

Možnosti vyšetření funkčnosti buněk IS

Marcela Vlková

FN u sv. Anny v Brně

LF MU v Brně

Ústav klinické imunologie a alergologie



HODNOCENÍ SPECIFICKÉ BUNĚČNÉ IMUNITY

- Základní klinické projevy poruch specifické buněčné imunity
 - Opakované těžce probíhající infekce špatně odpovídající na léčbu:
 - Plíce, GIT, kůže
 - Virové infekce
 - Intracelulární bakterie (*M. tuberculosis*)
 - Oportunistické infekce (*různé Candida, Pneumocystis carinii*)
- hodnocení specifické reakce lymfocytů je nutné pro efektivní diagnostiku:
 - primárních imunodeficiencí
 - sekundárních imunodeficiencí – infekce, malnutrice, trauma, nádory, účinky terapie
 - autoimunitních nemocí



Druhy lymfocytů a jejich funkce

- **T-lymfocyty**

- Proliferace
- Pomocné CD4+ - Th lymfocyty produkce cytokinů k aktivaci makrofágů, pomoc cytotoxickým a B-lymfocytům
- Cytotoxické T-lymfocyty: zabíjení infikovaných buněk, produkce cytokinů

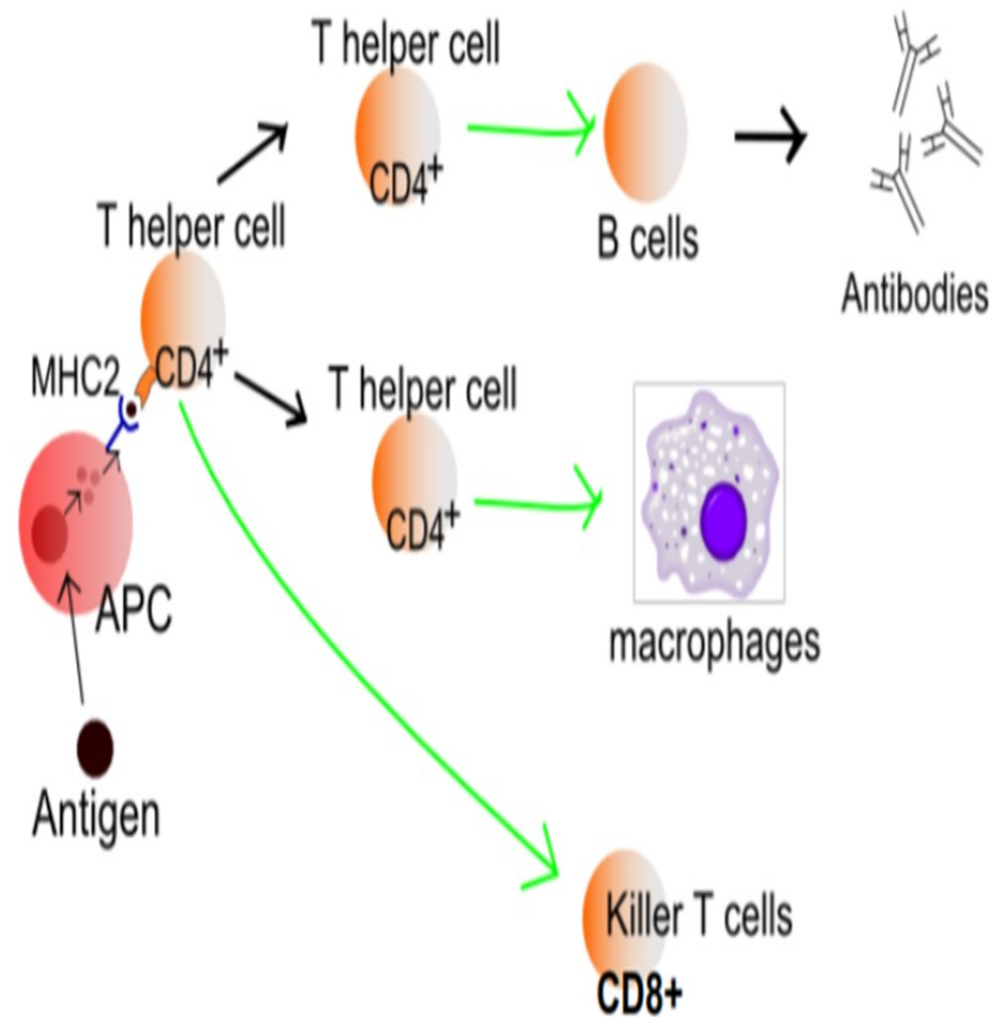


- **B-lymfocyty:**

- produkce protilátek
- produkce cytokinů
- proliferace

- **NK – buňky:**

- aktivace
- zabíjení infikovaných či nádorových buněk



Funkční testy lymfocytů

- Stimulace plné krve nebo mononukleárních buněk (PBMC) nebo izolovaných populací
- Sledování:
 - Proliferace
 - Produkce cytokinů
 - Produkce protilátek
 - Exprese aktivačních a kostimulačních molekul
 - Sledování aktivace transkripčních faktorů
- K výše uvedeným metodám používáme:
 - In vitro kultivace
 - Kultivační média, růstové faktory, aktivační látky, cytokiny
 - Atmosféra CO₂
 - Teplota 37°C



Možnosti separace - historické shrnutí

- První pokusy o separaci jednotlivých typů leukocytů kolem r. 1960
- Používání fyzikálních charakteristik (hustota) nebo biochemických odlišností (přítomnost specifických enzymů) (např. L-leucin-metylester je toxický pro monocyty s obsahem lysozymů a NK buňky)
- 1968 Boyum publikoval metodu separace na hustotním gradientu (FICOLL)
- Podobné metody používaly arabinogalaktan (stractan) 13-17%
- 80. léta – objevují se metody separace založené na reakci Ag-Ab
- Rozetové metody
- Adherence makrofágů k plastům, B buňky + nylonová vlna



Principy separace

- Podle čeho se separuje
 - Fyzikální vlastnosti
 - Velikost buněk
 - Hustota (densita)
 - Rychlost sedimentace při centrifugaci
- Biologické vlastnosti:
 - Přirozené schopnosti buněk (adherence buněk na plastik)
 - Povrchová exprese molekul - markerů
- Kritéria pro výběr metody
 - Čistota a výtěžek separace
 - Doba zpracování
 - Finanční náročnost

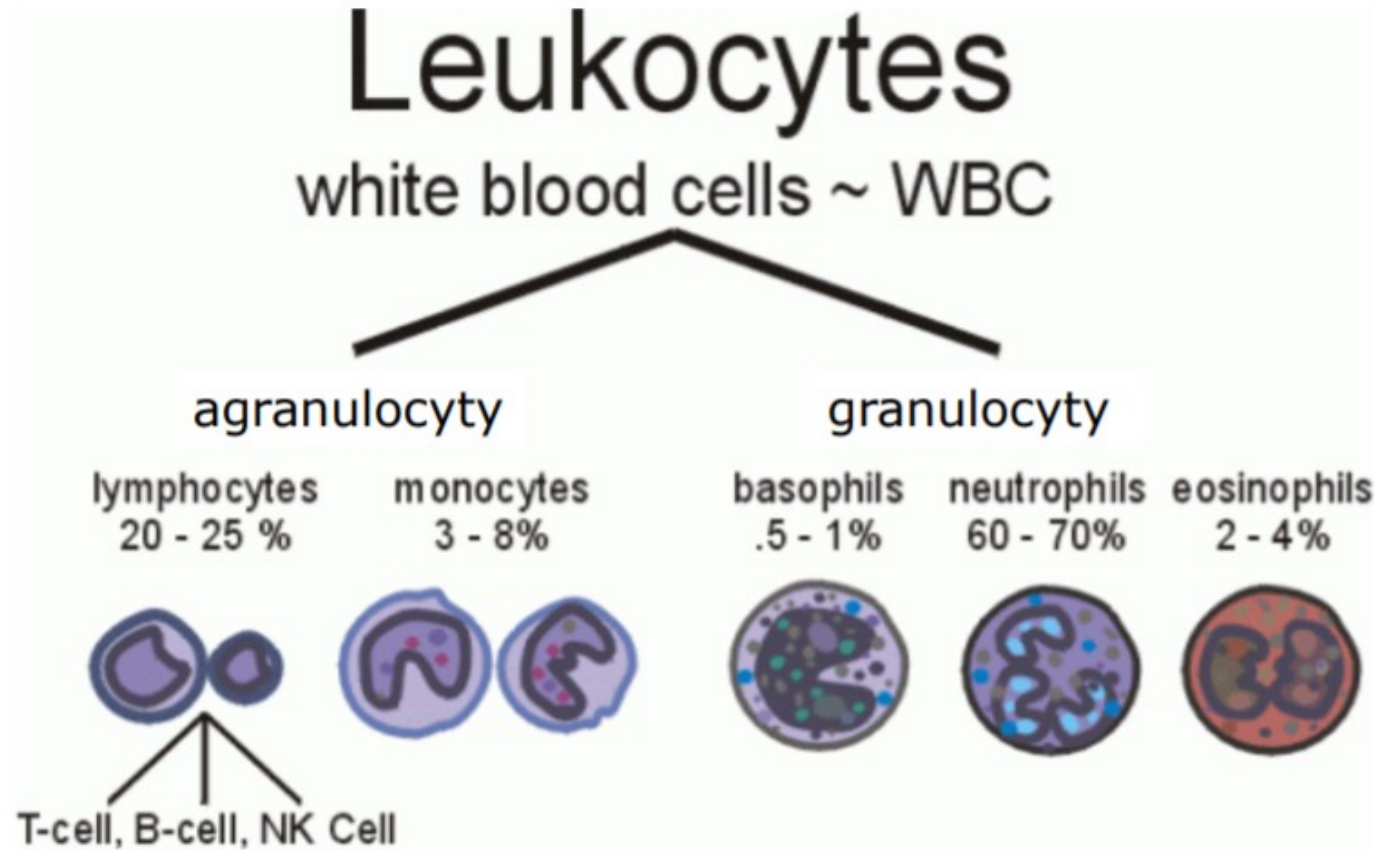


Separace buněk

- Výchozí materiál:
- Solidní orgán: Tkáň se rozřeže na malé částičky, které se ponoří do kultivačního média. Buňky pak rostou v kultivační nádobě.
- Tkáň se rozvolní na jednotlivé buňky
mechanicky homogenizátorem,
enzymatickým natrávením -trypsinem, kolagenázou, pronázou, dispázou, elastázou,...
- Krev, kostní dřeň – již rovnou buněčná suspenze
- Směsné populace buněk – pro funkční testy potřeba izolovat určitý typ buněk od ostatních populací buněk
- Nádorová tkáň: oddělení nádorových buněk od nenádorových
- Kostní dřeň: CD34+ kmenové buňky od ostatních buněk
- Krev: izolace různých typů leukocytů

