FAKULTNÍ NEMOCNICE U SV. ANNY V BRNĚ

Cvičení č. 1

Úvod
Biologický materiál
Protilátky

Mgr. Julie Štíchová
424773@mail.muni.cz

Organizační informace

- Cvičení 12:00-13:40
- Celkem 7x
  1. 4.3. Výroba protilátek + výpočty v imunologii
  2. 11.3. Aglutinační/precipitační metody, ELISA
  3. 18.3. Vyšetření funkce komplementu + imunofluorescence
  4. 25.3. Průtoková cytometrie
  5. 1.4. Separace PMBC, proliferace, vyšetření fagocytózy
  6. 8.4. Imunobloty, alergologie

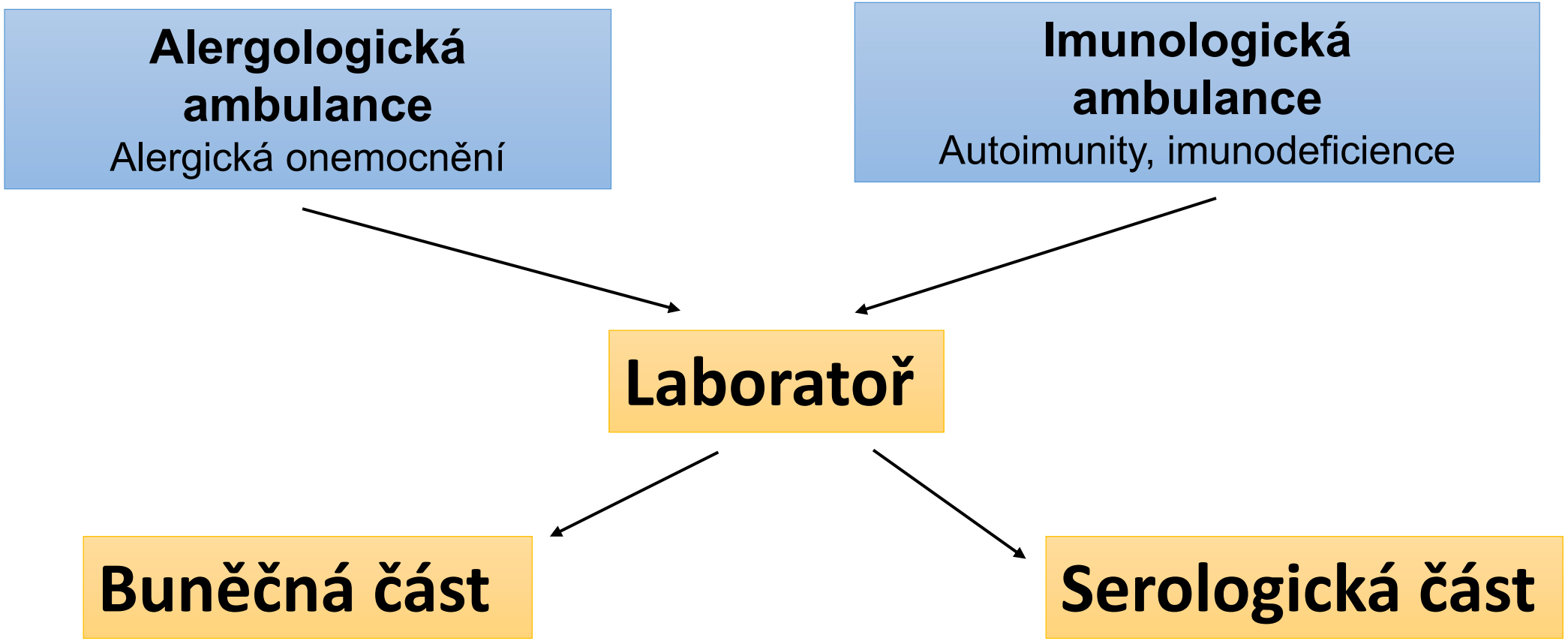
- Cvičení pouze teoretická
- Aktivní účast ve cvičeních
- 1x povolena absence (neomluvená)
- náhrada za absenci – vypracování prezentace na přidělené téma (netýká se v případě nemoci)

Ukončení předmětu

- Zápočet formou prezentace na 5-8 min
- 15.4.
- Témata budou známa cca 2-3 týdny předem

ÚKIA

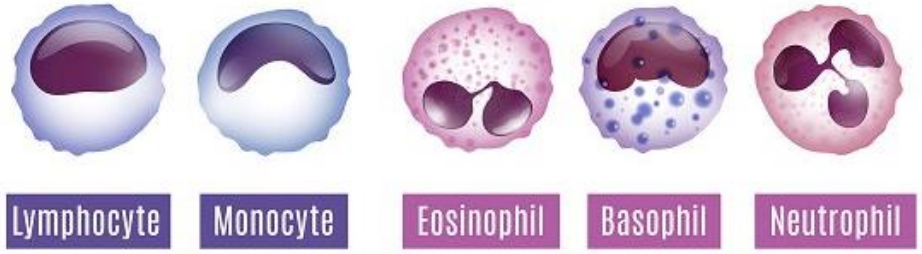
Ústav Klinické Imunologie a Alergologie



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 …

Laboratorní vyšetření

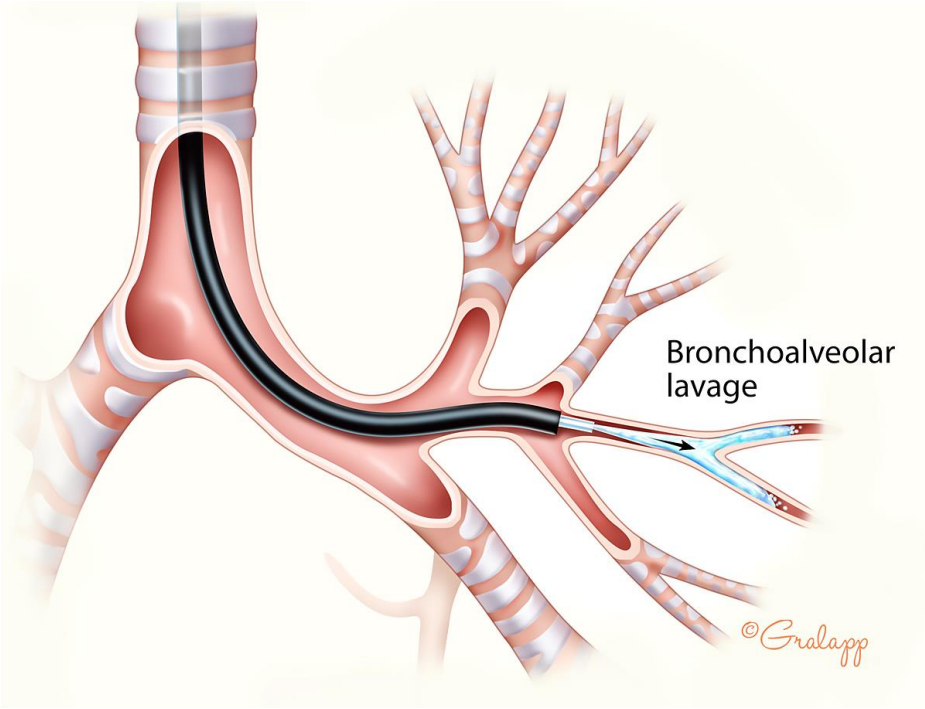
- **Fáze preanalytická**
  - **Mimolaboratorní –** příprava pacienta, odběr, žádanka, transport
  - **Laboratorní –** příjem materiálu, centrifugace, vytvoření alikvotů se štítky
- Fáze analytická
  - Vlastní laboratorní vyšetření, kalibrace metody + kontroly, dokonalý technický stav přístrojů
- Fáze 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

