

Dnes - stručné nakouknutí do:

- 1) Viry a patogeny: Jak zastavit patogen farmakologicky a Jak přirozená imunita kontroluje „normálnost“ buňky
- 2) Flow-cytometrie – pomocník v hematologii a imunitních chorobách
- 3) IN SILICO návrh léčiv
- 4) Aktualita: Navázání RADIO- léčiva na nádorové buňky prostaty

Téma 1

Viry a patogeny: Jak zastavit patogen farmakologicky? A jak přirozená imunita kontroluje „normálnost“ buňky

Oslí můstek 1

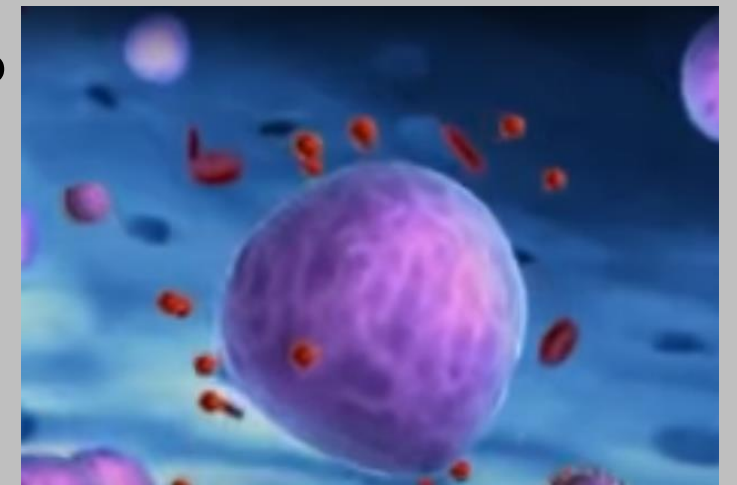
- Co potřebuje virus pro své zmnožení a expanzi z organismu????

Potřebuje

- a) aerosol b) extracelulární matrix c) cytosol ?

Potřebuje

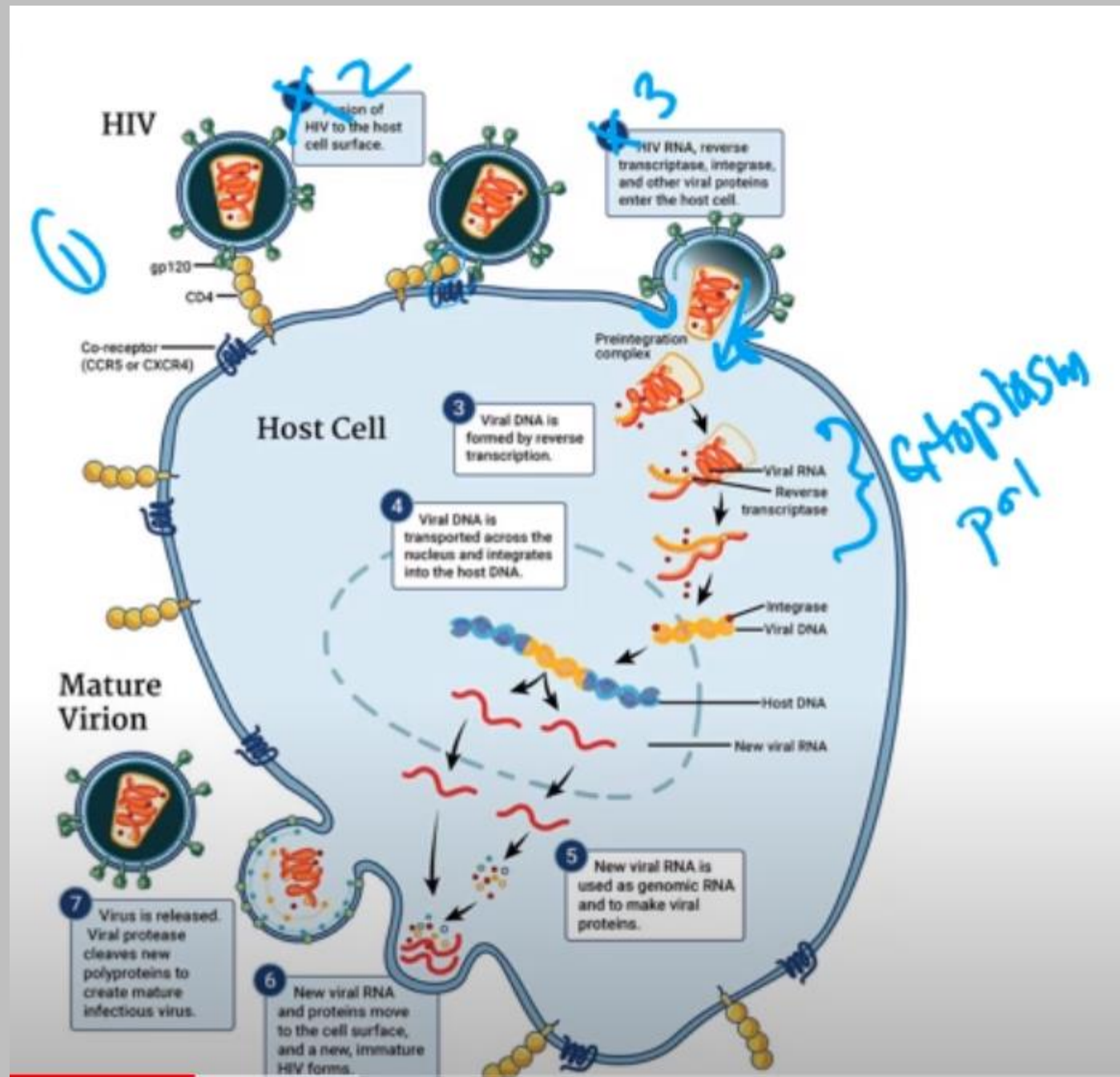
- a) živou buňku b) mrtvou buňku ?