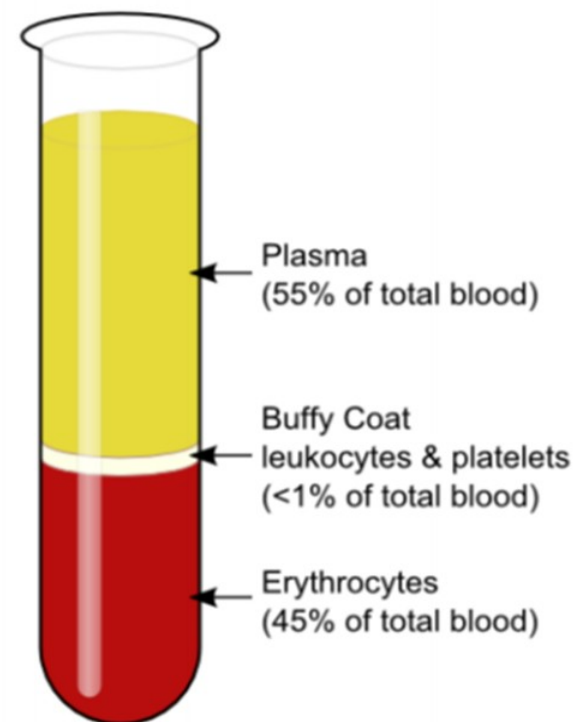


Typy leukocytů




Základní separace krevních složek

- Používá se na transfuzních stanicích
- Nesrážlivá krev se centrifuguje rychlostí 1500-2000g (300-3400rpm)
- Krev se rozdělí na tyto složky:
 - Červené krvinky
 - Plazma bohaté na destičky
 - Buffy coat – bílé krvinky a destičky
 - Destičky jsou separovány z vrchní frakce a z buffy coatu



Odstaňování erytrocytů – hypotonická lýza

- Založeno na větší náchylnosti erytrocytů k hypotonickému šoku ve srovnání s ostatními leukocyty na základě méně stabilní membrány erytrocytů
- Používané metody:
 - Osmotická lýza chloridem amonným (0,84%) 
 - Destilovanou vodou
 - Změnou pH – kyselina mravenčí
 - Poté následuje návrat buněk do izotonického prostředí
- Použití – příprava vzorků pro průtokovou cytometrii:
 - Značení protilátkami
 - Lýza erytrocytů
 - Promytí
 - Měření na cytometru a analýza

Získání PBMC pomocí nespojitě gradientové centrifugace

- Princip spočívá v navrstvení na sebe dvou roztoků o různých hustotách
- Při navrstvování tvoří horní vrstvu plná krev
- Po centrifugaci zůstanou buňky mezi roztoky s vyšší a nižší hustotou
- Jako hustotní médium se používají sacharidová média nebo složité sacharidy (Ficoll)
- Ficoll 400 – syntetický vysokomolekulární polymer sukrózy a epichlorohydrinu. MR. 400 000
- Ficoll Pague – separační činidlo – vodný roztok o hustotě 1,077g/ml - obsahuje 5,7g Ficollu 400 a 9g ditrazoátu sodného

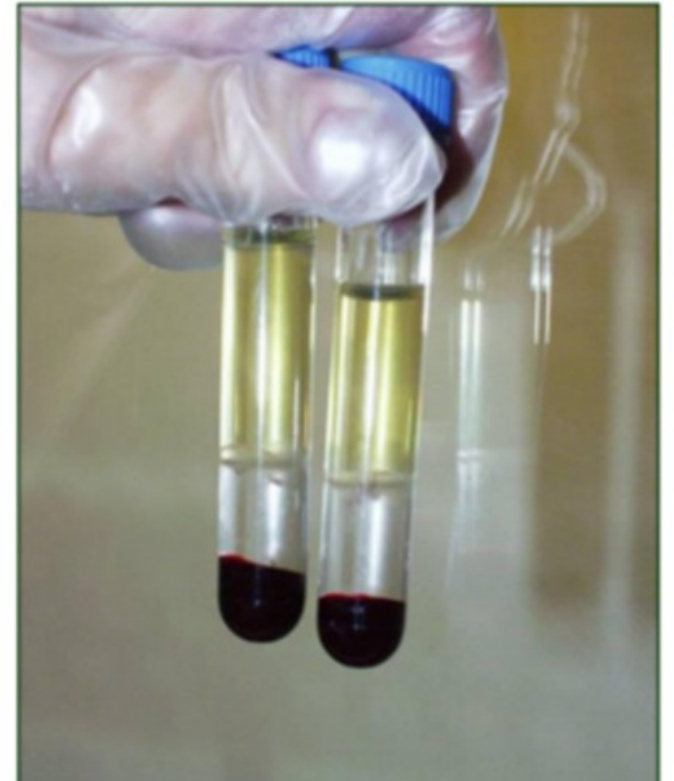
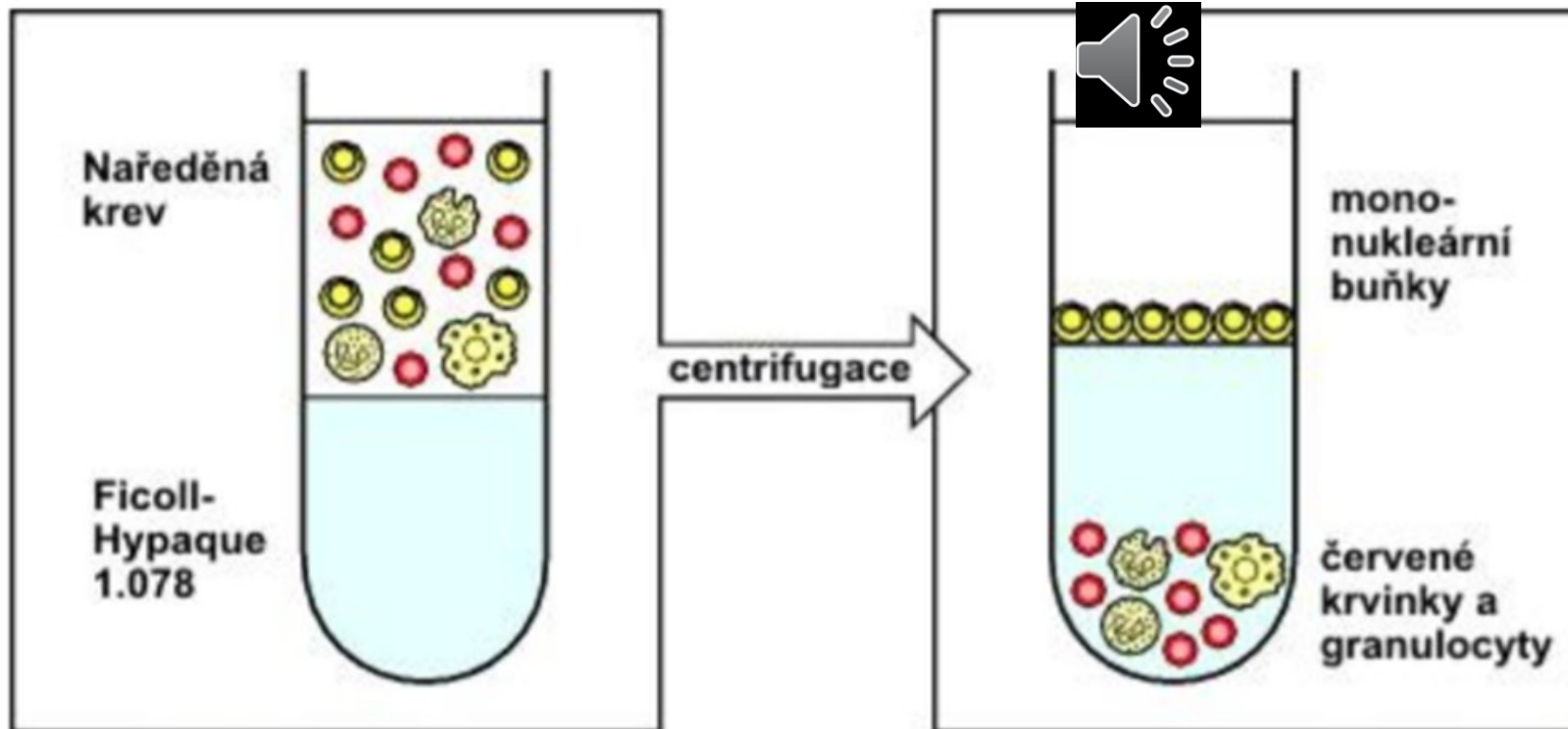


Gradientová centrifugace – separace mononukleárních buněk z plné nesrážlivé krve

Plná krev se opatrně navrství na hustotní médium

Následuje centrifugace – 20-30 min

Separace jednotlivých složek krve – viz obrázek



Separace monocytů pomocí adherence na plastové povrchy

- Užíváno obvykle po separaci PBMC
- Monocyty – přirozená schopnost adherovat na povrch kultivačního plastiku – probíhá několik hodin
- Ostatní buňky, zejména lymfocyty zůstávají plovoucí v médiu
 - Čistota separace: kolem 70-80%
 - Účinnost separace: méně než 50%
- Výhody: finančně nenáročné
- Nevýhody:
 - účinnost a prodloužená doba separace
 - variabilita mezi dárci



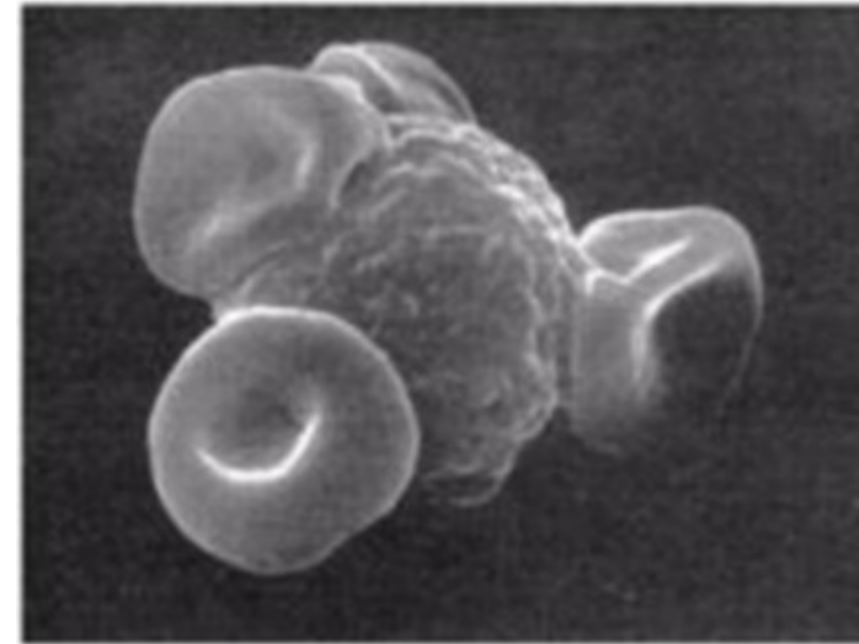
Separace populací leukocytů na základě povrchových znaků – reakce antigen (Ag) a protilátka (Ab)