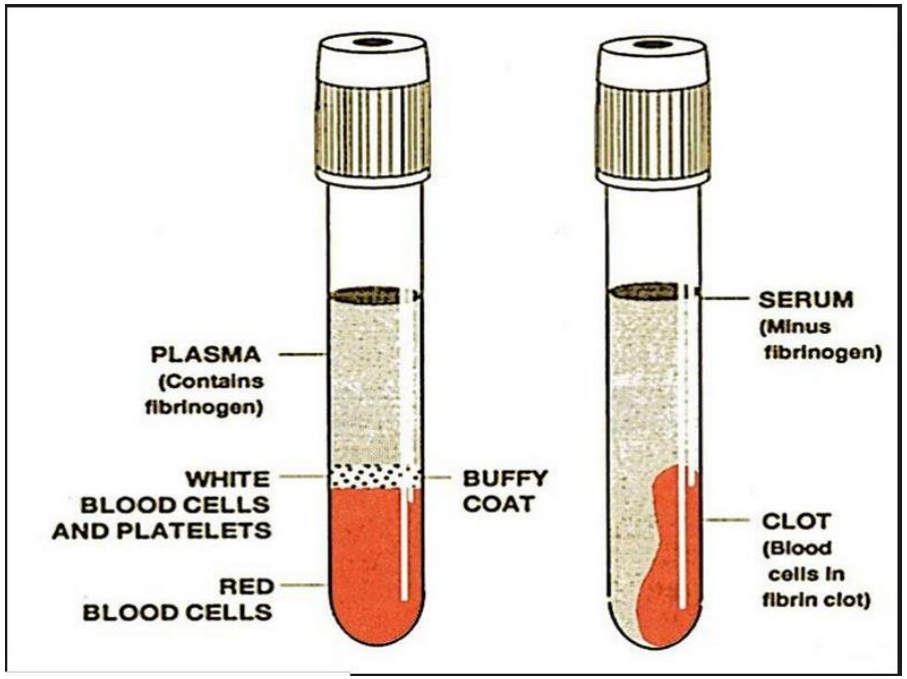
Funkční testy leukocytů

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



Protilátky

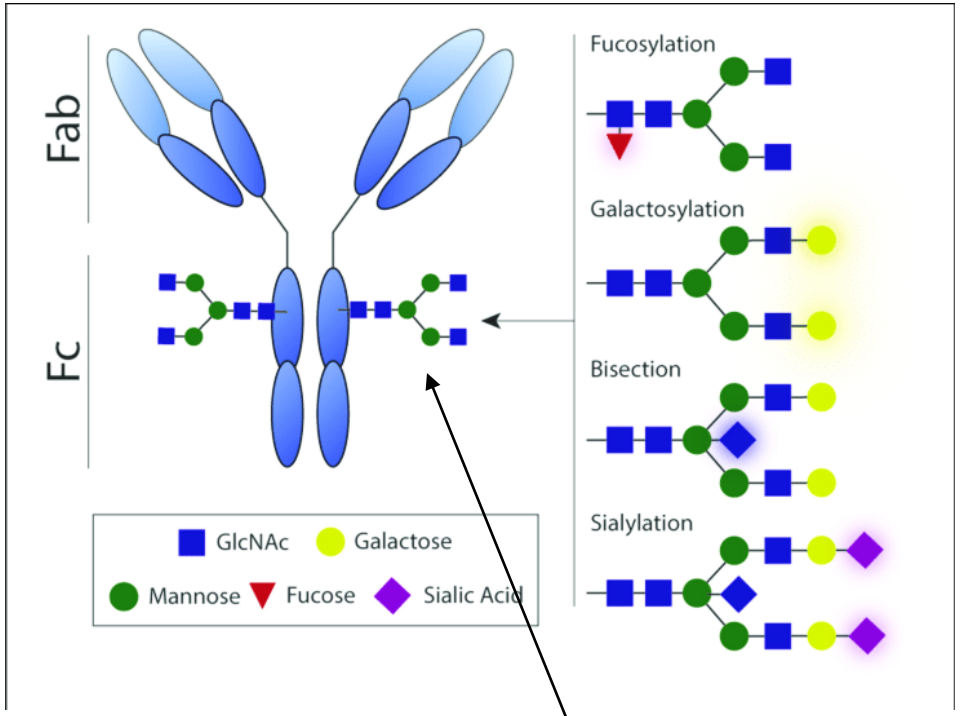
Chemické složení: **glykoproteiny**

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



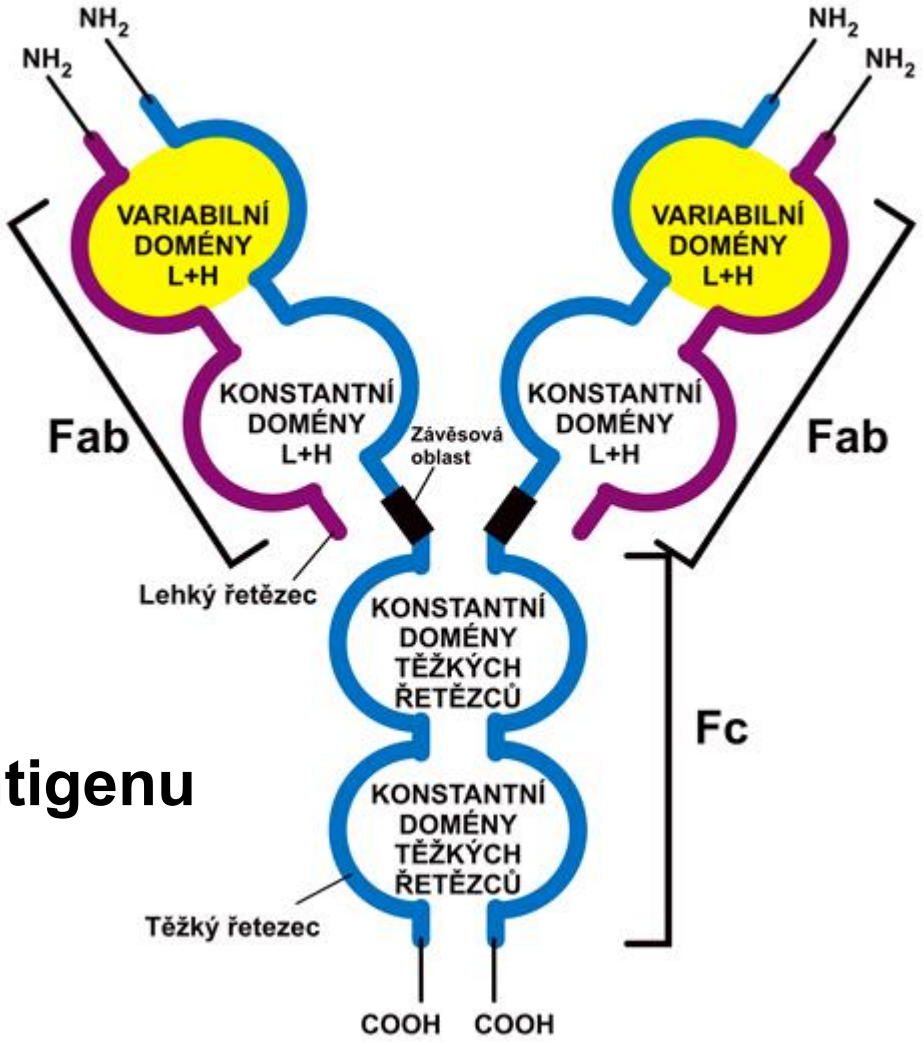
Glykosylace

Struktura protilátky

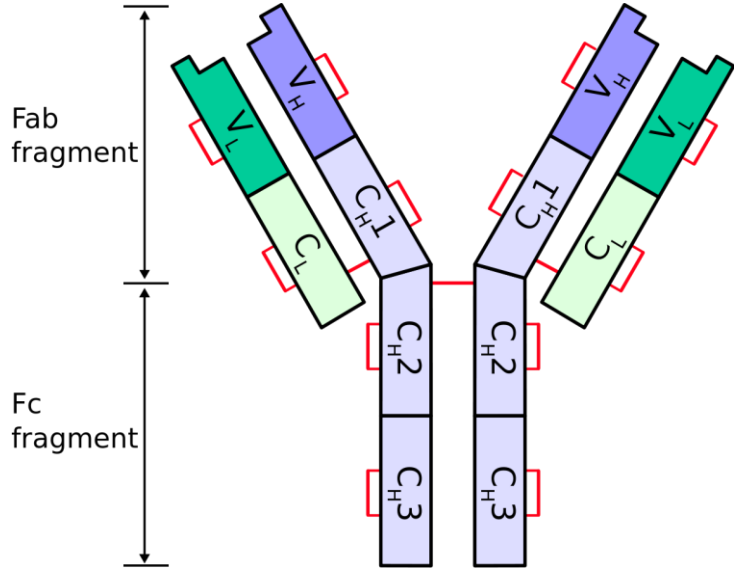
- 2 těžké (H) + 2 lehké řetězce (L)
- Spojení – kovalentní disulfidické můstky
- Pantová oblast - flexibilita

- L řetězec – 1 variabilní + 1 konstantní oblast
- H řetězec – 1 variabilní + 3-4 konstantní oblasti

- 2 Fab fragmenty – variabilní oblasti – **vazba antigenu**
- 1 Fc fragment – **efektorová funkce**



Lehké řetězce

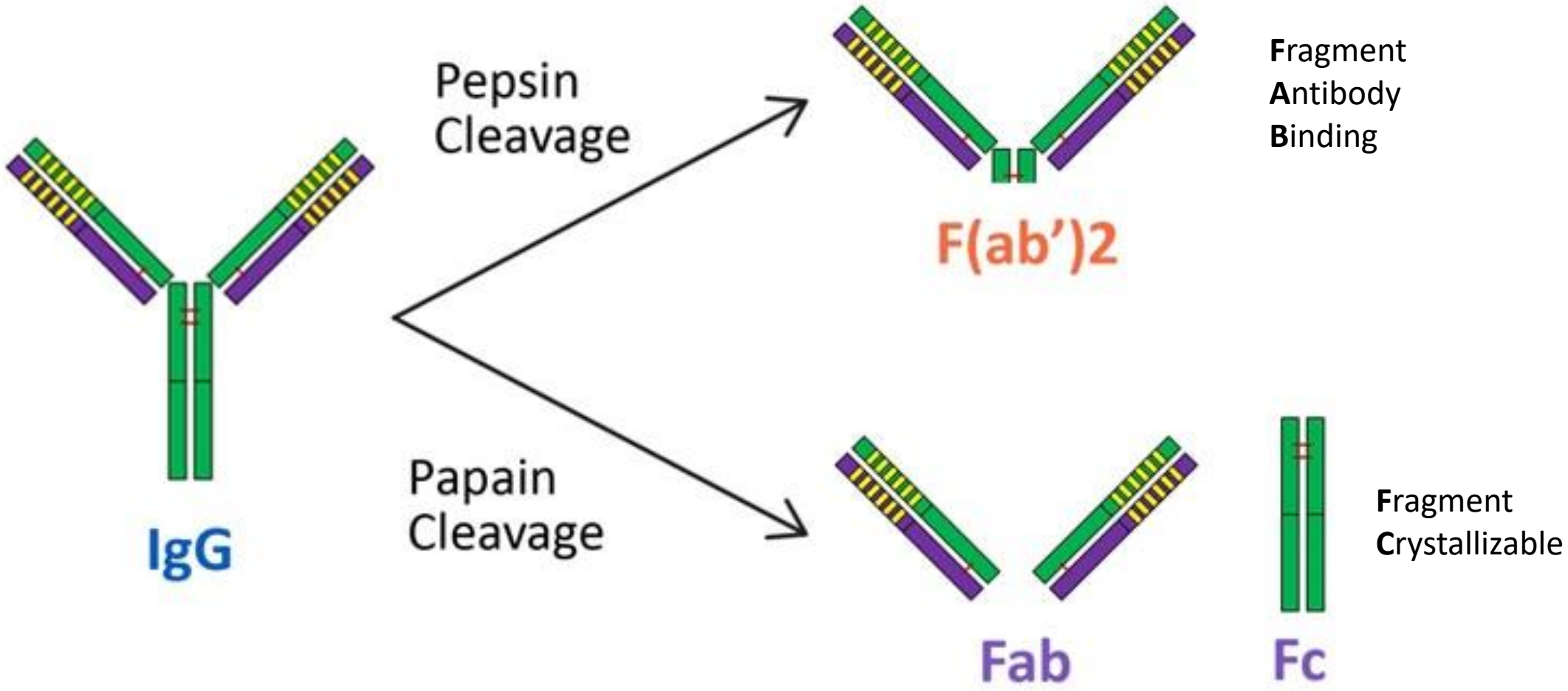


- Jsou dvojího typu:
  - **kappa (κ)**
  - **lambda (λ)**

- Molekula imunoglobulinu obsahuje vždy 2 stejné lehké řetězce
- Jejich poměr u člověka kappa : lambda = 2:1

