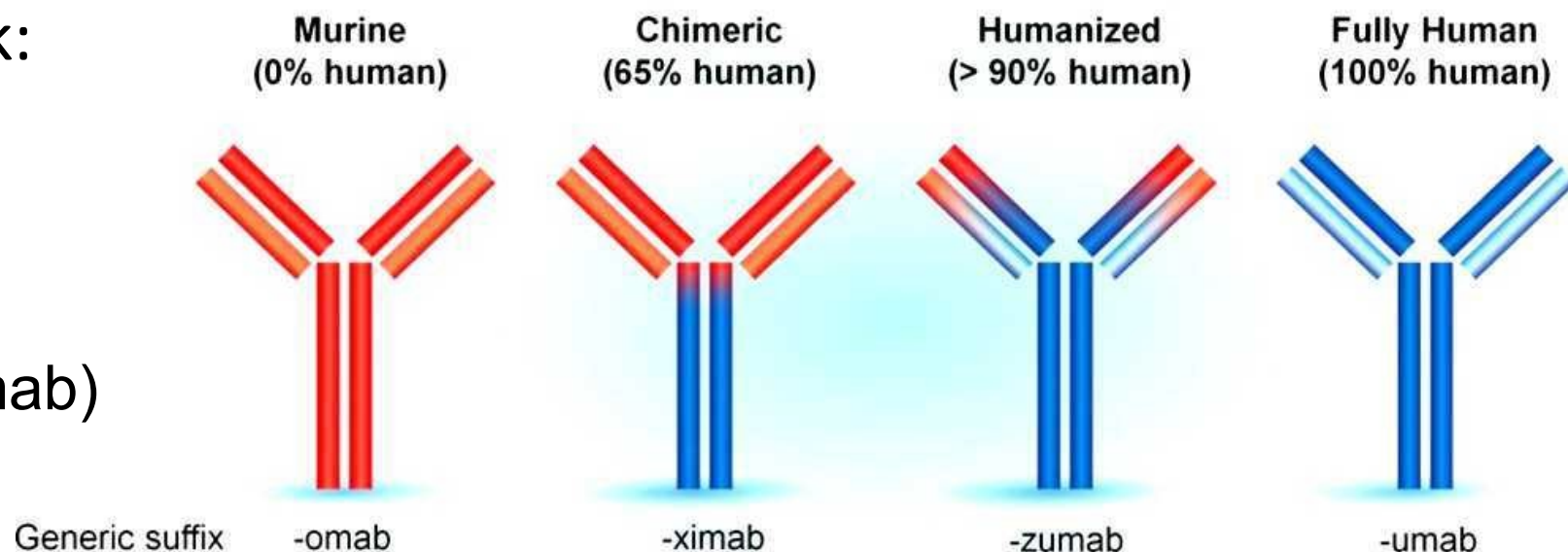


Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

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

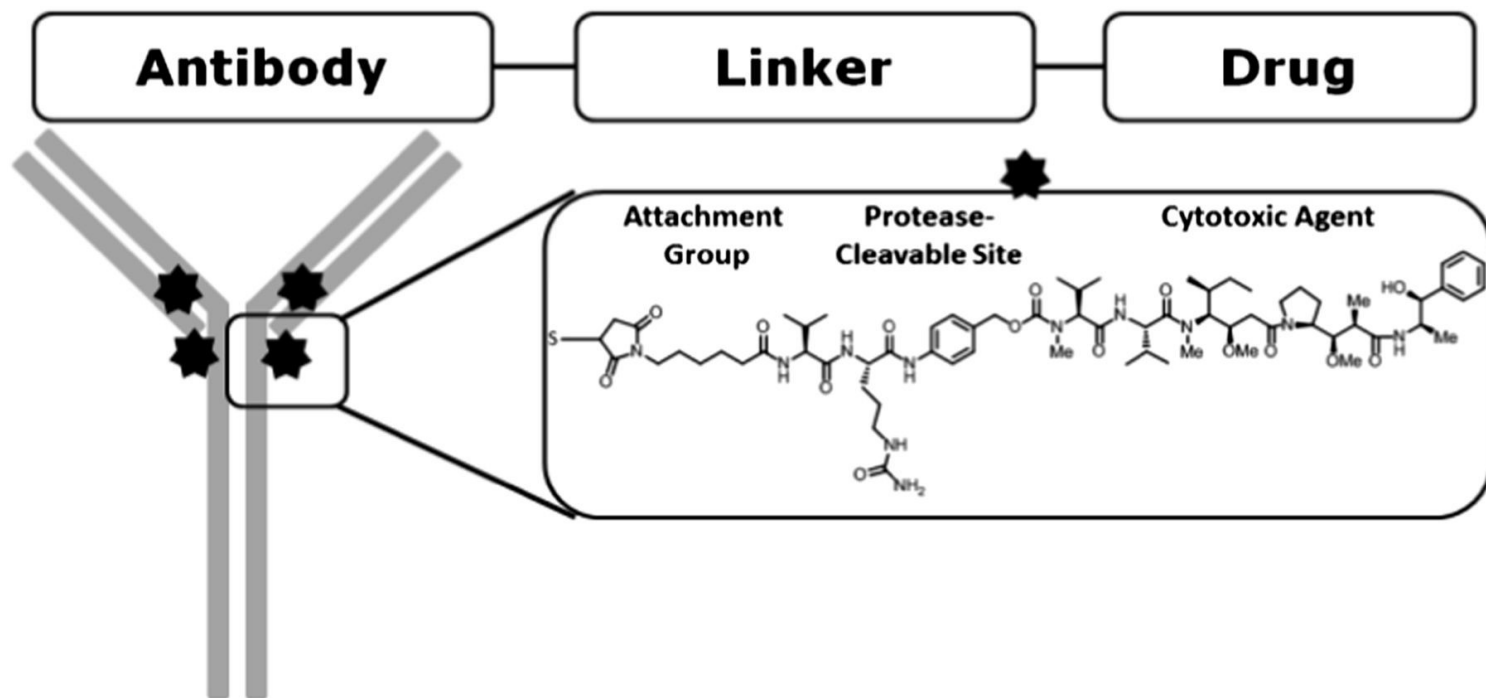