- Tvorba rozet
- Imunomagnetická separace
- Sortování buněk pomocí průtokové cytometrie



Separace populací leukocytů na základě povrchových znaků – tvorba rozet

- Lymfocyty tvoří shluky s červenými krvinkami – tzv. rozety, viditelné pod mikroskopem, jako lymfocyt obklopený erytrocyty
- Používají se k izolaci T-lymfocytů, B-lymfocytů – založeno na přítomnosti specifických receptorů CD2 a LFA
- T-lymfocyty: exprese molekuly CD2, na kterou se váží beraní erytrocyty – tzv. E- rozety
- B-lymfocyty: exprese molekuly LFA (Lymphocyte function-associated antigen) vážící myší erytrocyty – M-rozety
- Nenavázané erytrocyty se odstraní hypotonickou lýzou nebo je možné rozety separovat pomocí gradientové centrifugace – využívají zejména komerční kity:
 - rozety vytvořené pomocí protilátek



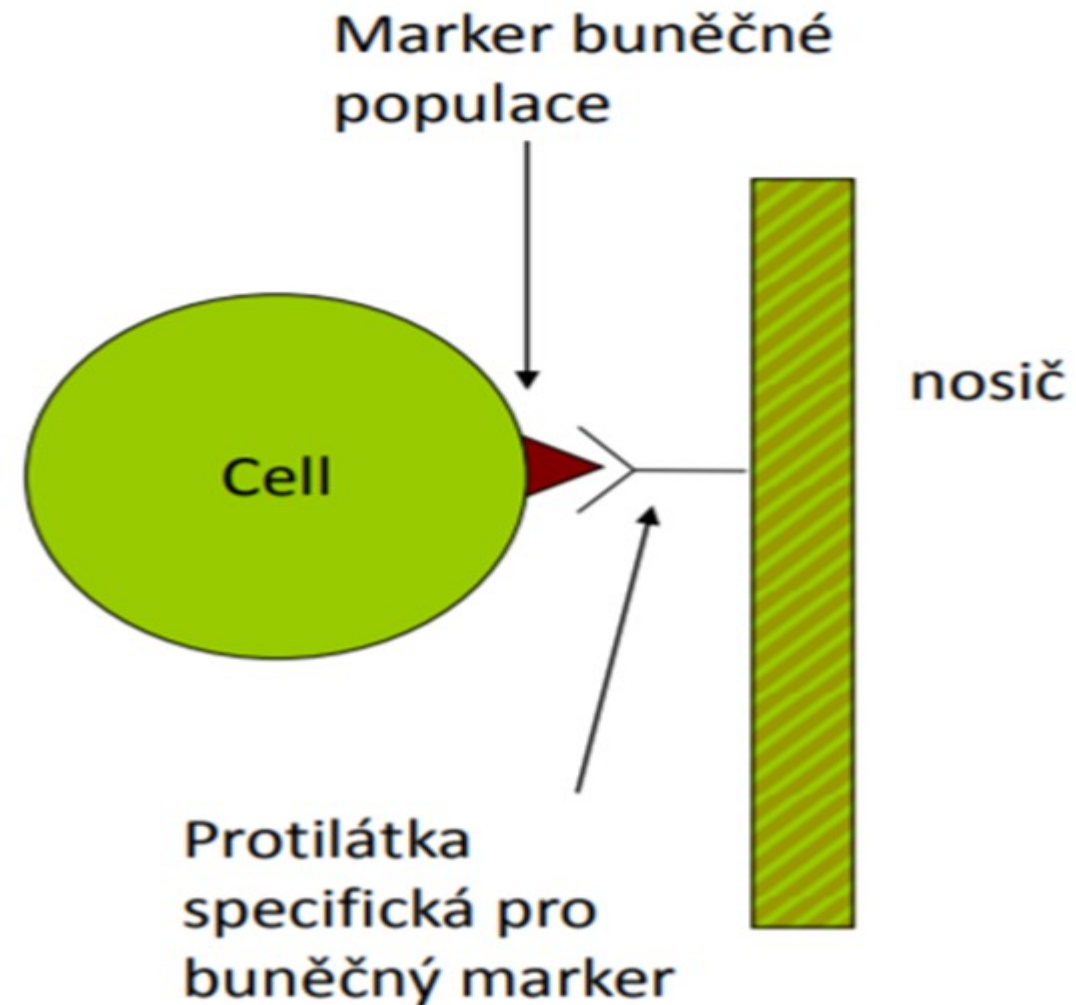
Separace populací leukocytů na základě povrchových znaků

- Pozitivní separace: z buněčné suspenze je pomocí specifického markeru za přítomnosti specifických protilátek navázána a poté izolována konkrétní buněčná populace:
 - CD3 – T-lymfocyty
 - CD19, CD20 B-lymfocyty
 - CD15 – neutrofily.....
- Negativní separace nebo deplece: z buněčné suspenze jsou odstraněny pomocí specifických protilátek buňky, které nejsou cílem separace
- Oba přístupy mohou být kombinovány – při hledání složitěji definovaných subpopulací – příklad izolace T regulačních lymfocytů
- Čistota separace se obvykle pohybuje na 90%



Separace populací leukocytů na základě povrchových znaků – reakce Ag a protilátka

- Na nosič navázaná protilátka proti Ag specifickému pro hledanou buněčnou populaci
- Různé vlastnosti nosiče – magnetismus, hustota, velikost – umožnění separace protilátkou označených buněk
- Možnost využití principu sloupcové chromatografie – protilátky jsou konjugovány kuličkami: *kuličky s navázanými buňkami jsou při separaci zadrženy v koloně nebo ve zkumavce a teprve po odmytí nenavázaných buněk následuje proces vyplavení buněk navázaných na kuličky*
- Výhody: vysoká čistota a výtěžek
- Nevýhody: časová a finanční náročnost



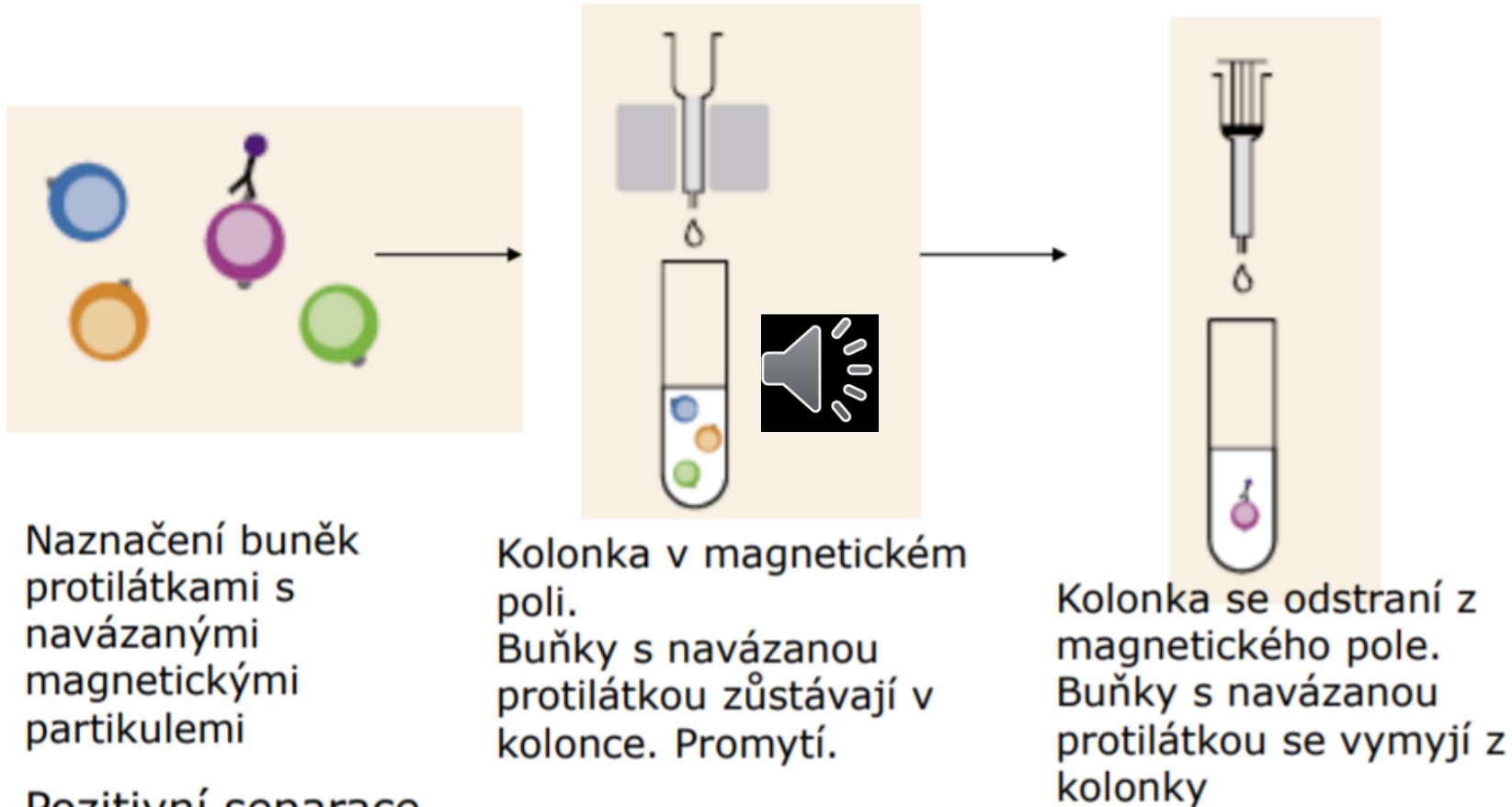
Separace populací leukocytů na základě povrchových znaků, reakce Ag a protilátka:

Magnetická separační kolona

- Suspenze buněk se inkubuje s magnetickými partikulami označenými monoklonální protilátkou proti specifickému receptoru přítomnému na hledané populaci buněk
- Poté prochází buněčná suspenze kolnou umístěnou v silném magnetickém poli
- Magneticky „označené“ buňky jsou zadrženy v koloně – ostatní neznačené buňky odtečou z kolony pryč
- Po vyjmutí kolony z magnetického pole jsou zadržené buňky vymyty
- Obě populace jsou použitelné k dalším experimentům



Imunomagnetská separace – pozitivní selekce



Naznačení buněk protilátkami s navázanými magnetickými partikulami

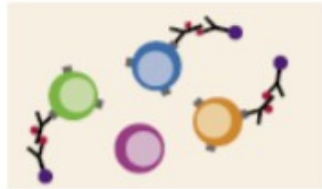
Kolonka v magnetickém poli. Buňky s navázanou protilátkou zůstávají v kolonce. Promytí.