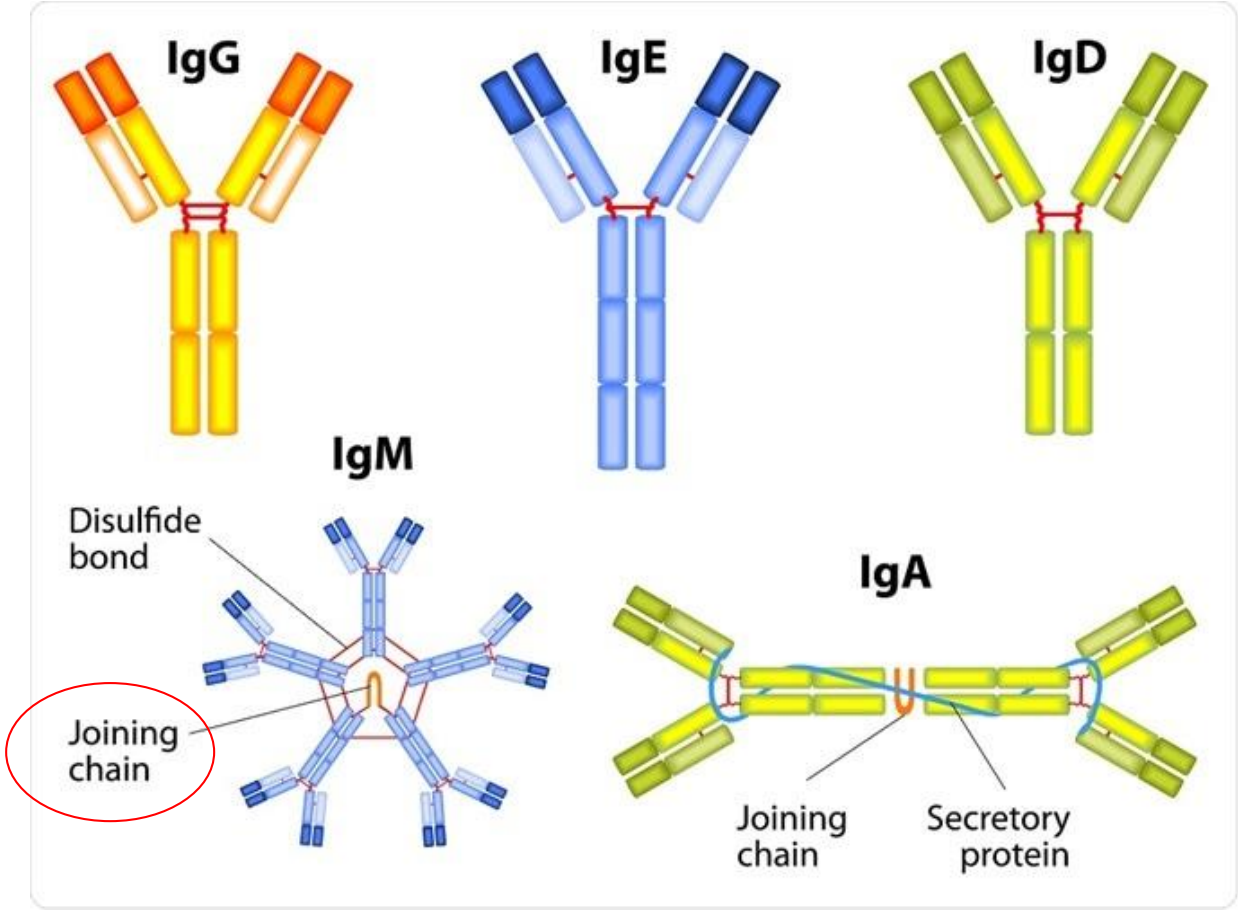
- Výrazný nepoměr může poukazovat na malignitu z B-lymfocytů

Štěpení enzymy – historické poznání struktury imunoglobulinu



Třídy protilátek

- 5 tříd – podle typu konstantní části těžkého řetězce
- IgG - monomer
  - 4 podtřídy IgG_1-IgG_4
- IgA - monomer, dimer
  - 2 podřídy IgA_1, IgA_2



IgE - monomer

IgD - monomer

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

Protilátky různých tříd mají specifické funkce

efektorové funkce určuje Fc fragment (váže se na povrchové Fc receptory leukocytů)

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

(ADCC – na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita)

Protilátky různých tříd mají různý biologický poločas

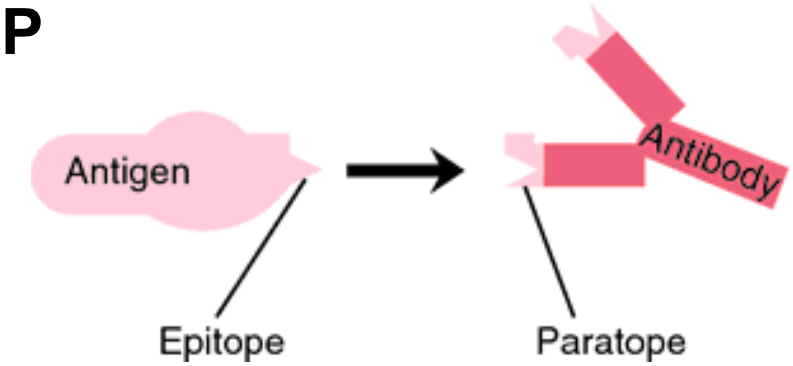
- Protilátky jsou v těle postupně metabolizovány
- Ztráty jsou doplňovány tvorbou nových protilátek

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

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**

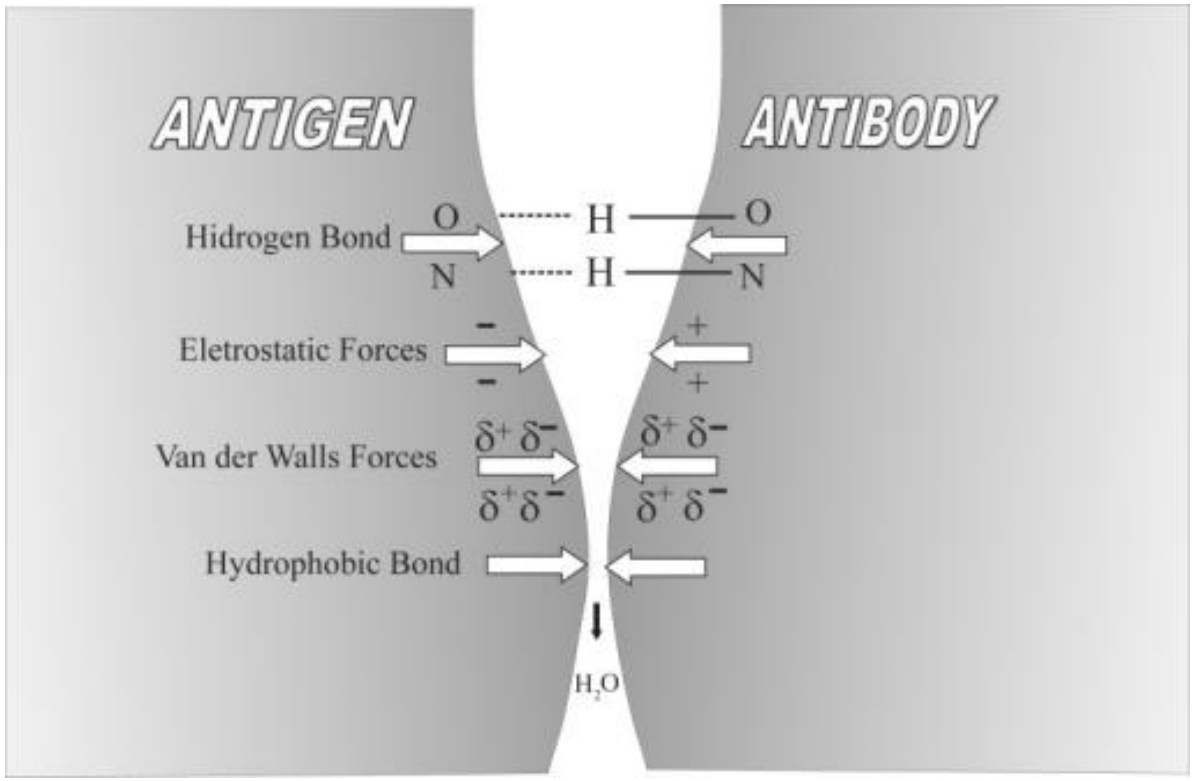


Vazba mezi Ag a Ab je reverzibilní

- Slabé nevazebné interakce
- Vazba se vyznačuje určitou rychlostí vzniku a rozpadu
- Jejich poměr:

  Rovnovážná konstanta K_{as}

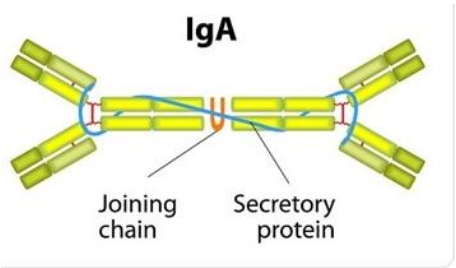
- Čím je K_{as} vyšší, tím je afinita protilátky k antigenu vyšší