Komplexní průběh invaze typického viru,

zajištění pomnožení DNA/RNA a obalení kapsidem a vypuštění milionů kapsidů ven z buňky.

Každý krok je potenciální místo kde lze virovou aktivitu zbrzdit nějakým vhodným farmakem

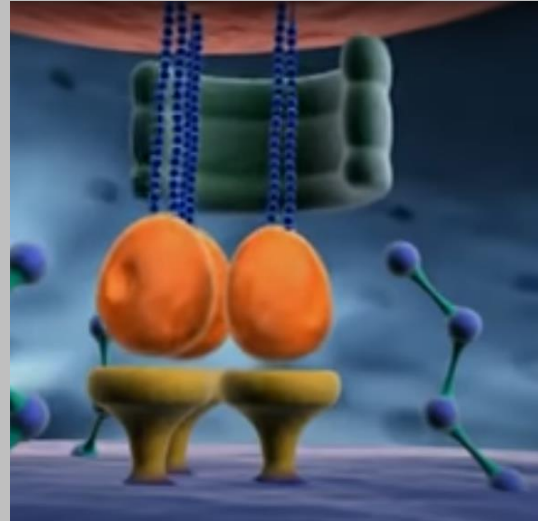


Čili jak zabranit množení virů v těle: počítat si na něj můžeme na několika místech

1) NA VNĚJŠÍ MEMBRÁNĚ :