Kolonka se odstraní z magnetického pole. Buňky s navázanou protilátkou se vymyjí z kolonky

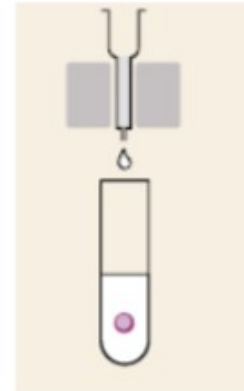
Pozitivní separace

- vyšší čistota separace
- na vyizolovaných buňkách jsou navázány protilátky, které mohou ovlivnit vlastnosti buněk ve funkčních testech

Imunomagnetická separace – negativní selekce



Naznačení nechtěných populací buněk protilátkami s navázanými na magnetické partikule



Kolonka v magnetickém poli. Buňky s navázanou protilátkou zůstávají v kolonce. Neoznačené buňky (požadovaná populace) se vymyjí do nové zkumavky.

negativní separace


- vyizolované buňky jsou „**untouched**“

MACS – automated Magnetic Cell Sorting

- Komerční soupravy k izolaci libovolné buněčné subpopulace na magnetické koloně
- Použití magnetických partikulí konjugovaných s monoklonálními protilátkami
- Buňky lze separovat přímo z plné krve za 40 minut, čistota 95-98%
- Rychlost metody – až 10 milionu buněk za sekundu
- Kompatibilní s průtokovou cytometrií – lze zároveň provádět fluorescenční i magnetické značení

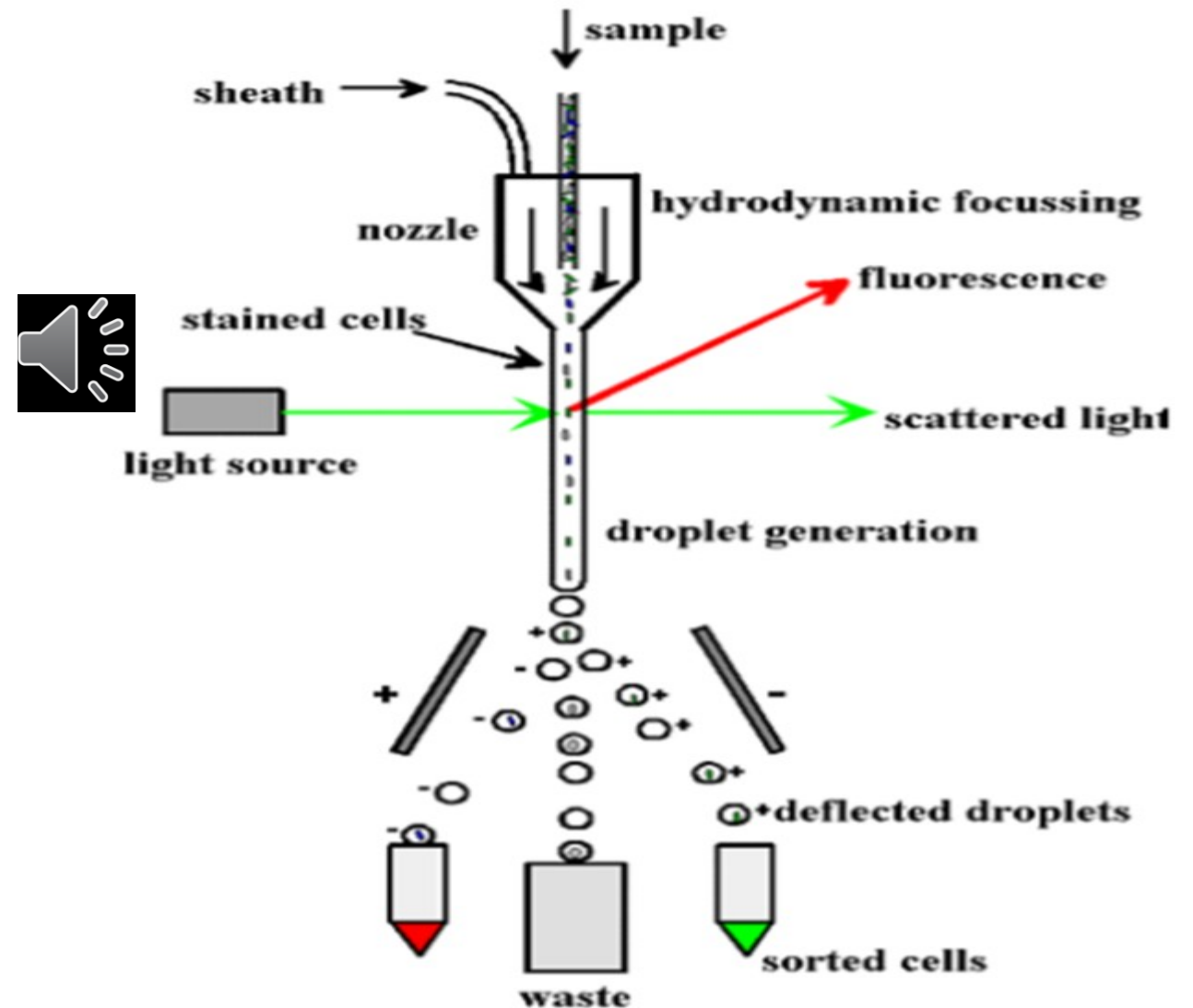


FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

- Založeno na principu průtokové cytometrie
 - buňky v suspenzi jsou označeny monoklonální protilátkou s navázaným fluorochromem
- Při průchodu detektorem je pomocí  elektrického výboje cílová buňka vychýlena ze své dráhy a nasměrována do sběrné zkumavky
- Vysoká čistota separace
- Průchod až 50 000 buněk za vteřinu

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

- Výhody
 - Možnost přesné definice cílové buněčné populace pomocí vhodné kombinace protilátek
 - Vysoká čistota
- Nevýhody:
 - Finančně náročné na přístrojové vybavení i provedení pokusu
 - Časová náročnost
 - Ovlivnění životnosti buněk
 - Obtížné zajištění sterility
 - Nízké výtěžky



Funkční testy lymfocytů

- Stimulace plné krve nebo mononukleárních buněk (PBMC) nebo izolovaných populací
- Sledování:
 - Proliferace
 - Produkce cytokinů
 - Produkce protilátek
 - Exprese aktivačních a kostimulačních molekul
 - Sledování aktivace transkripčních faktorů
- K výše uvedeným metodám používáme:
 - In vitro kultivace
 - Kultivační média, růstové faktory, aktivační látky, cytokiny
 - Atmosféra CO₂
 - Teplota 37°C

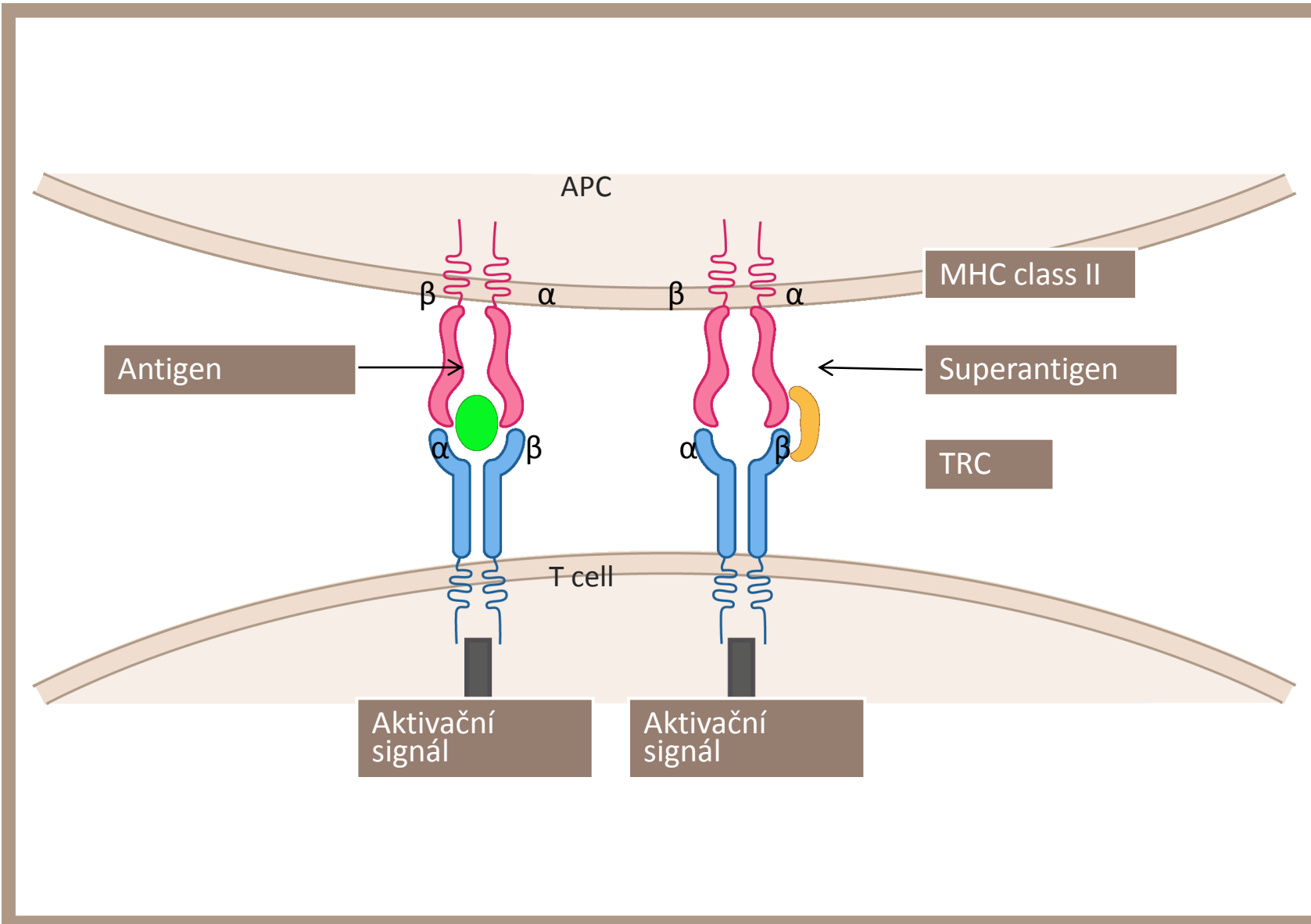


Aktivace T-lymfocytů

- T-lymfocyty poznávají antigeny pouze ve formě **peptidových fragmentů vázaných na MHC I nebo II**. (*Fenomen MHC-restrikce*) na *antigen prezentujících buňkách (APC) – dendritické buňky, makrofágy*
- Antigen musí být nejdříve v APC „zpracován“ (*processing*)- nativní protein je proteolyticky degradován na peptidy, které se intracelulárně váží na molekuly MHC. Tento komplex se dostává na buněčnou membránu antigen prezentující buňky, kde je schopen reagovat s T-lymfocytem prostřednictvím TCR, který je pro daný Ag specifický.
- Každý T-lymfocyt v krvi může být specifický pro jiný Ag – je **nutné najít látky schopné aktivovat všechny T-lymfocyty**