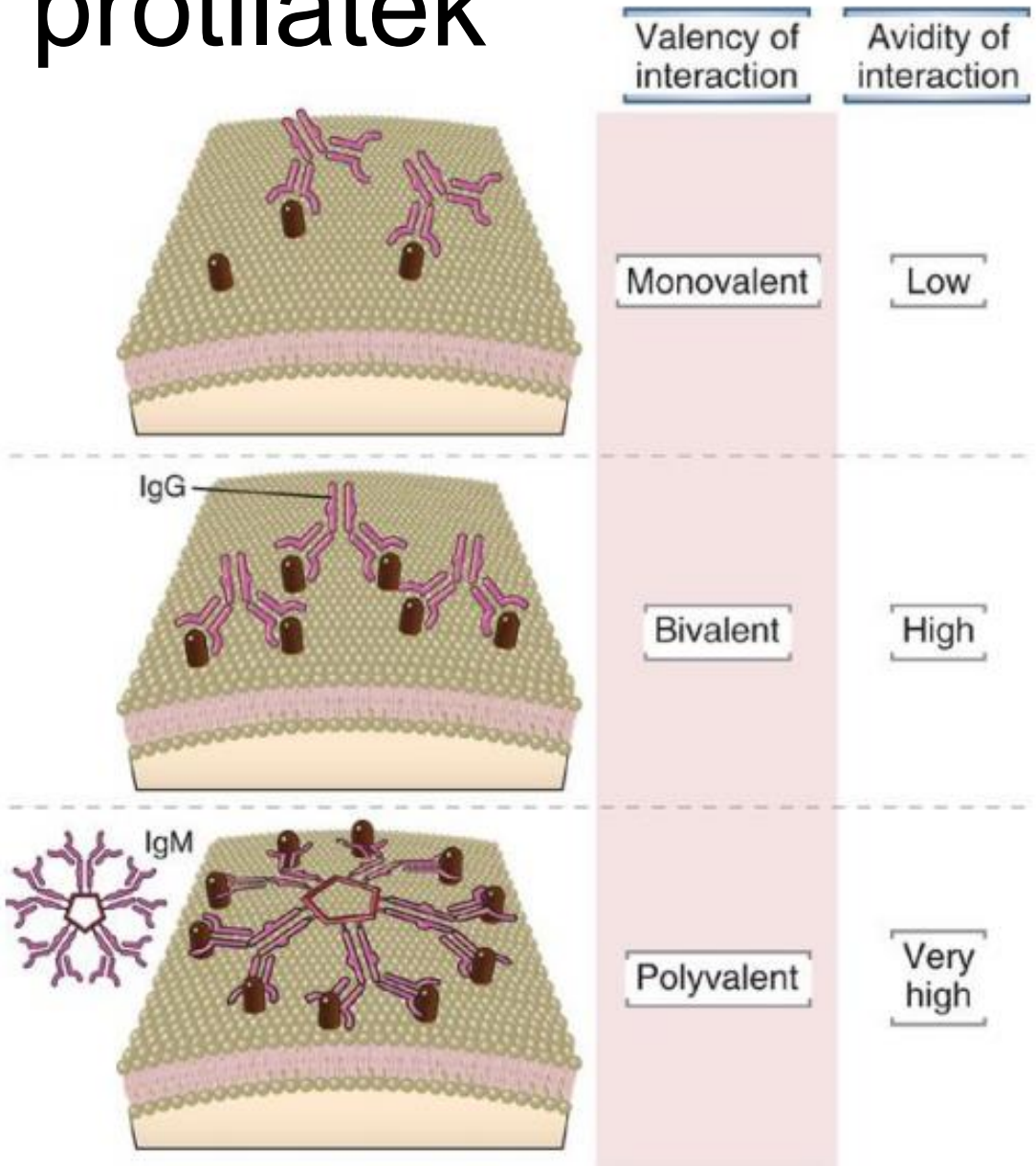


Afinita vs avidita protilátek

- Afinita
  - síla interakce mezi 1 paratopem Ab a 1 epitopem Ag

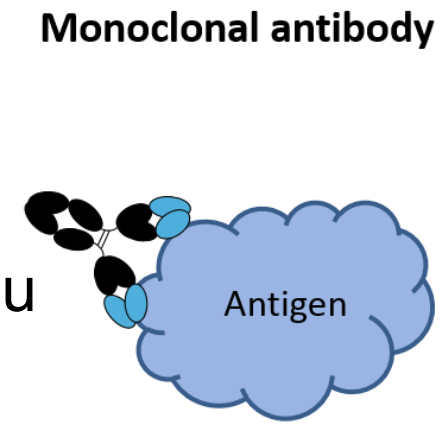
- Avidita
  - je dána vícenásobnou interakcí mezi multivalentním antigenem a protilátkou
  - IgG – 2 vazebná místa
  - Sekreční IgA – 4 vazebná místa
  - Pentamer IgM – až 10 míst

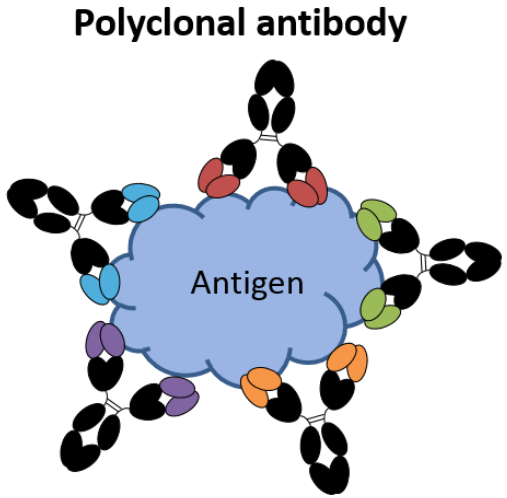




Protilátky mohou být

- 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** (např. stanovení ENA screen)

Výroba polyklonálních protilátek

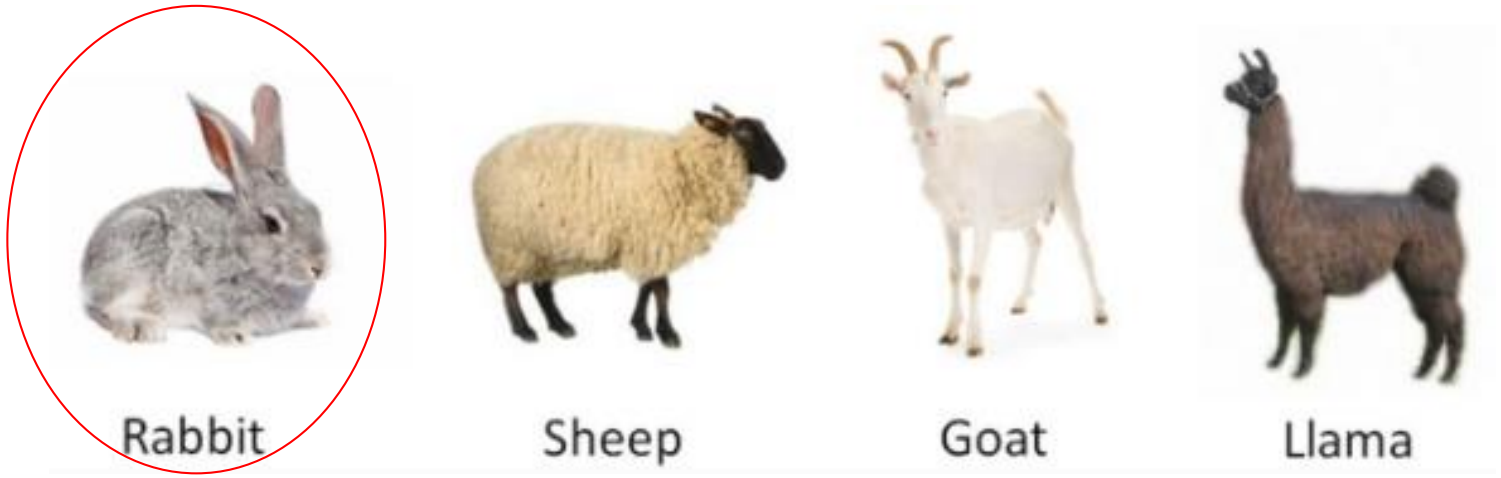
Výroba polyklonálních protilátek

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) – nevhodné pro humánní medicínu

Výroba polyklonálních protilátek

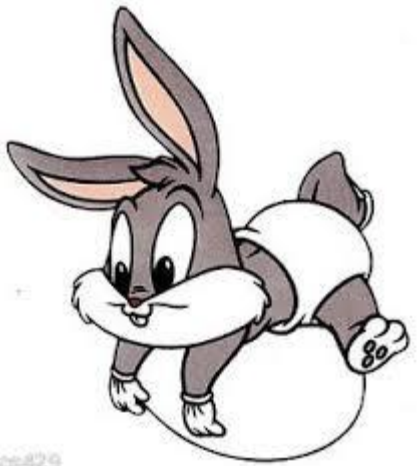
3. Výběr vhodného zvířete
   - Velikost zvířete - závisí na tom, kolik protilátek potřebujeme připravit
   - Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu

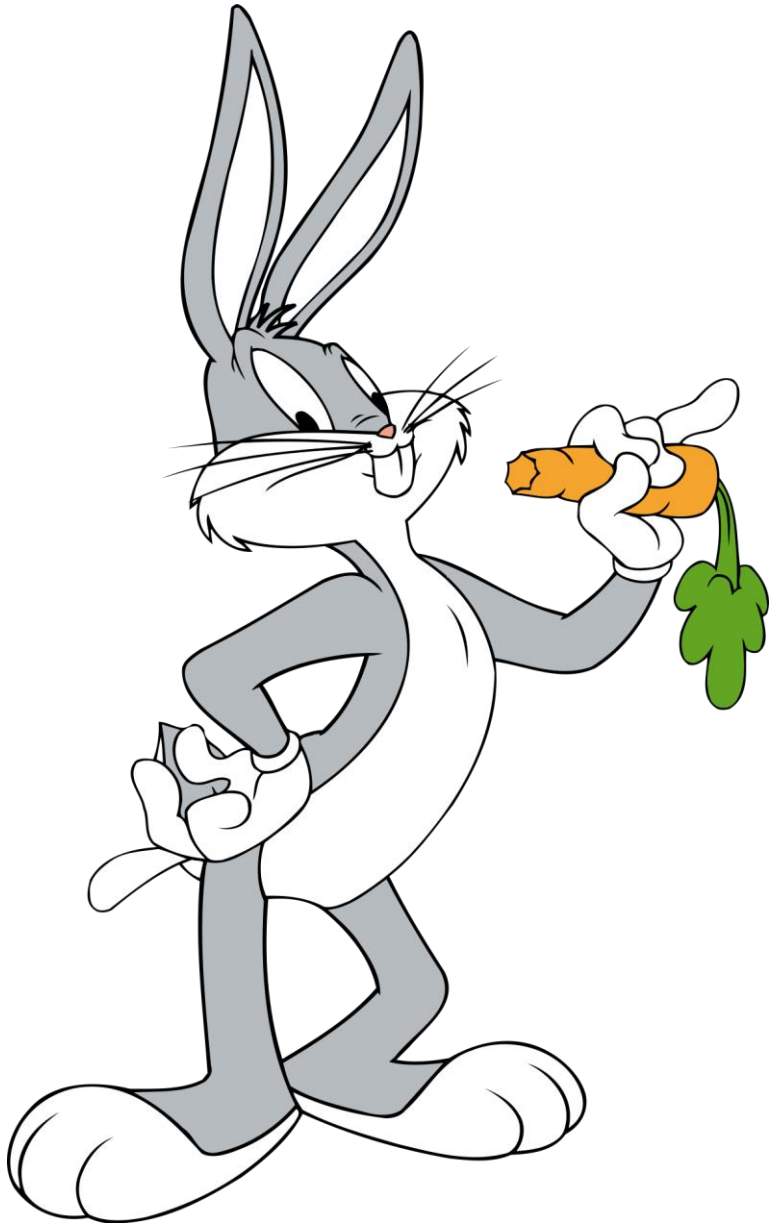


4. Způsob aplikace – nejčastěji <u>intradermálně, subkutánně</u>
   - Antigen je vychytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

Má význam věk zvířete?