Blocking of VIRUS landing by
FUSION INHIBITORS

analogie měsíční modul



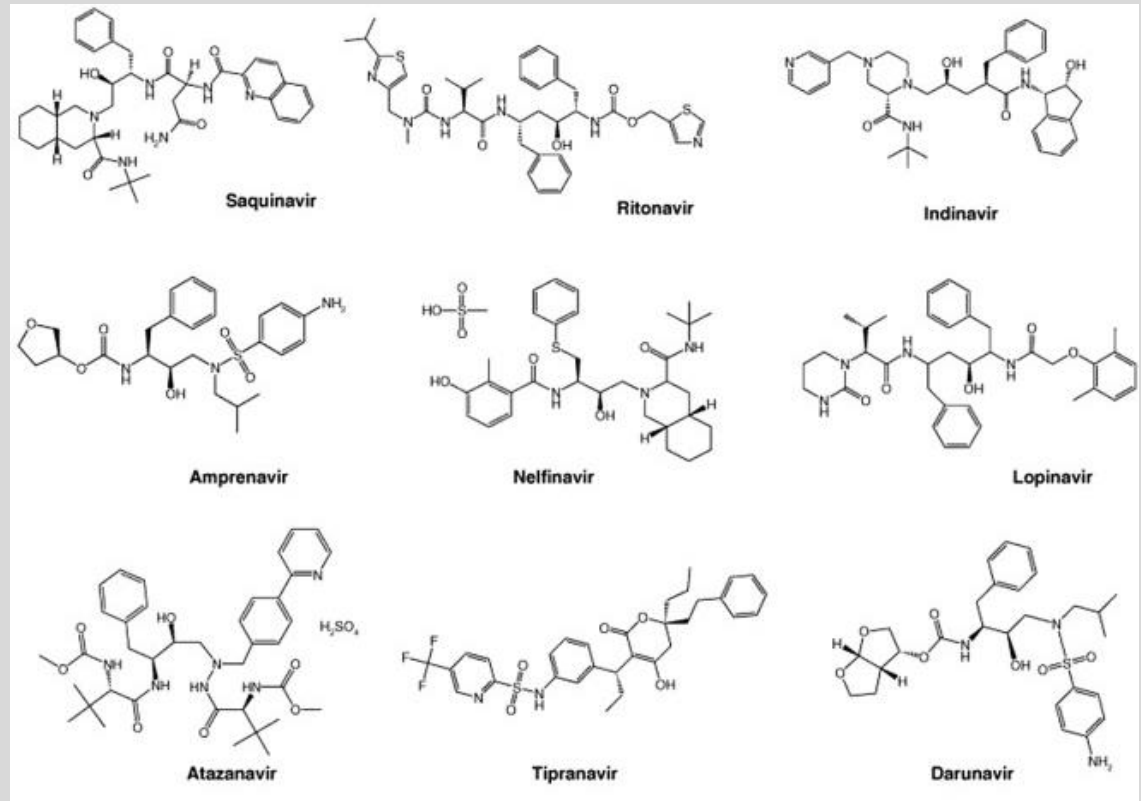
2) V CYTOSOLU V BUŇCE

- **Nucloside inhibitors**
- **NON-nulceoside inhibitors**



3) ZASTAVIT VÝROBU JEHO KAPSIDU uvnitř buňky: Protease inhibitors (against HIV protease is responsible for processing of the gag and gag-pol polyproteins during virion maturation. The activity of this enzyme is essential for capsid finalisation and escape of virion from cell)

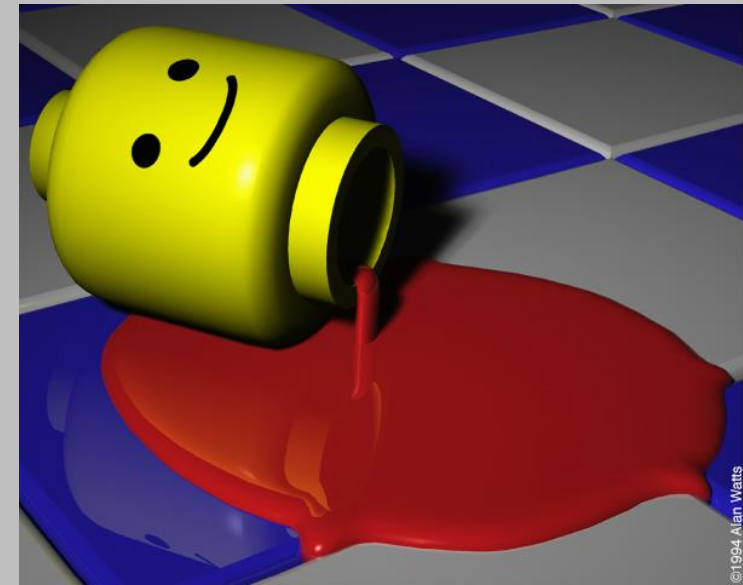
Některé moderní molekuly co „zašpuntují“ konkrétní proteazu :



4) ELIMINOVAT patogen (hlavně bakterie) nějakým „lepidlem“ už když je v krvi (makrofágy, IgM a IgG protilátky)



5) Nebo ELIMINOVAT celou buňku ve které se množí (lymfocyty a NK imunitní buňky zařídí zabití buňky Bezpečnou a recyklaci)