Aktivace TCR antigenem a superantigenem



Příklady superantigenů:

**phytohemagglutinin
(PHA)**

concanavalin A (ConA)

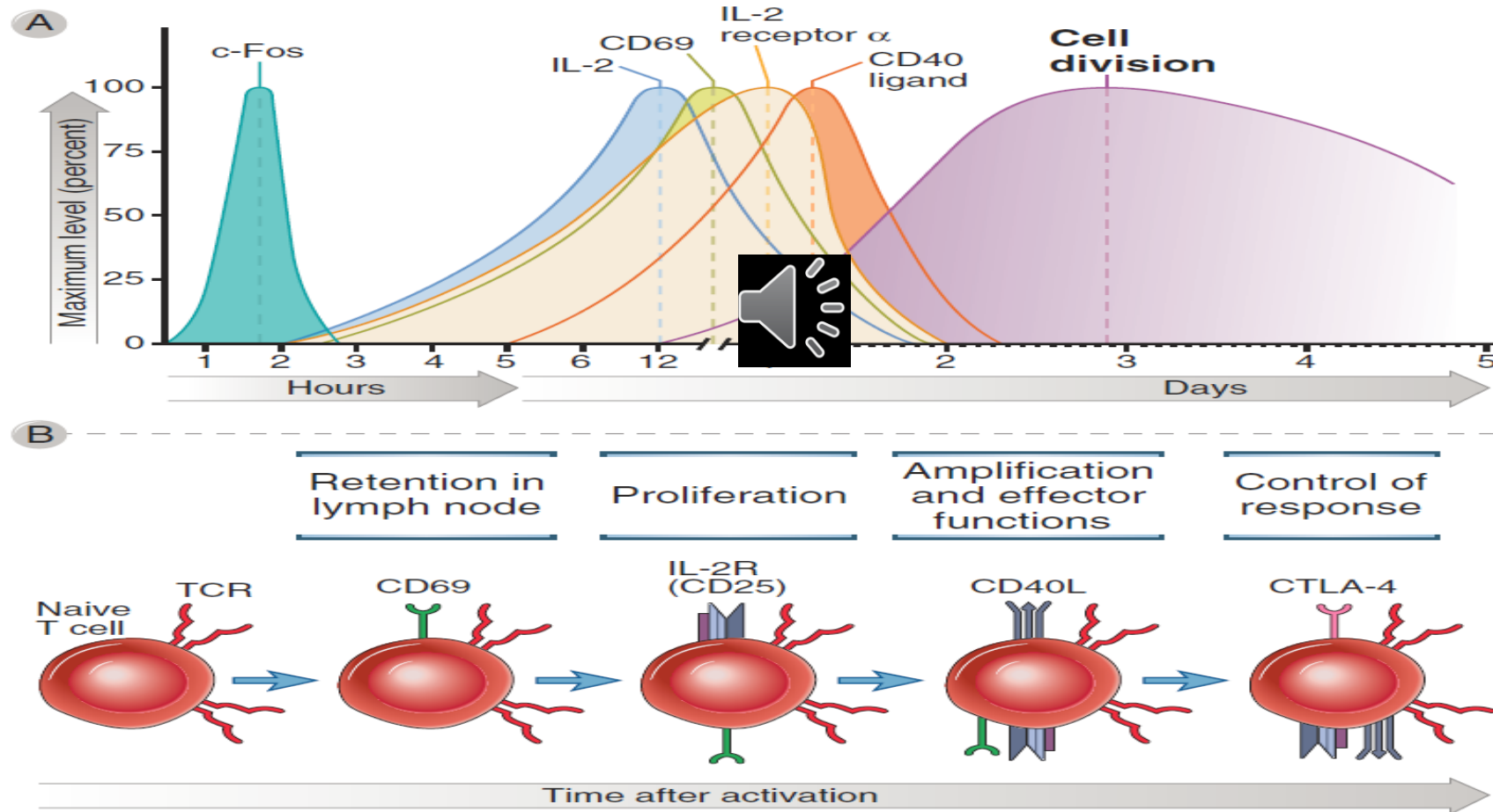
**pokeweed mitogen
(PWM)**



Funkční vyšetření T-lymfocytů

- Aktivace
 - Proliferace
 - Produkce cytokinů
 - Vyšetření exprese kostimulačních molekul CD40L, ICOS
- Průběh aktivace lymfocytů je možné sledovat pomocí povrchových markerů exprimovaných v určitých fázích aktivace na povrchu nebo uvnitř lymfocytů

Změny povrchových molekul na povrchu T-lymfocytů během aktivace



Příprava vzorku

- Nesrážlivá krev odebraná do Heparinu – v případě přímé stimulace v plné krvi
- Odběr do EDTA – nutnost odmytí kyseliny diamin tetraoctové – chelatuje kalcium a tím fixuje lymfocyty - izolace PBMC
- Naředěná krev či izolované buňky se napipetují do jamek kultivační destičky, přidá se médium, stimulanty a aktivuje se:
- Aktivace: 4-24 hod v závislosti na použitém stimulans
- Proliferace: nejméně 2-3 dny, v závislosti na druhu stimulace
- Produkce cytokinů: 4-72 hod – v závislosti na druhu cytokinů



Aktivace a proliferace T-lymfocytů

- Časná aktivace – vyšetření povrchových znaků CD69 – vystupuje na povrch 4hodiny od začátku aktivace v závislosti na způsobu aktivace
- CD25- vystupuje na povrch po 12-ti hodinách od začátku aktivace
- Proliferace – schopnost T-lymfocytů množit se po Ag stimulaci
- phytohemagglutinin (PHA) (Fazole zahradní)
- concanavalin A (ConA) (Jack Bean)
- pokeweed mitogen (PWM) (Líčidlo americké)
- Anti-CD3+ anti- CD28



Měření aktivace a proliferace T-lymfocytů

- Aktivace - metodou průtokové cytometrie
- Proliferace:
 - Inkorporace radioaktivně značeného thymidinu
 - Inkorporace bromdeoxiuridinu či jiných analogů do DNA, jejich následné označení a měření : spektrofotometricky, fluorescenčně, průtokovou cytometrií
 - Měření Ag Ki-67 – jaderný protein, podílející se na regulaci buněčného dělení, exprimuje se pouze při proliferaci buňky – detekce: průtoková cytometrie
 - Poznámka – jedná se o měření jaderného Ag, nutnost fixace a permeabilizace membrány



PROLIFERAČNÍ AKTIVITA LYMFOCYTŮ

TEST BLASTICKÉ TRANSFORMACE LYMFOCYTŮ

1. suspenze lymfocytů

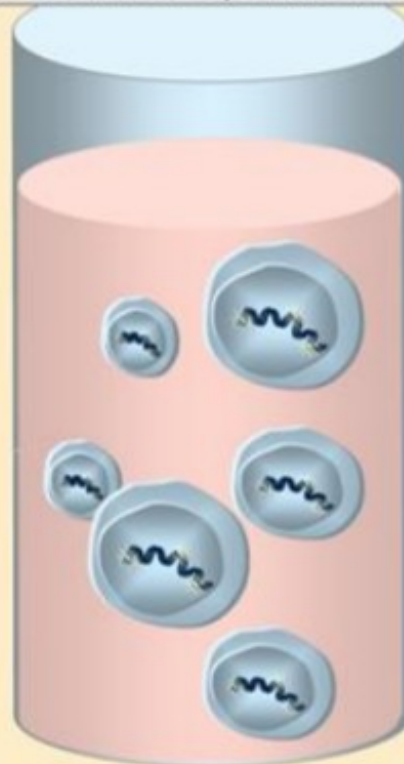
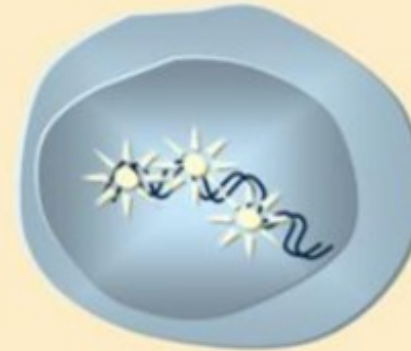
2. + mitogen (*optimální ředění*)