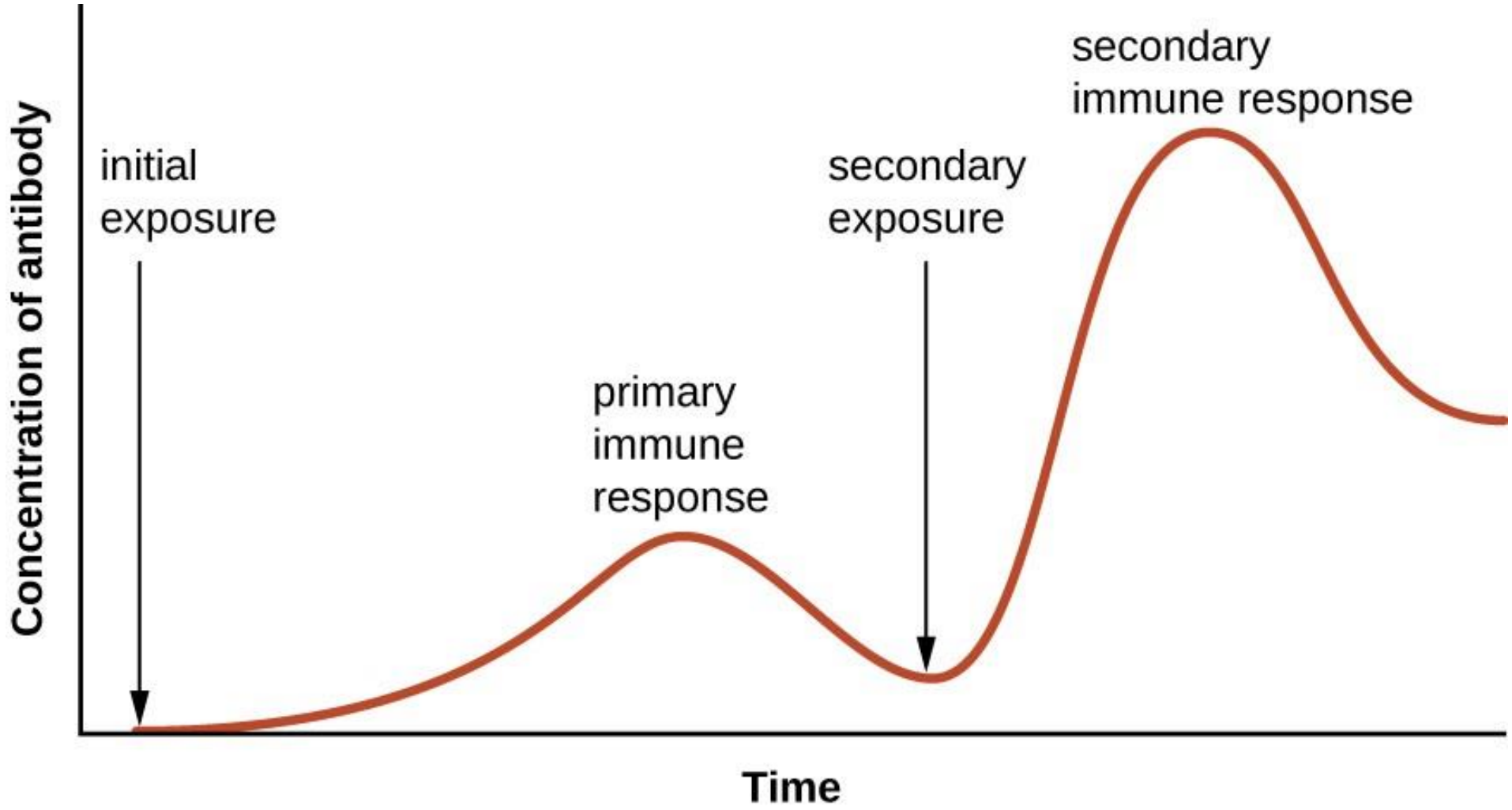
- Imunizujeme pouze mladé dospělce
  - Dostatečně vyvinutý imunitní systém
  - Minimální imunizace podněty z okolí v průběhu života





Výroba polyklonálních protilátek

Důležitá je správná volba **imunizačního protokolu** – jak velká dávka antigenu, jak často podávat?