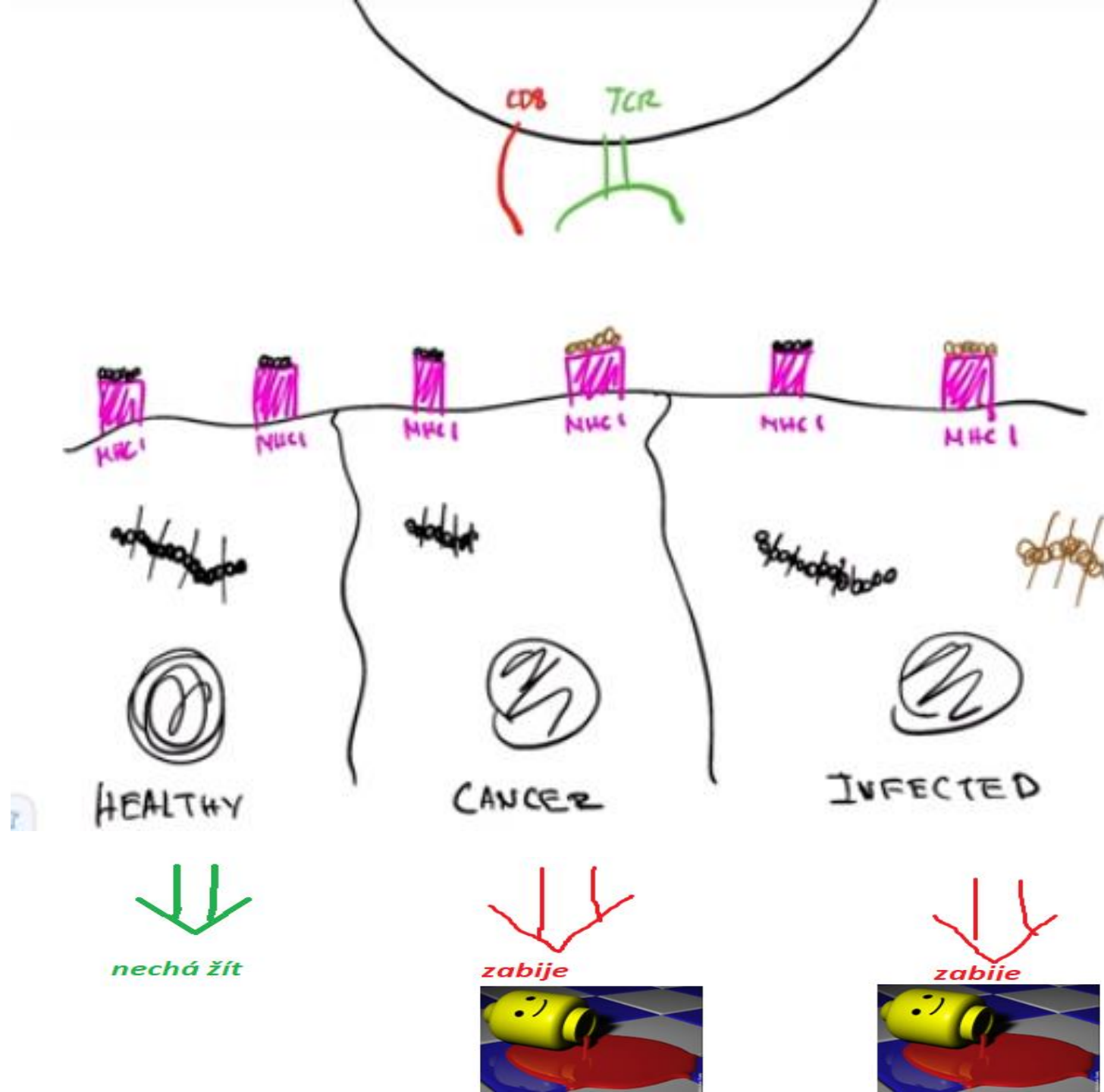


...ale jak tuto celou buňku s množícím se virem tělo pozná a eliminuje????

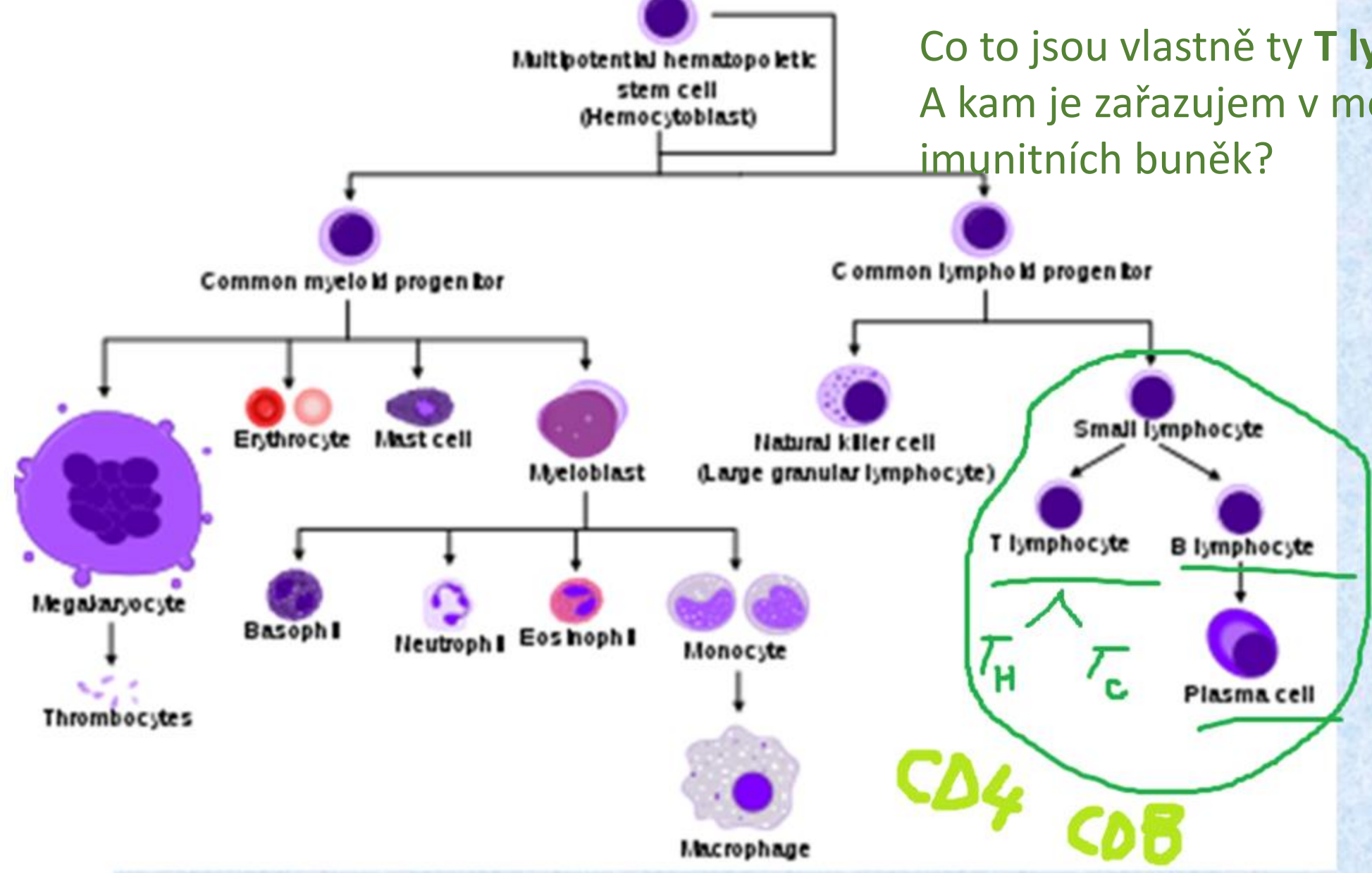
CD8 T lymfocyt to umí ,
Skenuje „co prezentují buňky na
povrchu ve výklní skříní“