3. inkubace 72 hod / 37°C, atmosféra CO₂

4. + ³H thymidin

5. inkubace 18 hod / 37°C, atmosféra CO₂

6. zabudování izotopu ³H thymidinu do nové DNA



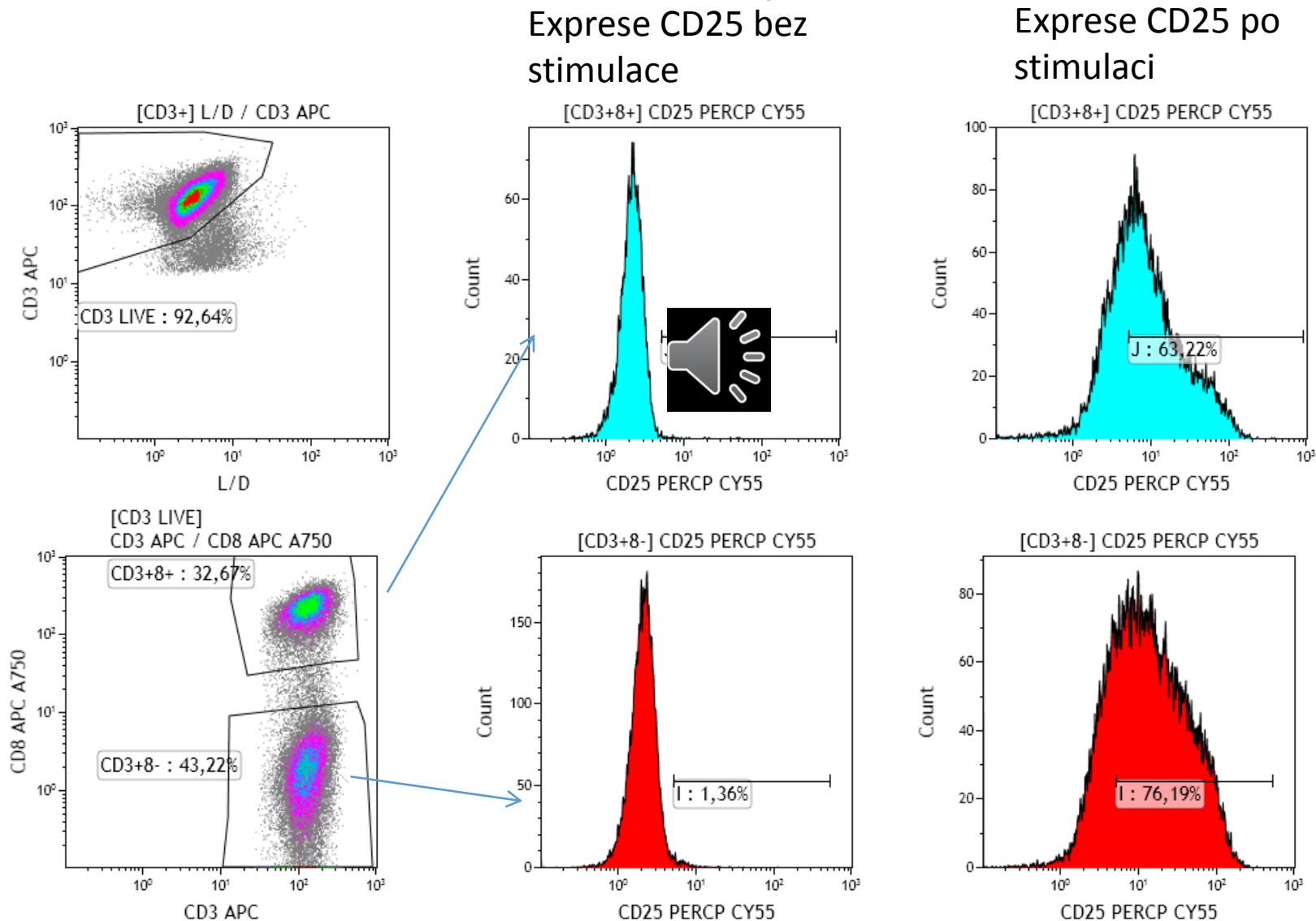
7. sklizeň buněk

MĚŘENÍ RADIOAKTIVITY
KAPALNOU SCINTILACÍ
(cpm)



JK

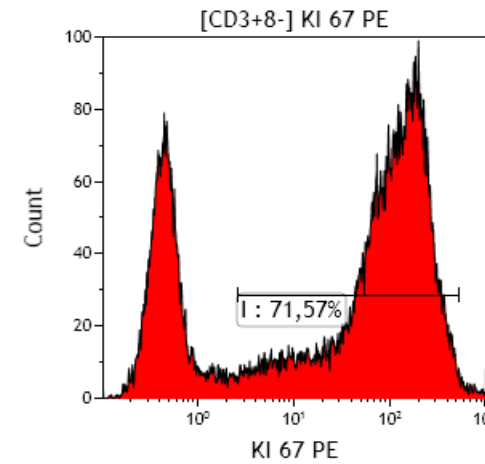
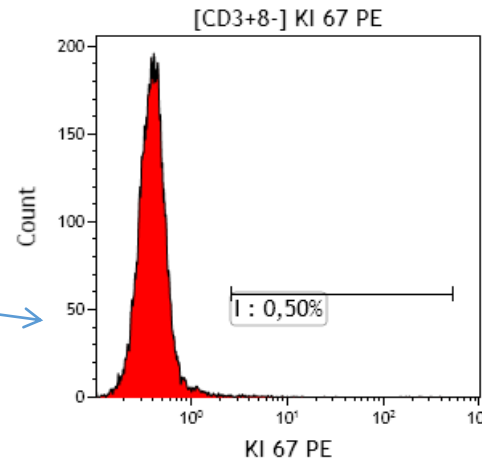
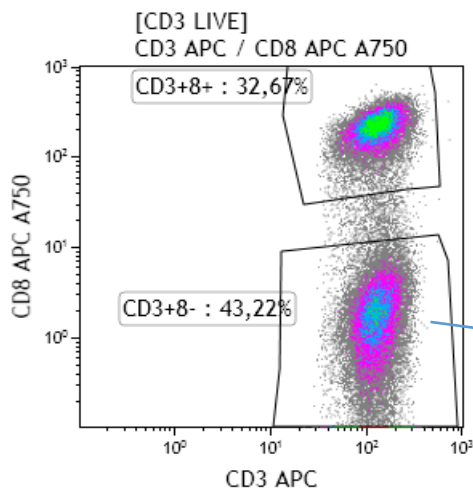
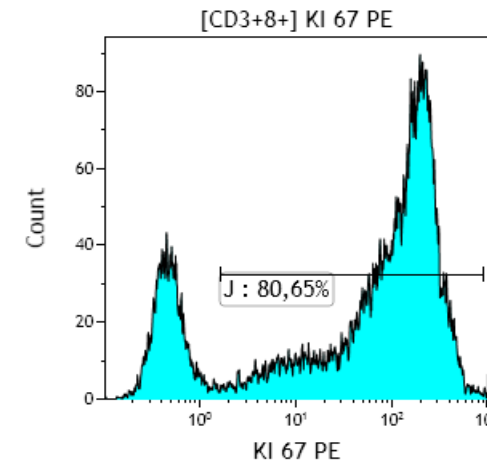
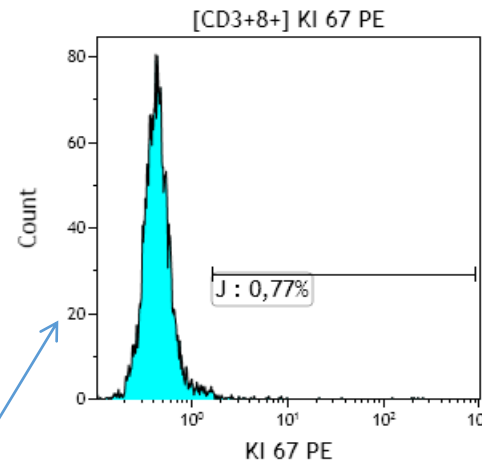
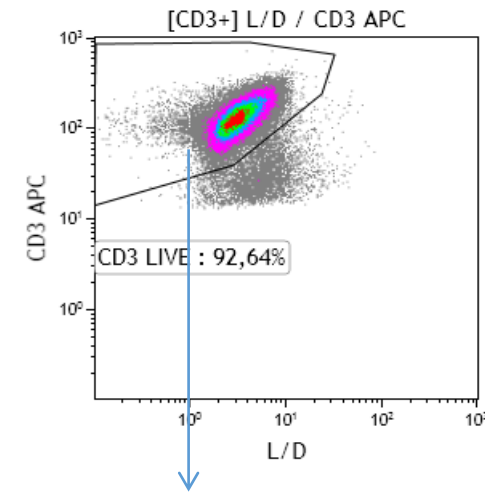
Měření aktivace T-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie



Měření proliferace T-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie

Expresí Ki-67 bez stimulace
Nestimulované

Expresí Ki-67 po stimulaci
Stimulované PHA



Měření produkce cytokinů

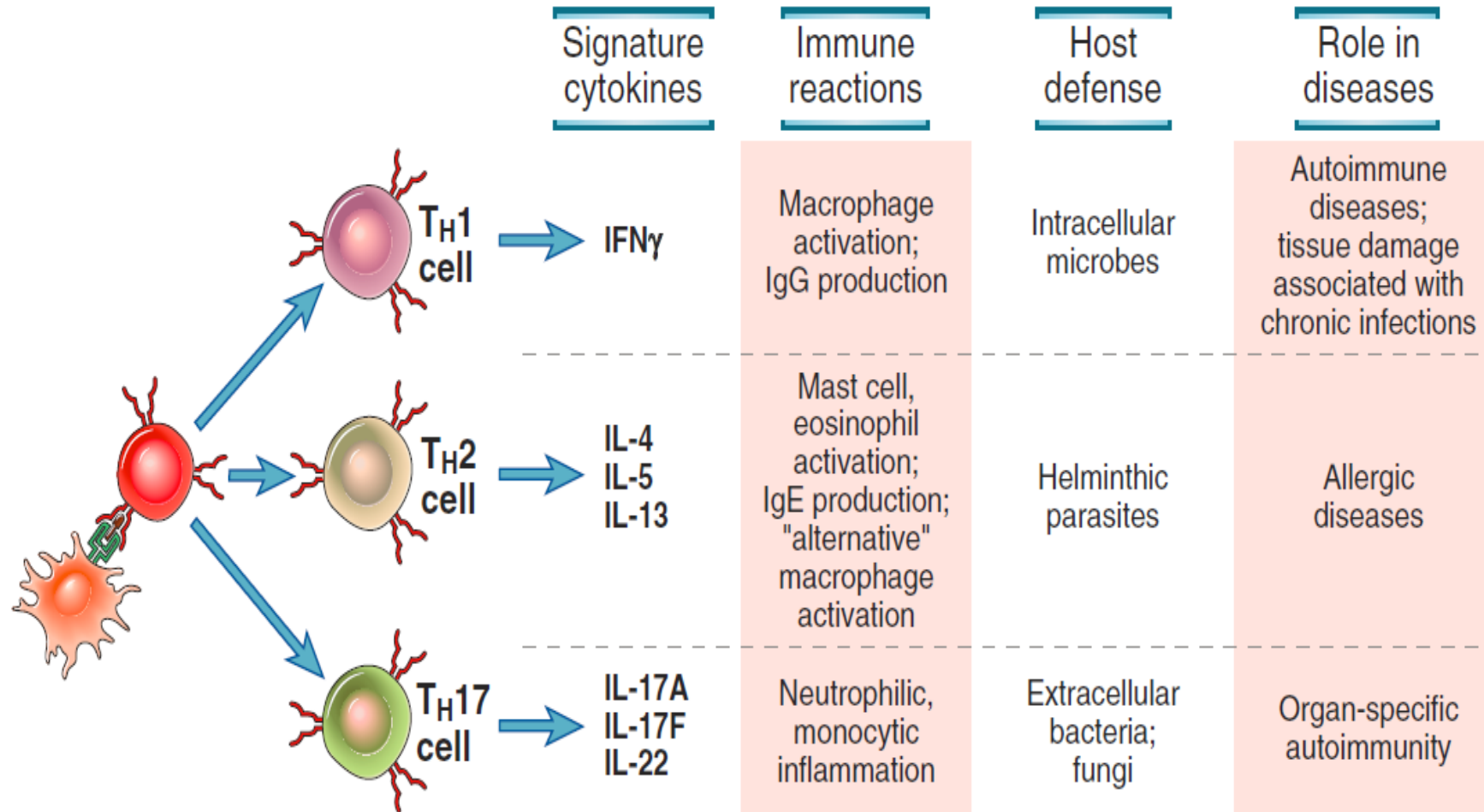
- V plazmě – odráží spíše činnost monocytů
- V supernatantu kultivovaných buněk