Výroba polyklonálních protilátek

5. Sběr krve
   - Opakované odběry nižšího množství krve
   - Kompletní vykrvení zvířete - usmrcení

6. Zisk séra s obsahem protilátek

7. Přečištění 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

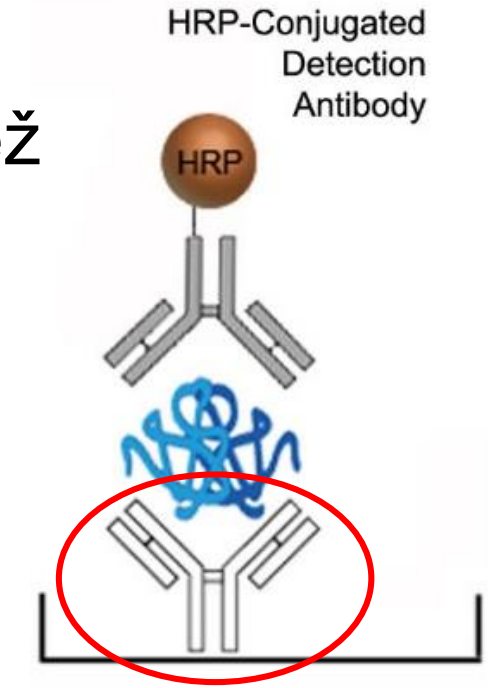
Screening ENA autoprotilátek

Léčba

- Antiséra proti hadím jedům

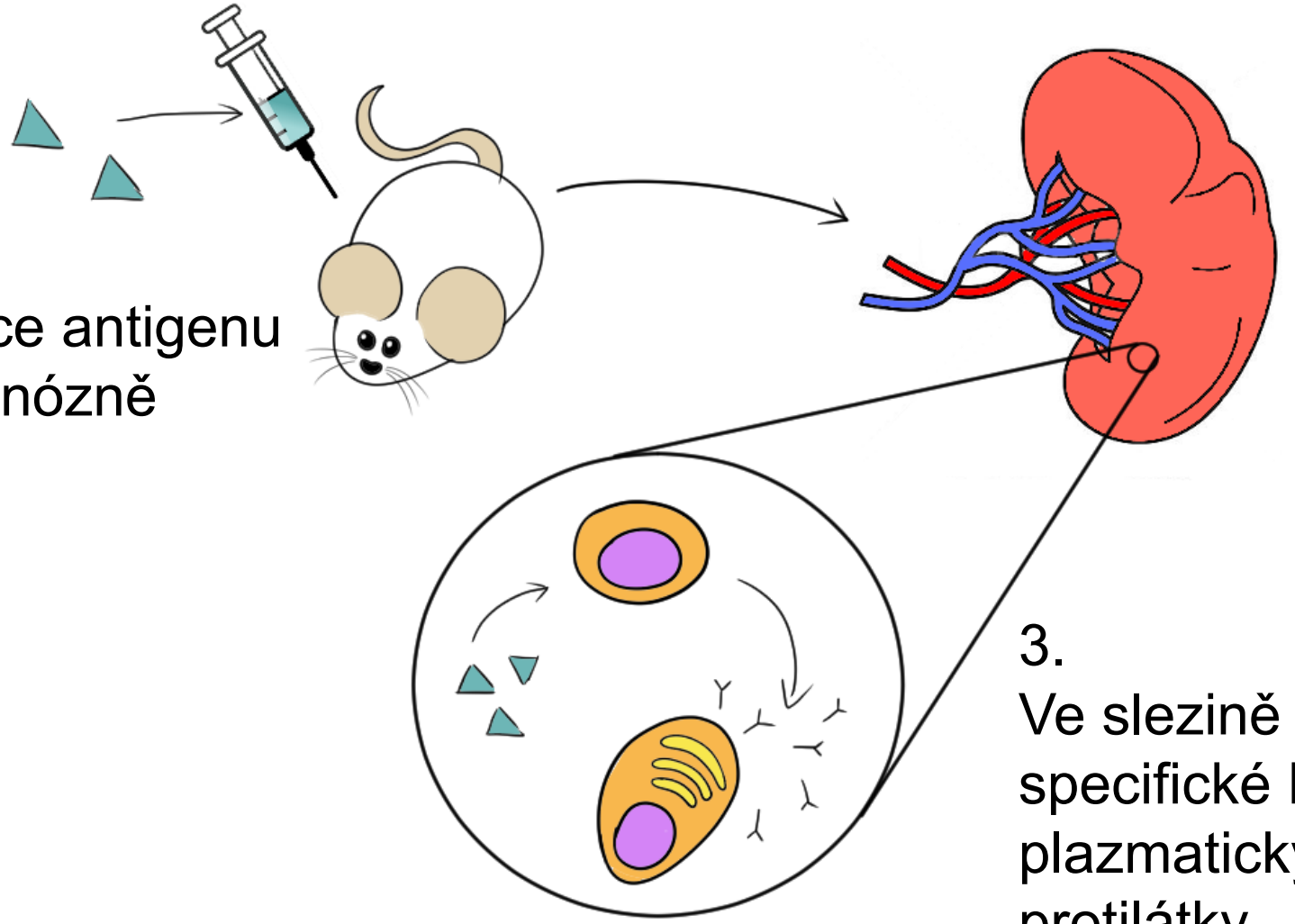
ELISA

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



Výroba monoklonálních protilátek

Výroba monoklonálních protilátek

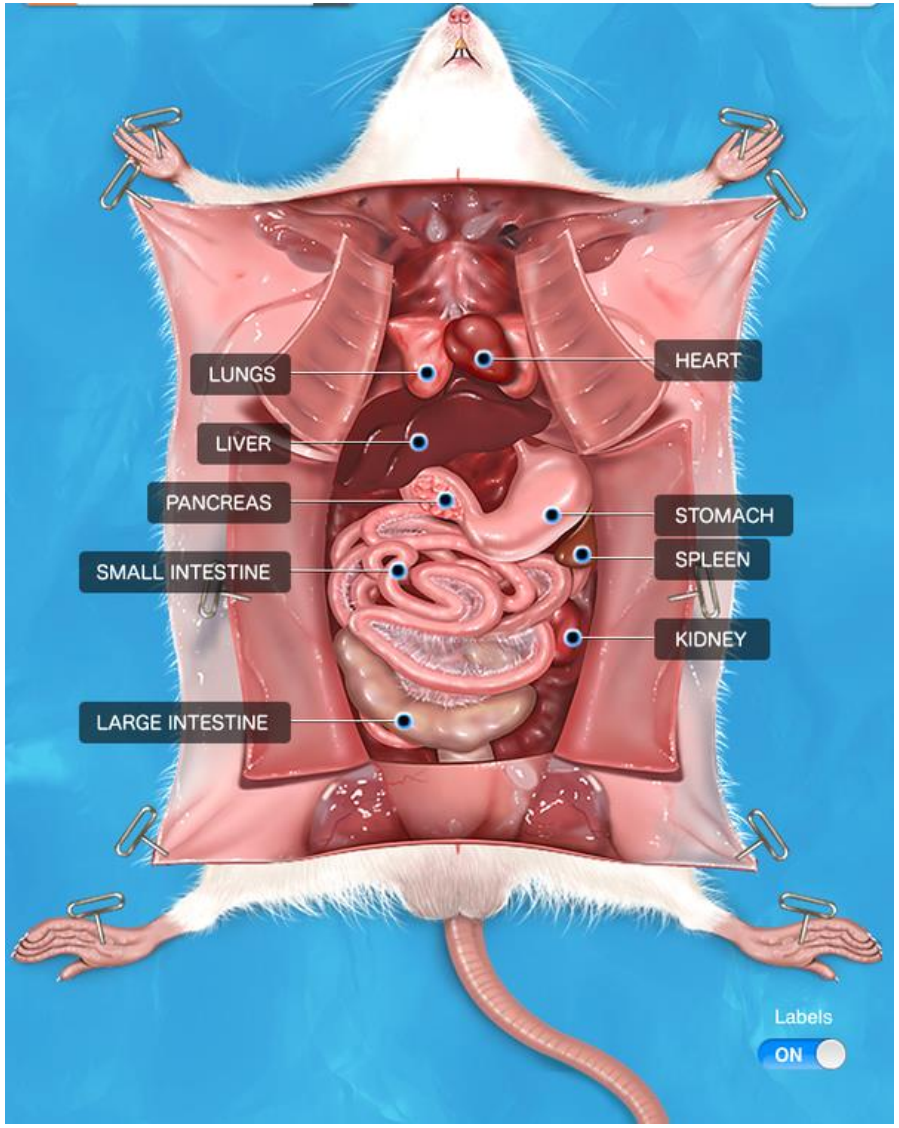


1.
Aplikace antigenu intravenózně

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

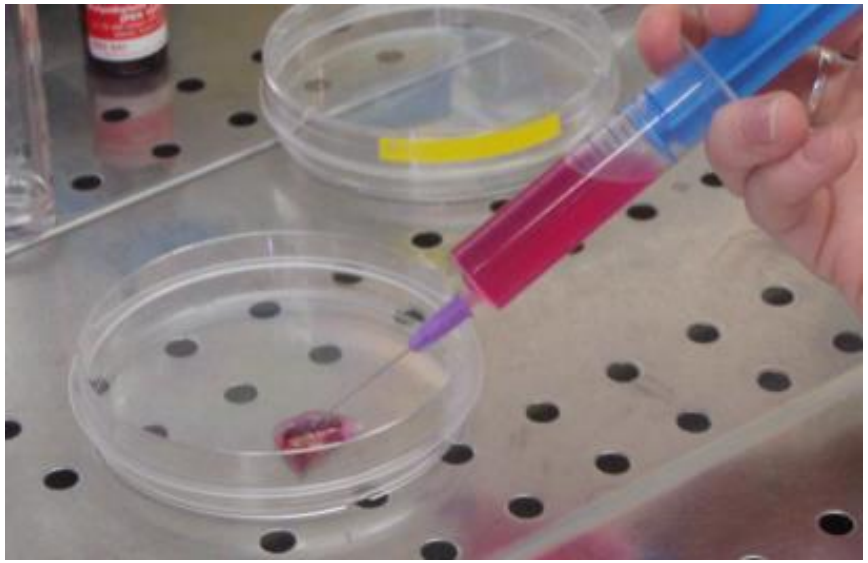
3.
Ve slezině diferencují antigen specifické B lymfocyty do plazmatických buněk, které produkují protilátky

Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

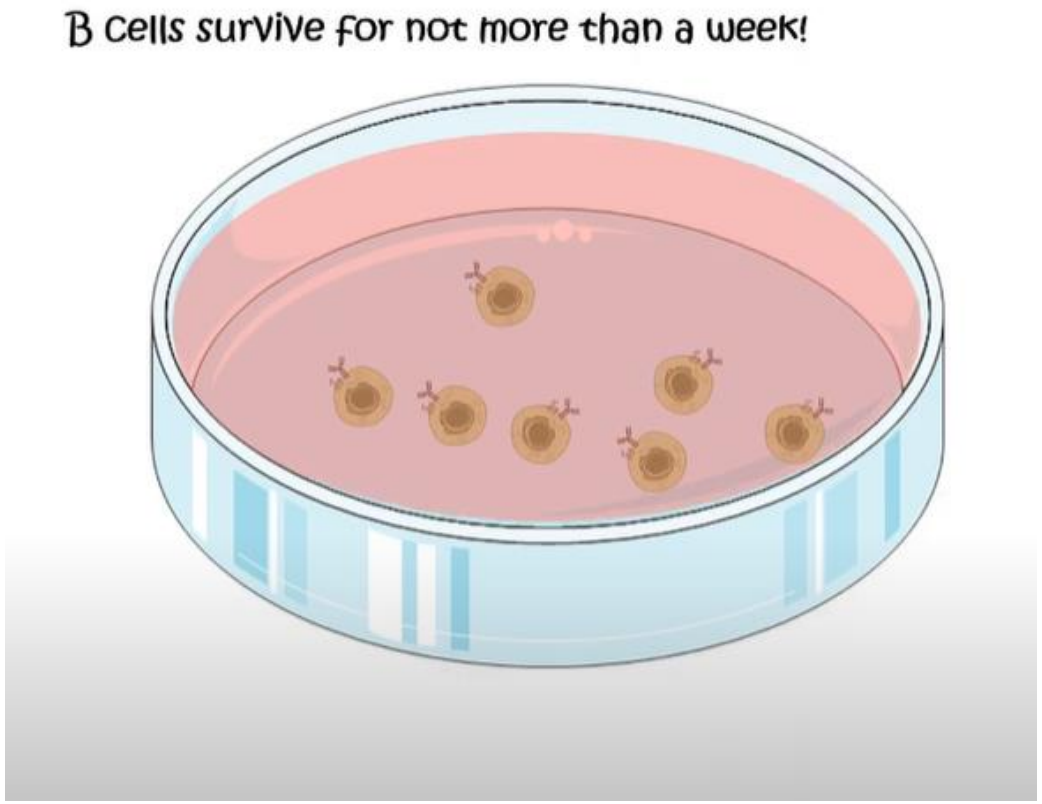
5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



Problém

Izolované B-lymfocyty dlouho nepřežijí

Jak tedy získat dostatek protilátek?



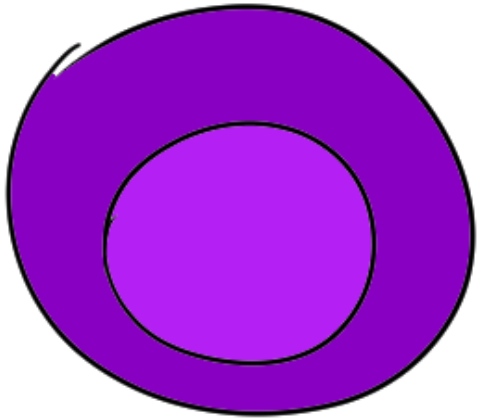
Výroba monoklonálních protilátek

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

Slezinná plazmatická buňka

- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

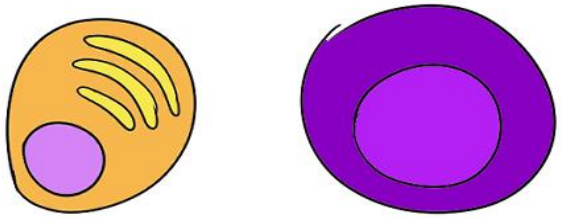


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

6.Fůze buněk polyethylenglykolem (PEG)