všimni si na klíčového signálu
prezentovaného na **MHCI** ligandu
a kooperaci CD8 a TCR
makromolekuly

Pokud „uvidí“ nepřírozený protein
(virový, bakteriální, nádorový) hend
spustí eliminaci této buňky aby
nemohla být zárodkem patologie.



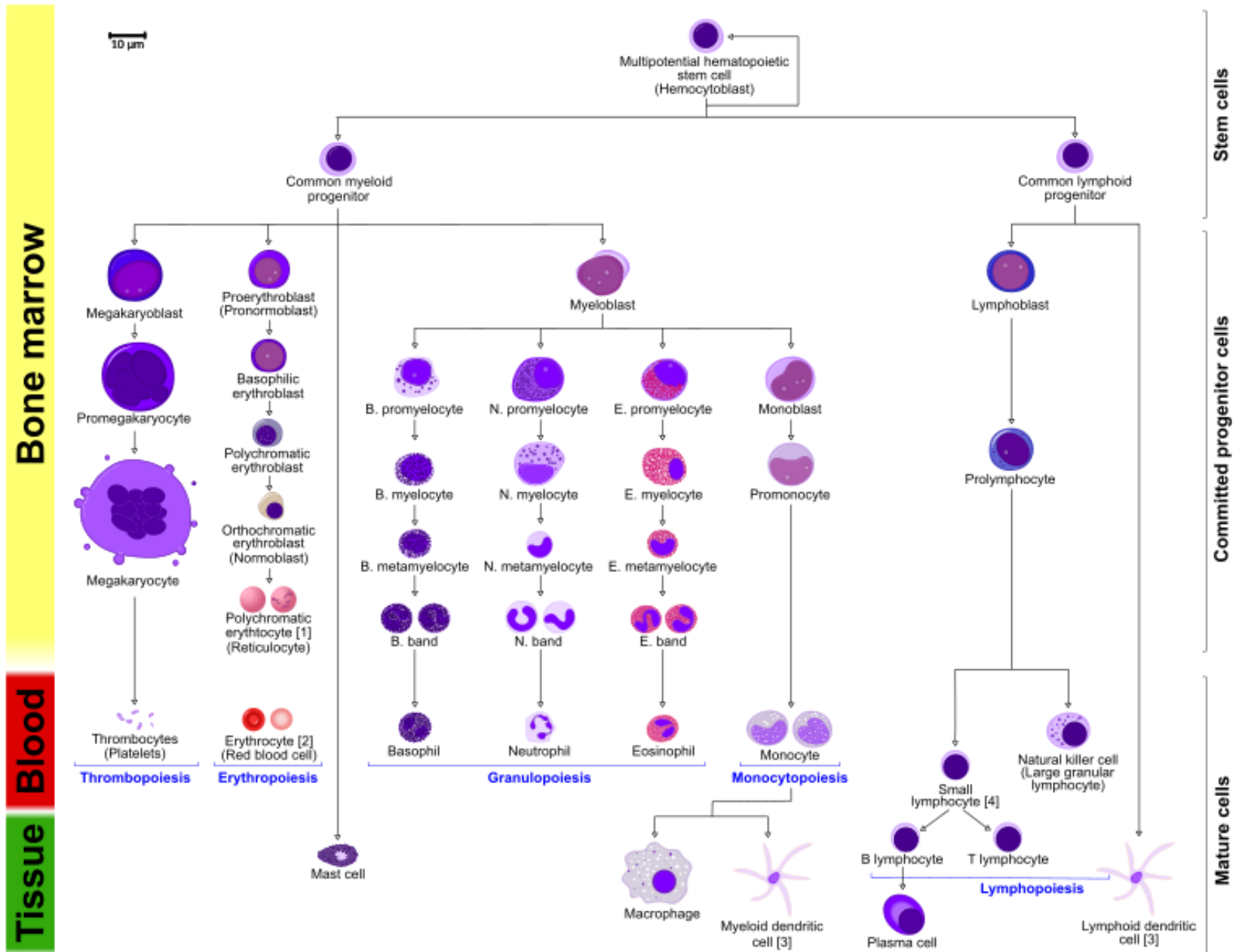
Co to jsou vlastně ty T lymfocyty?
A kam je zařazujeme v mozaice imunitních buněk?