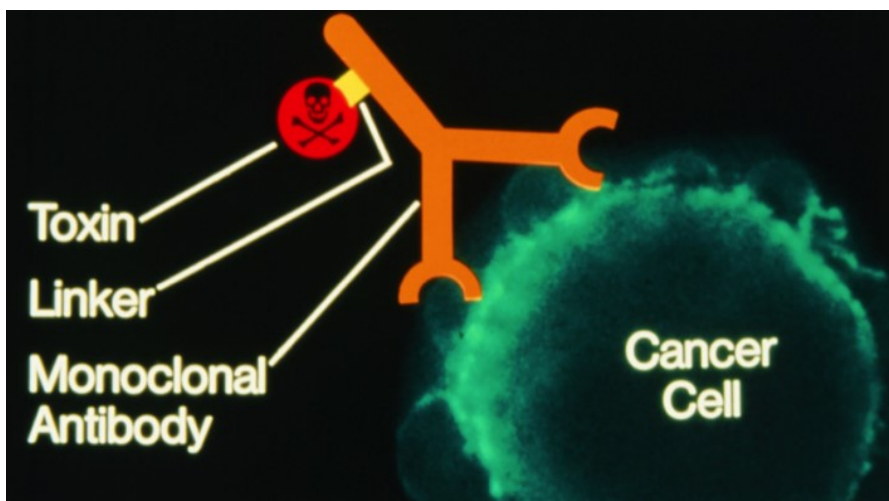


Využití monoklonálních protilátek

- 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/radionuklidy
- 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