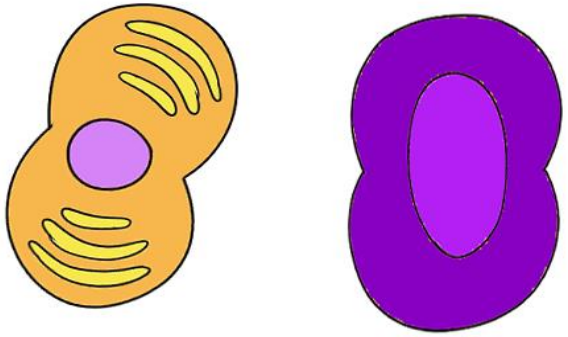
Výroba monoklonálních protilátek

Nezfúzované B lymfocyty
a myelomové buňky

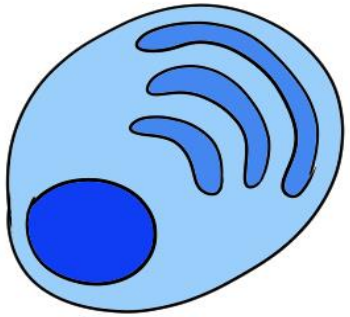


Zfúzované
B lymfocyty

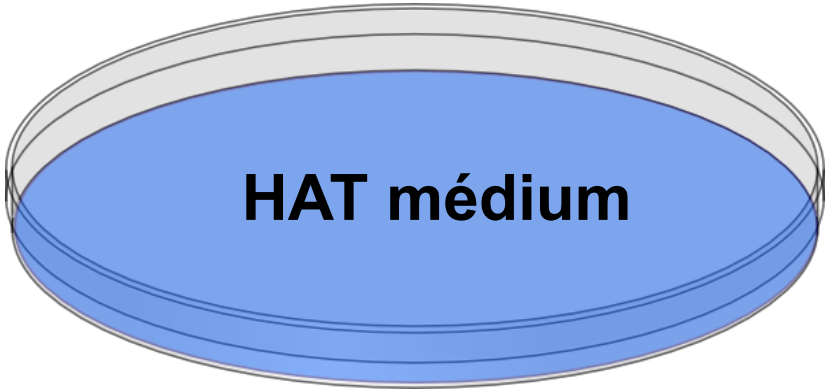
Zfúzované myelomové
buňky



HYBRIDOM

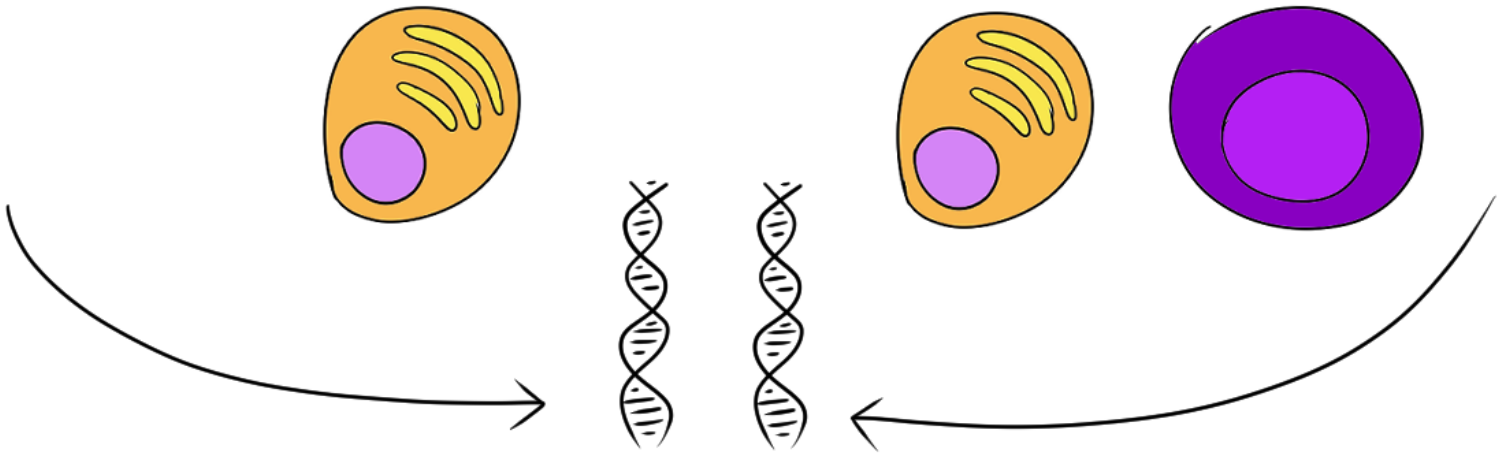


7. Buněčná směs je kultivována v selekčním **HAT médiu** (Hypoxantin, Aminopterin, Thymin)



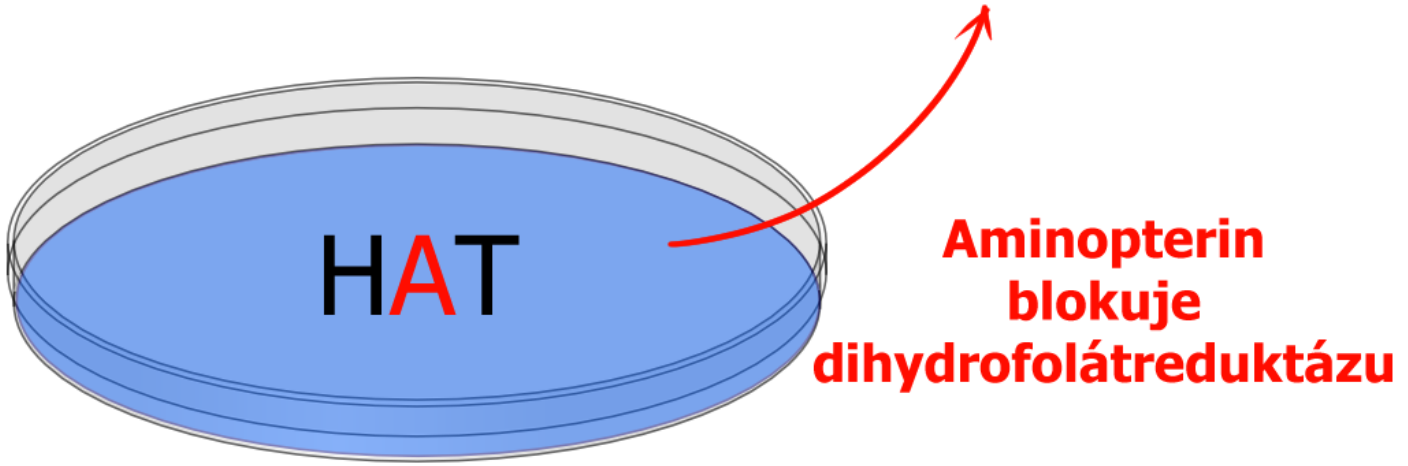
Selekce – enzymatický blok

Plazmatické buňky syntetizují DNA pomocí 2 enzymatických drah:
Záchranné a alternativní

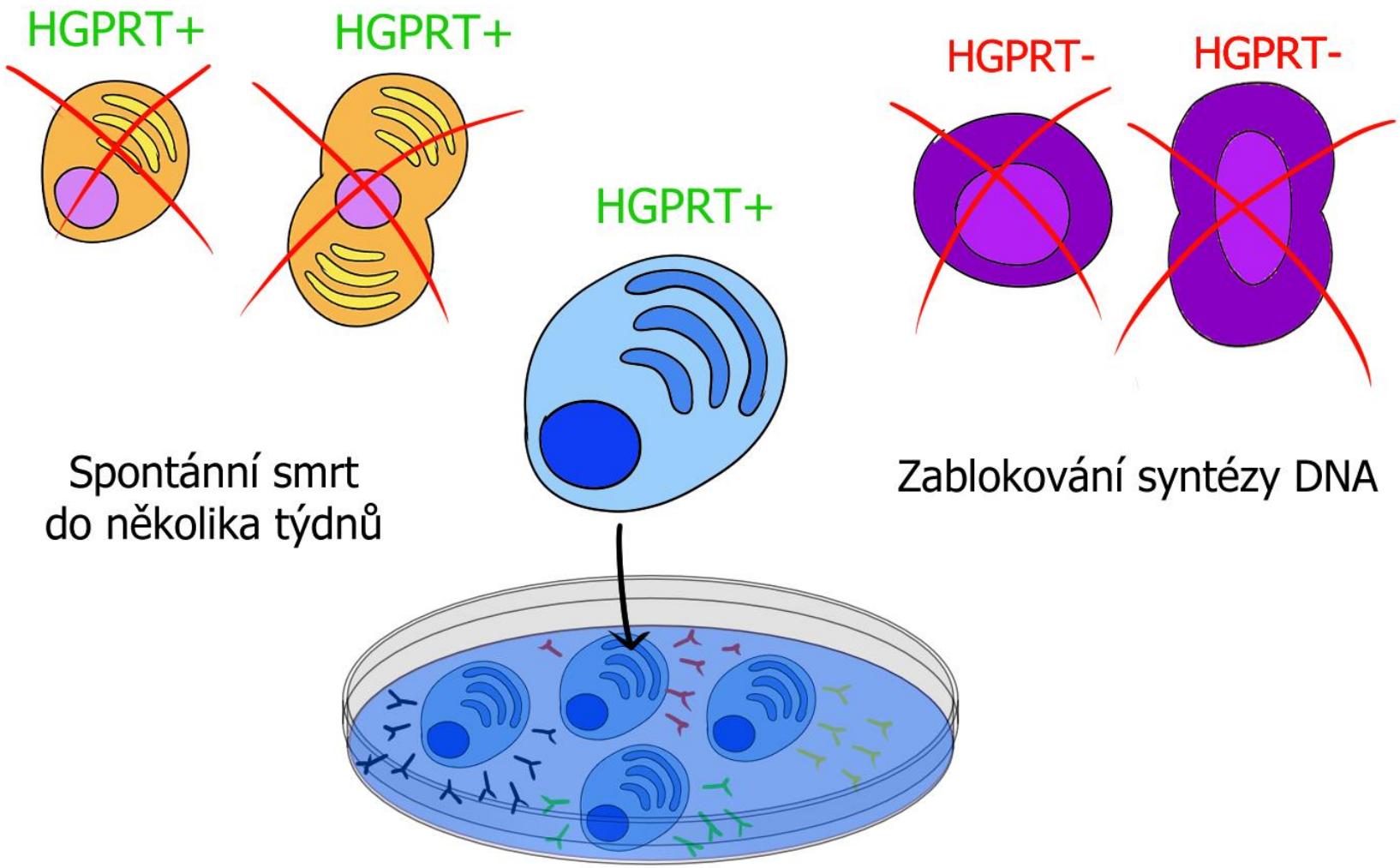


Myelomové buňky syntetizují DNA pouze pomocí alternativní dráhy

HGPRT = Hypoxantin Guanin FosfoRibosyl Transferáza

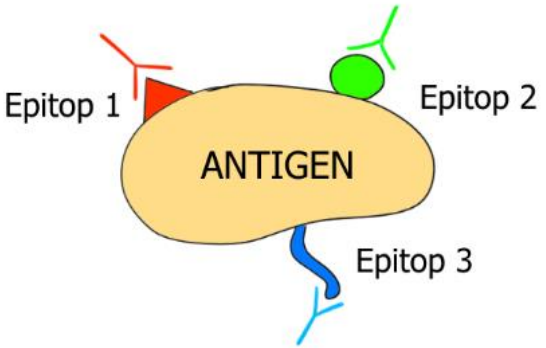


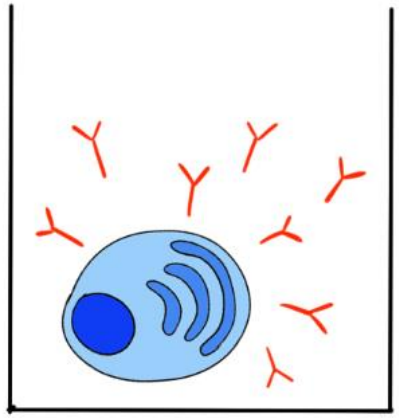
Selekce – enzymatický blok

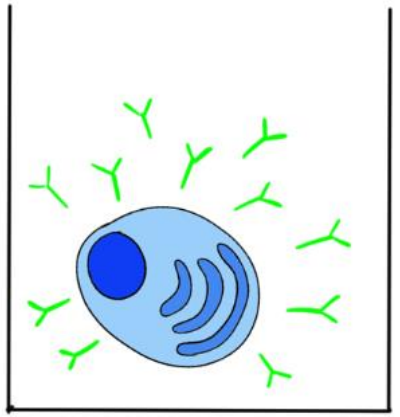


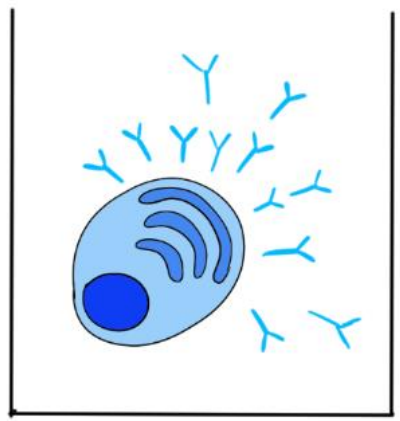
Výroba monoklonálních protilátek

8. Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek
9. Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu
10. Přečištění, kvantifikace, validace

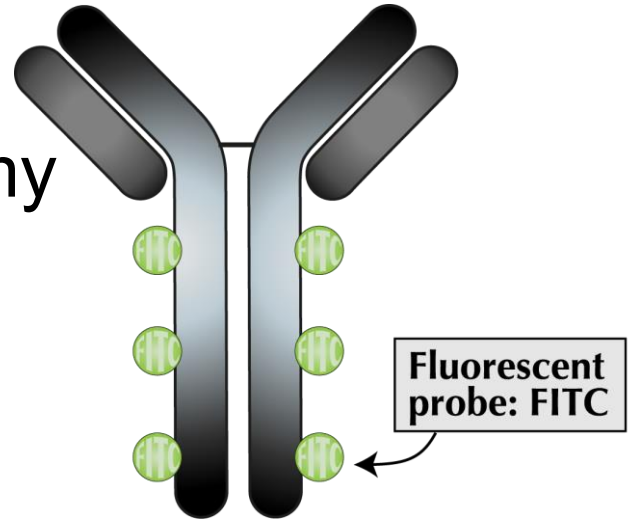








Využití monoklonálních protilátek



- Konjugace monoklonálních protilátek s fluorochromy
- Základní reagencie 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:

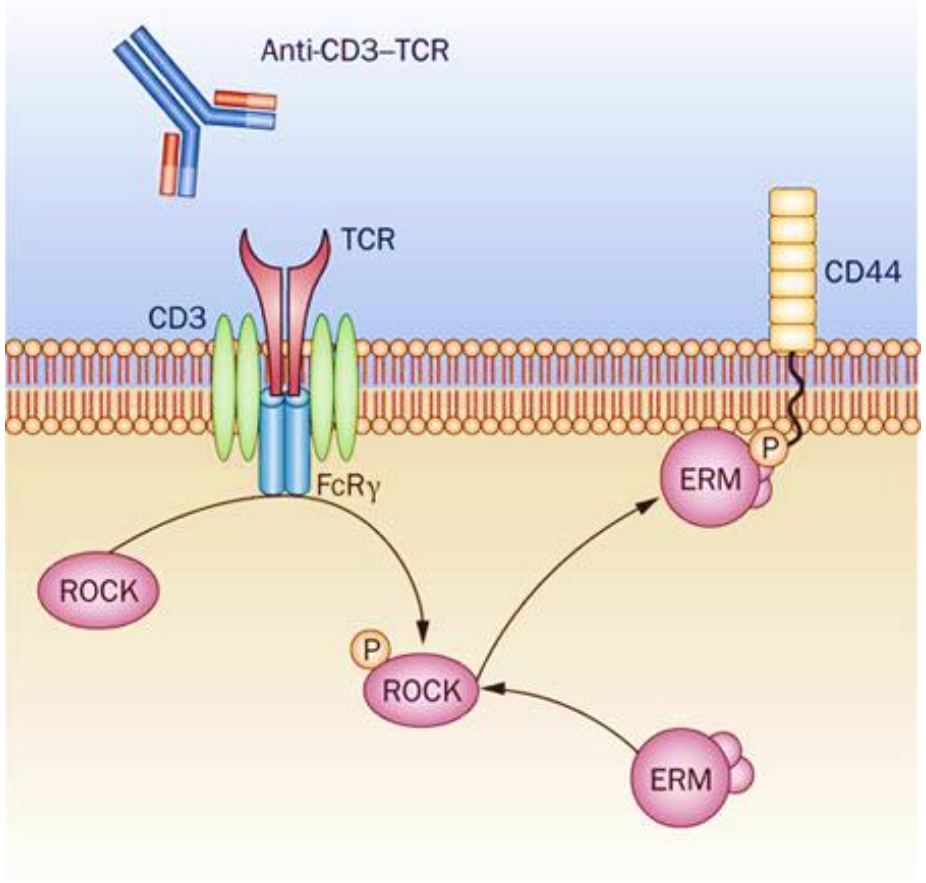
- Rozlišení T a B lymfocytárních subpopulací
- Rozlišení klidových a aktivovaných forem leukocytů
- Rozlišení časné/pozdní aktivace buněk
- Rozlišení vývojových stádií buněk
- Proliferace
- Apoptóza
- Imunofenotypizace malignit

Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

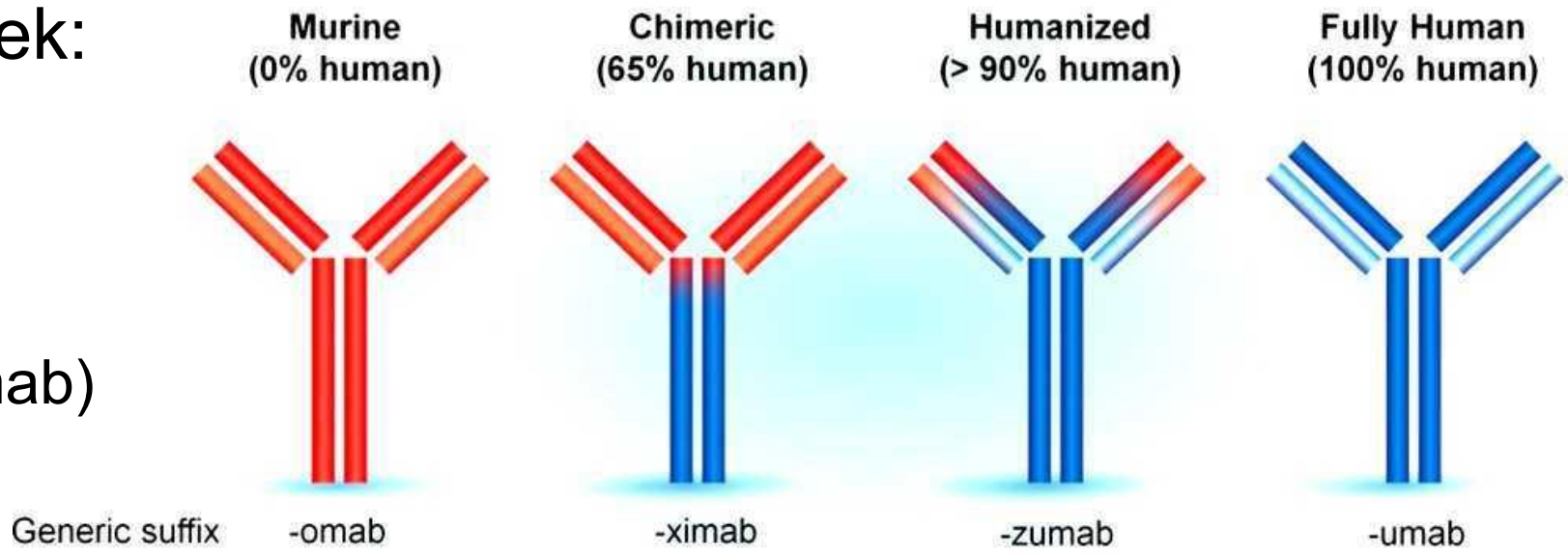
Příklad:

- 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)

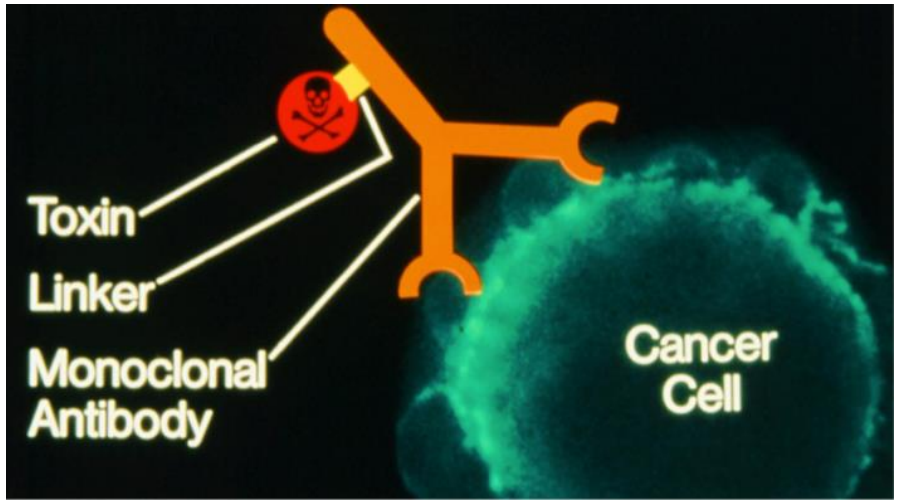


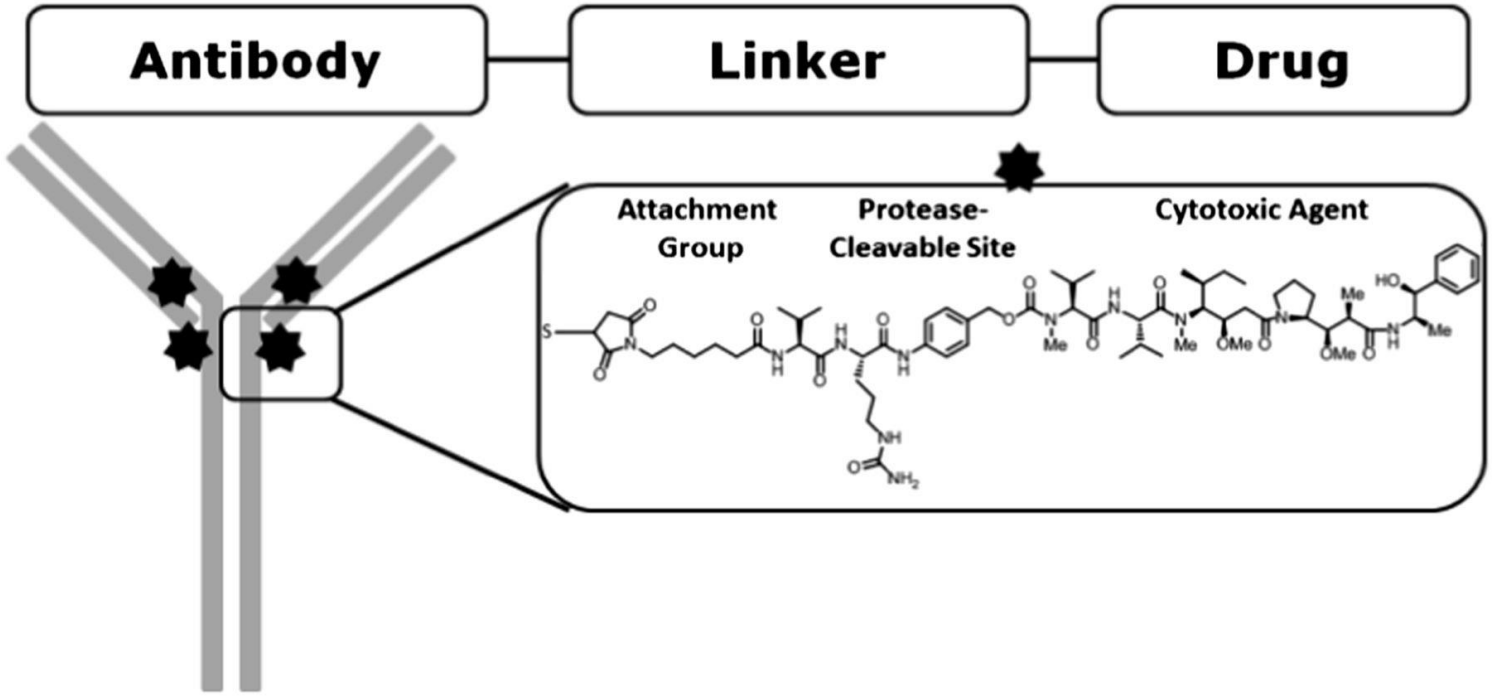
Využití monoklonálních protilátek

- Imunosuprese
  - **Anti-CD20** (Rituximab, Ocrevus, Rixathon): B lymfocytární malignity, léčba těžších stádií roztroušené sklerózy
- 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/atopického exému

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