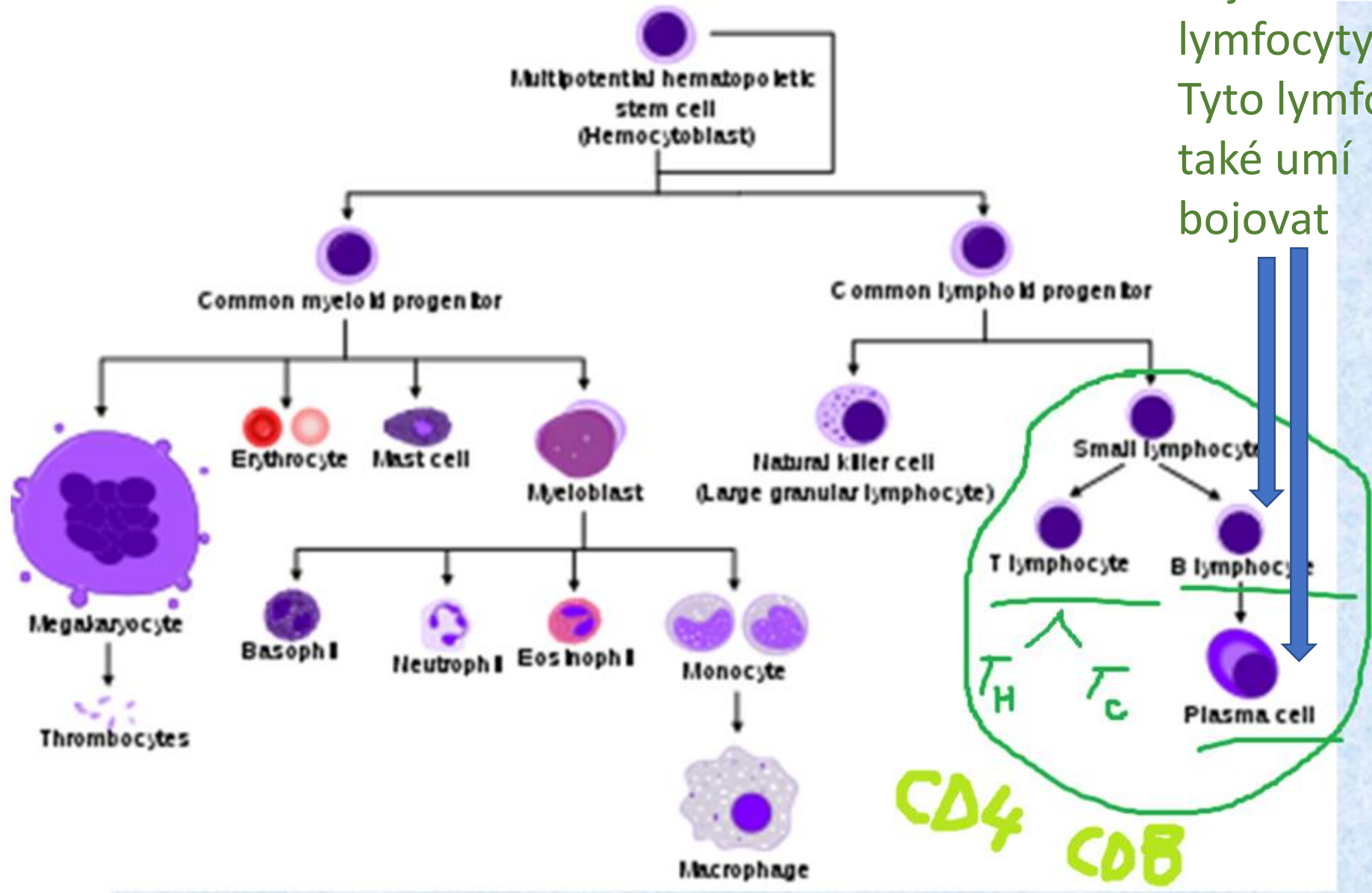


Máme dva typy T lymfocytů. Více o CD4 a CD8 molekulách v následující kapitole **FLOW-CYTOMETRIE**