Použité metody

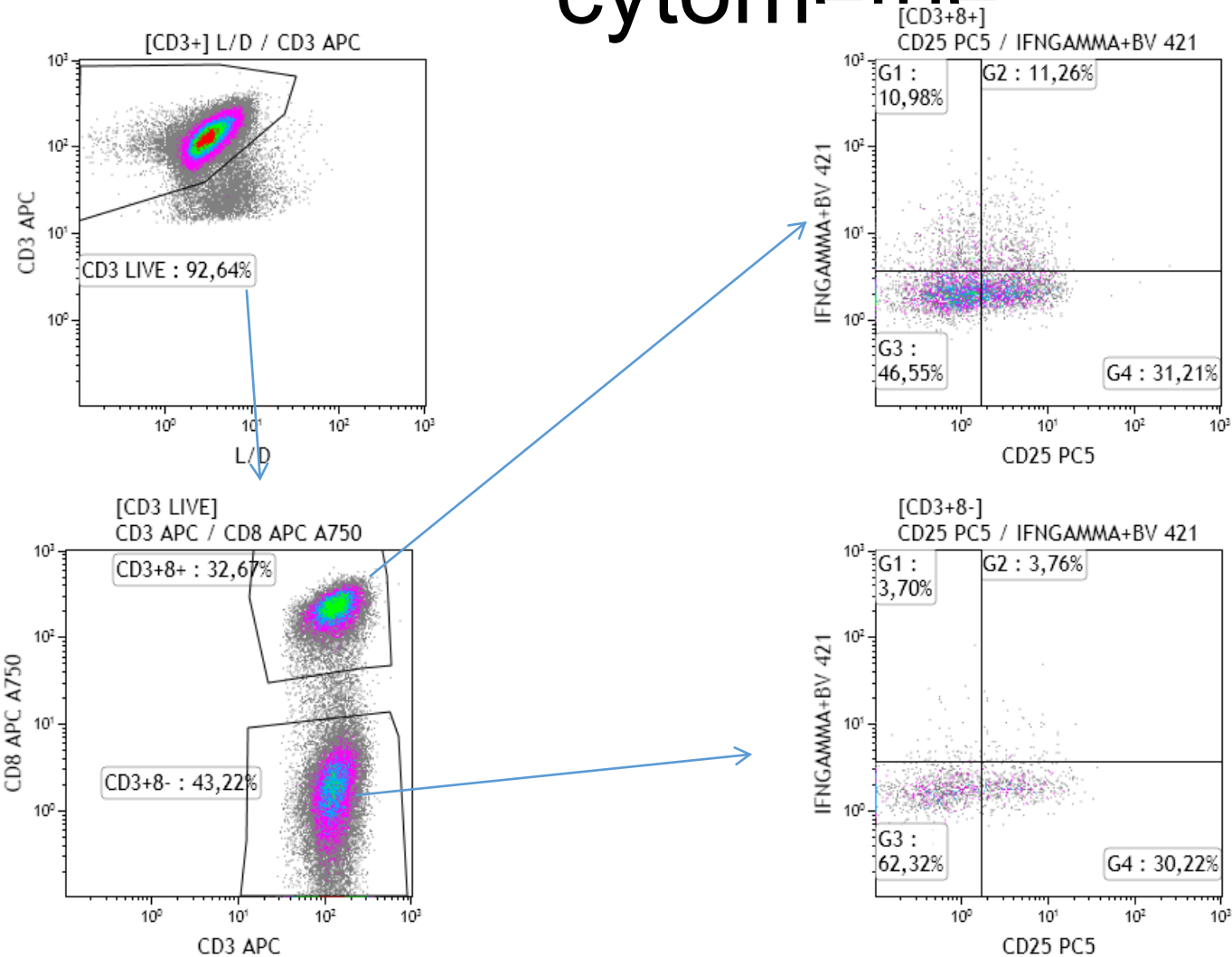
- ELISA
- Přímo v buňkách – průtoková cytometrie nutné přidat Brefeldin nebo Monensin, látky zabraňující vyplavování cytokinů ven z buňky
- ELISPOT



Th1, Th2 a Th17 lymfocyty



Produkce cytokinů – IFN gamma po 18 hod stimulace – vyšetření pomocí průtokové cytometrie



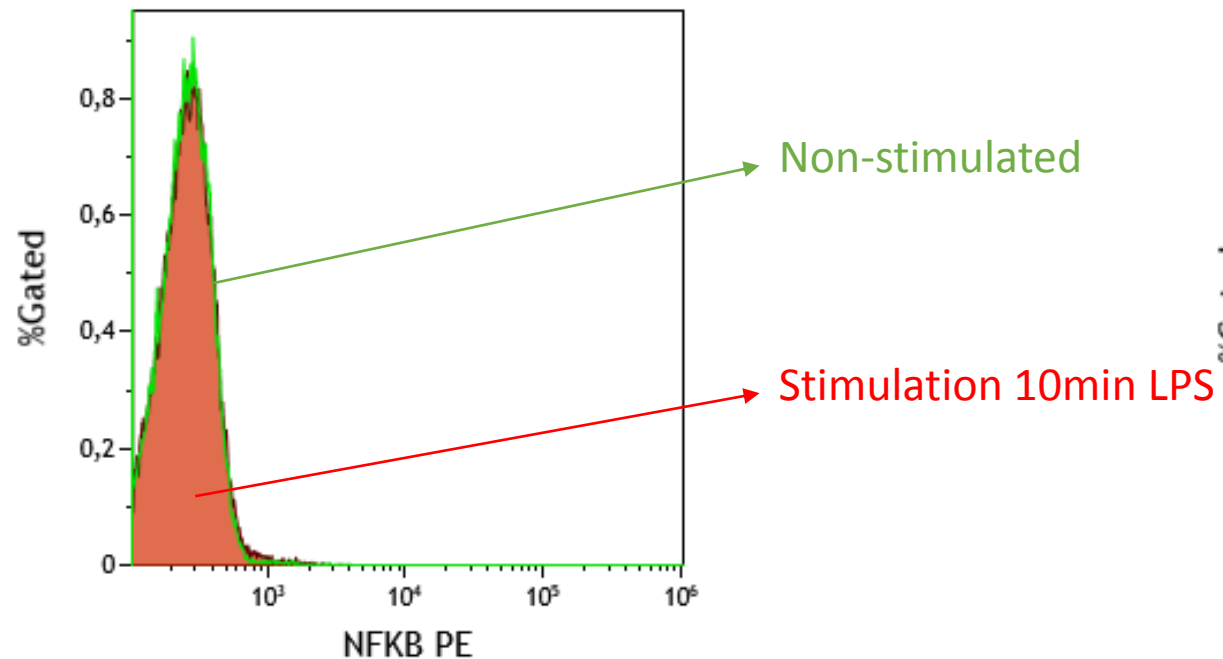
Měření aktivace transkripčních faktorů, příklad aktivita NF-κB

- Po přijetí aktivačního signálu dochází v lymfocytu nebo dalších buňkách imunitního systému k postupnému zapojování jednotlivých transkripčních faktorů. Jedním z nejdůležitějších je transkripční faktor NF-κB
- tvořen skupinou transkripčních faktorů, k nimž patří pět známých členů: p50, p52, RelA (p65), c-Rel a RelB
- Aktivace je regulována udržováním NF-κB v inaktivní formě v cytoplazmě nestimulovaných buněk vazbou na inhibiční molekulu zvanou IκB.
- Působením některých podnětů dochází k degradaci IκB a následnému uvolnění NF-κB.
- Volný NF-κB vstupuje do jádra, kde interaguje s cílovými geny – vede k aktivaci buňky
- **Změna v aktivaci nebo regulaci aktivace NF-κB u primárních imunodeficienci, nádorových buněk apod.**

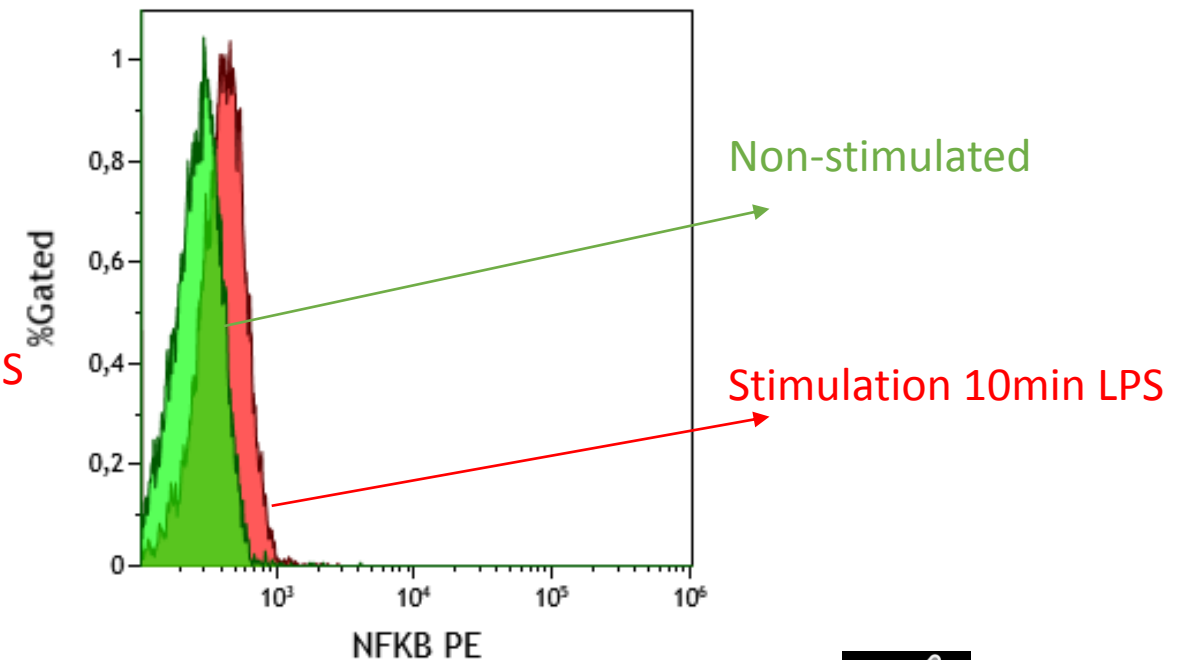


Měření zvýšené fosforylace NF-kB: B-lymfocyty

Zdravá kontrola



Pacient



ELISPOT

- Buď monoklonální nebo polyklonální protilátka specifická pro zvolený analyt je předem navázána na PVDF (polyvinyliden-difluorid) který je na povrchu jamek mikrodostičky.
- Stimulované buňky se pipetují do jamek a mikrodostička se umístí do zvlhčeného CO₂ inkubátoru a inkubují se při 37 °C po určitou dobu.
- Aktivace buňky - uvolnění cytokinu, protilátky, chemokinu, apod.
- Vylučovaná látka = analyt se váže na imobilizovanou protilátkou na dně jamky destičky – je v bezprostřední blízkosti sekrečních buněk