Drobné
opakování
kaskády
geneze
imunitních
buněk

A výsledných
typů buněk
(některé
hlídkují volně
v krevní
řečišti, jiné v
tkáni)

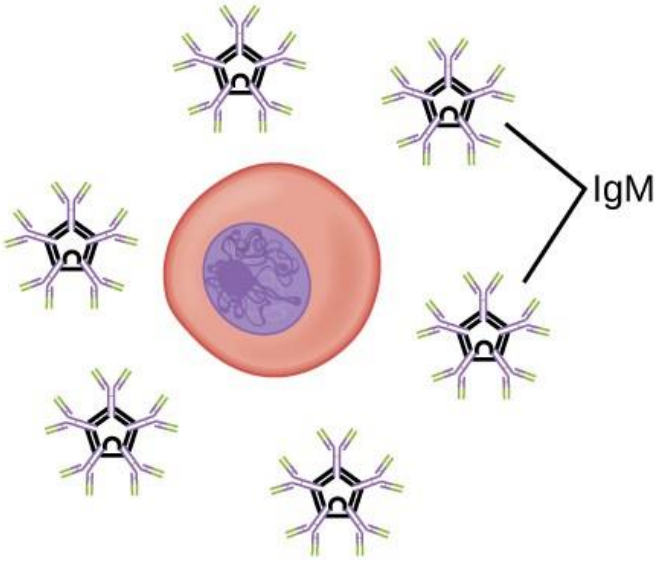
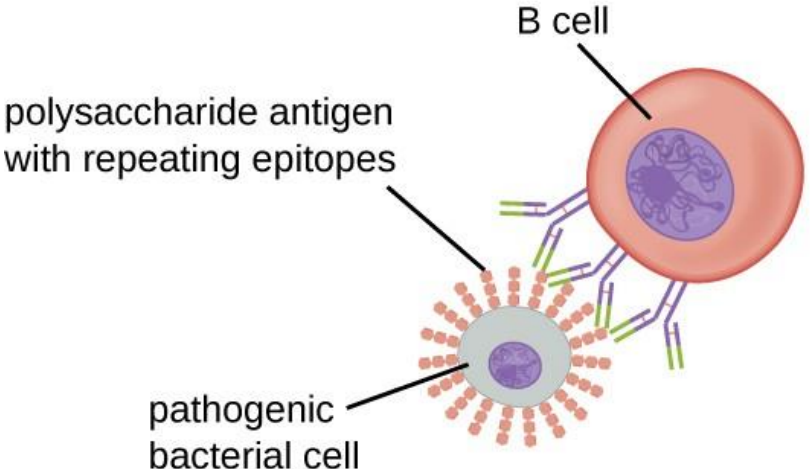




Máme ale nejen T lymfocyty. Tyto lymfocyty také umí bojovat

Uvolňováním IgM obalují patogeny a případně i celé buňky a sgtartují tak jejich eliminaci.

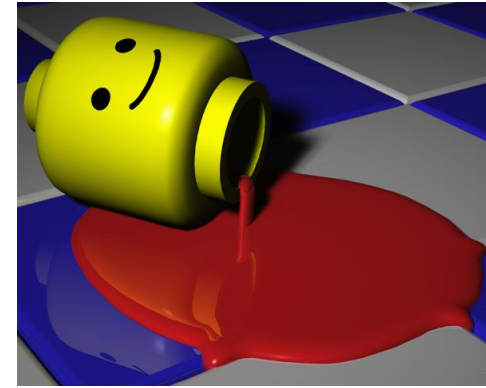
**T cell-independent
B cell activation**



activation of B cell and secretion of pentameric IgM



Úkol splněn - dostali jsme je
živé nebo mrtvé



Poznámka bokem:

„DO NOT EAT ME“ („nejez mne“) signalní molekula na povrchu buněk (chrání před atakem imunitních buněk)

CD47 and CD200

Poznámka bokem 2: Lymfocyty – někdy fungují a zabíjí tělu vlastní věci lépe než chceme

Antigen		
	Co-stimulation	No Co-stimulation
Infectious agent	Protective immunity	Recurrent infection
Innocuous substance	Allergy	No Allergy
Grafted organ	Rejection	Acceptance
Self organ	Autoimmunity	Self tolerance
Tumor	Tumor immunity	Cancer

Figure 1.32 Janeway's Immunobiology, Bed. (© Garland Science 2012)