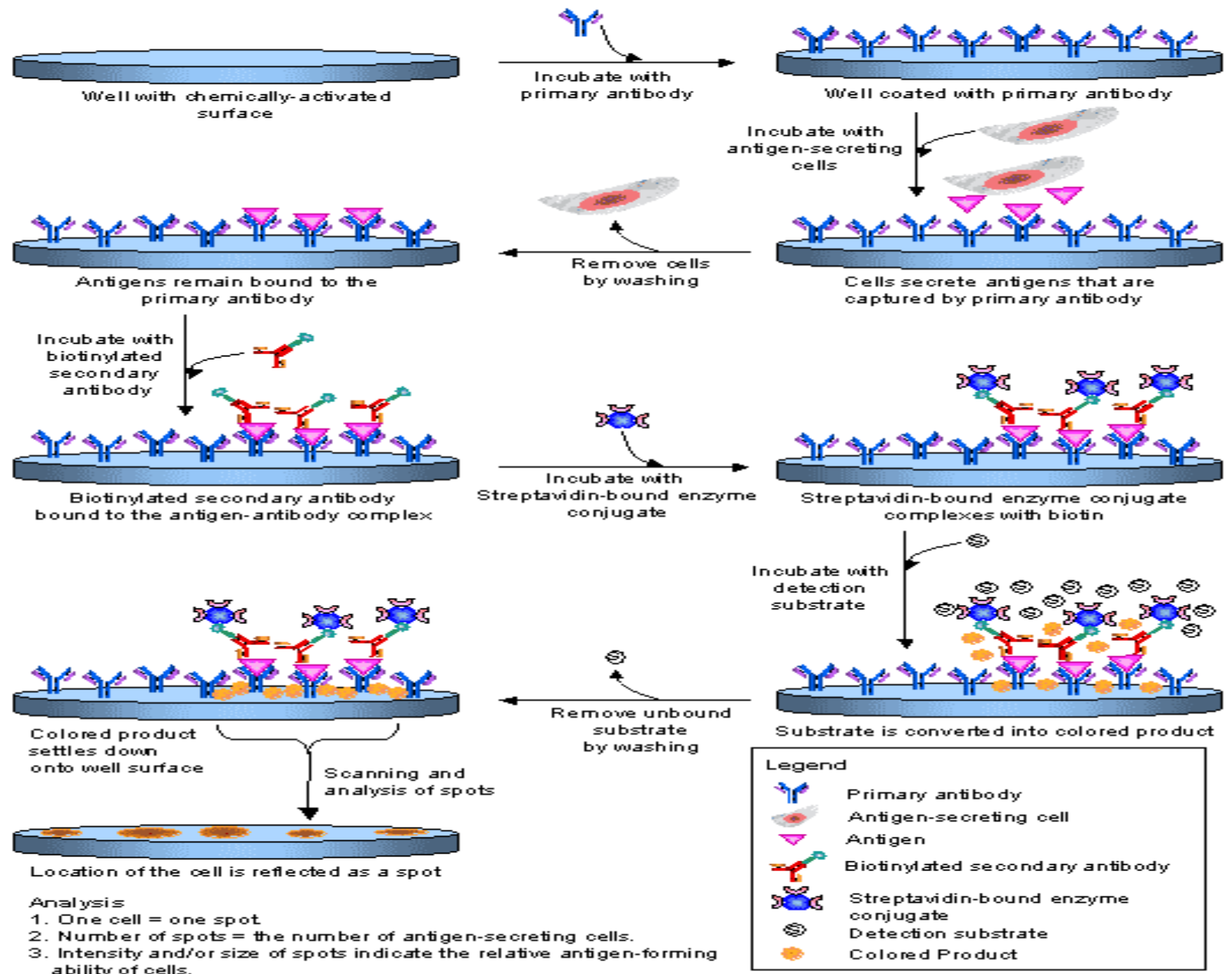


ELISPOT

- Cytokin je tedy "zachycen" navázanými protilátkami v oblasti přímo obklopující sekreční buňku předtím, než má šanci difundovat do kultivačního média, nebo být degradován proteázami a vázán na receptory na okolních buňkách
- Po odstranění všech buněk a nenavázaných látek se do jamek přidá biotinylovaná polyklonální protilátka specifická pro zvolený analyt.
- Následuje promytí nenavázaných biotinylovaných protilátek, přidání alkalické fosfatázy konjugované se streptavidinem.
- Nenavázaný enzym se následně odstraní promytím a přidá se roztok substrátu (BCIP / NBT - Nitrotetrazolium blue chloride).
- Vzniká modročerná sraženina a objevuje se jako skvrny na místech lokalizace cytokinů, přičemž každé jednotlivé místo představuje buňku, která vylučuje studované analyty.
- Místa mohou být počítána pomocí automatizovaného čtecího systému ELISpot nebo ručně pomocí stereomikroskopu.

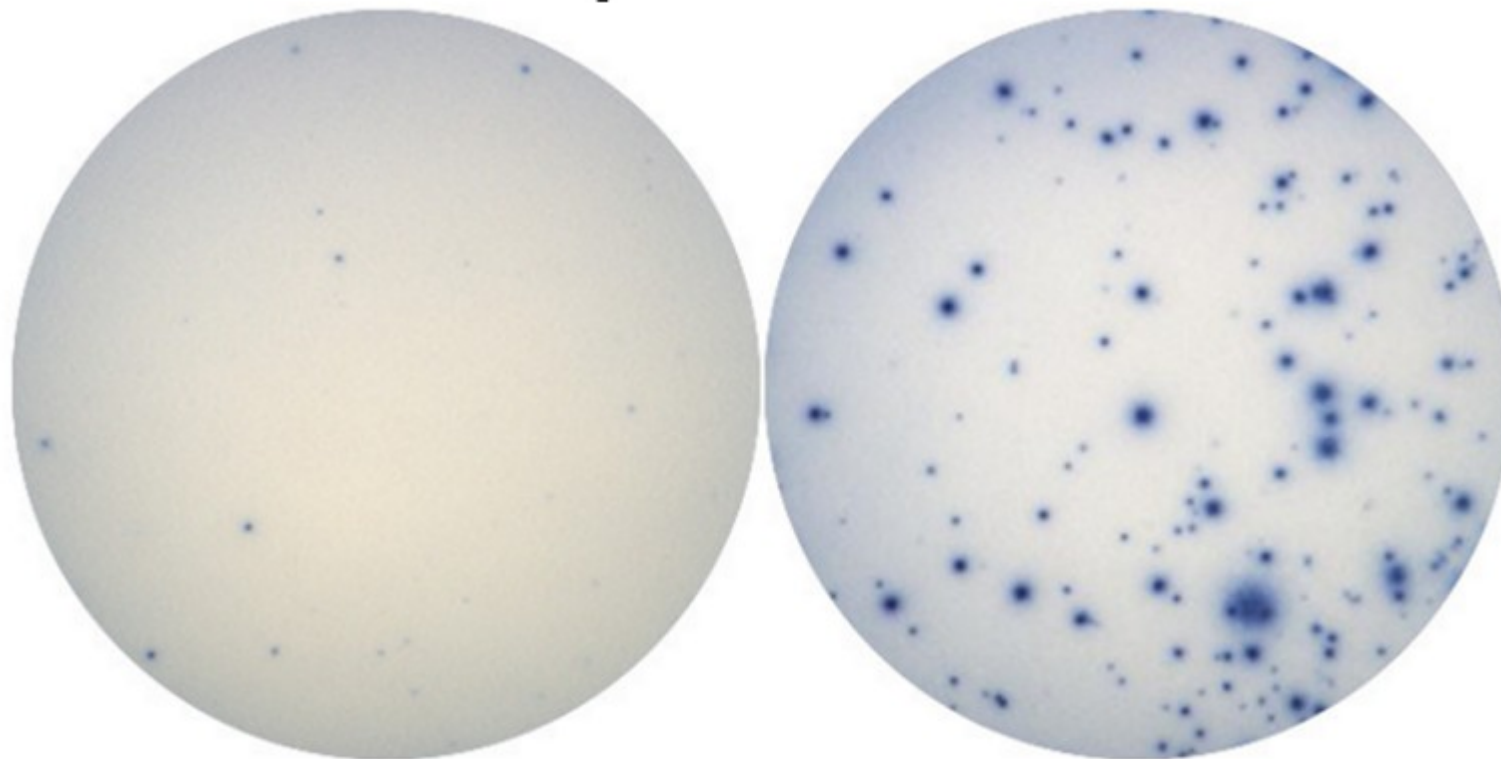


ELISPOT



Výsledek ELISPOT

Human IFN- γ ELISPOT – 384-well



Human PBMC (33,000 cells/well) incubated for 24 hours with or without CMV stimulation.



Shrnutí

- Funkční testy jsou v současné době nejen výzkumným prostředkem, ale i rutinním vyšetřením:
 - Sledování proliferace u imunokompromitovaných pacientů a u nádorových onemocnění
 - Sledování produkce cytokinů u septických pacientů (IL-6)
 - Sledování exprese kostimulačních molekul
stanovení diagnózy hyper IgM syndrom při poruše exprese CD40ligandu