Téma2

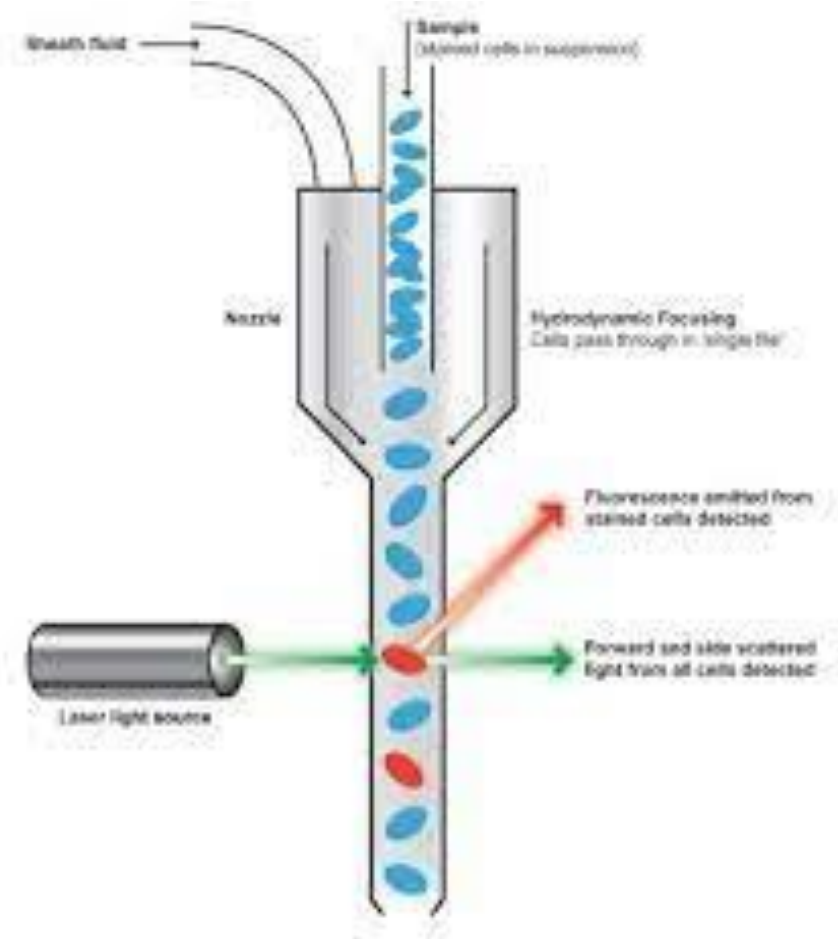
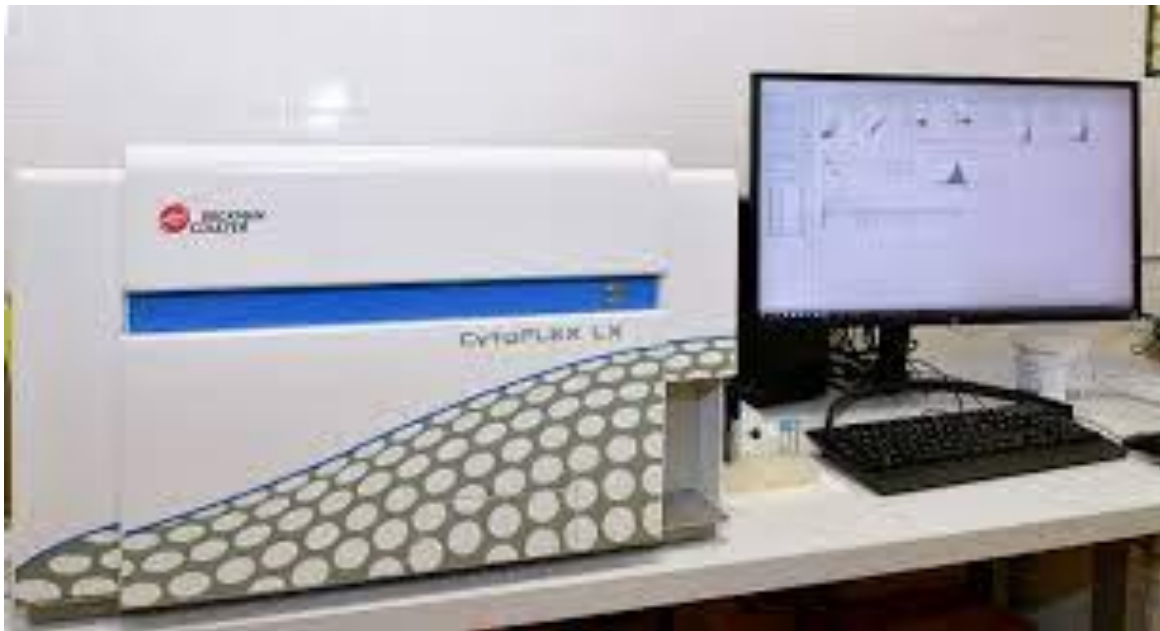
FLOW CYTOMETRY

(česky průtoková cytometrie)

(...aneb metoda kde nemusí laborantky hodiny složitě počítat pod mikroskopem, ale místo toho počítač jen obrovskou rychlostí analyzuje, jaké typy buněk s jakými molekulami tečou kolem)



Typická průtokový cytometr a schema trysky



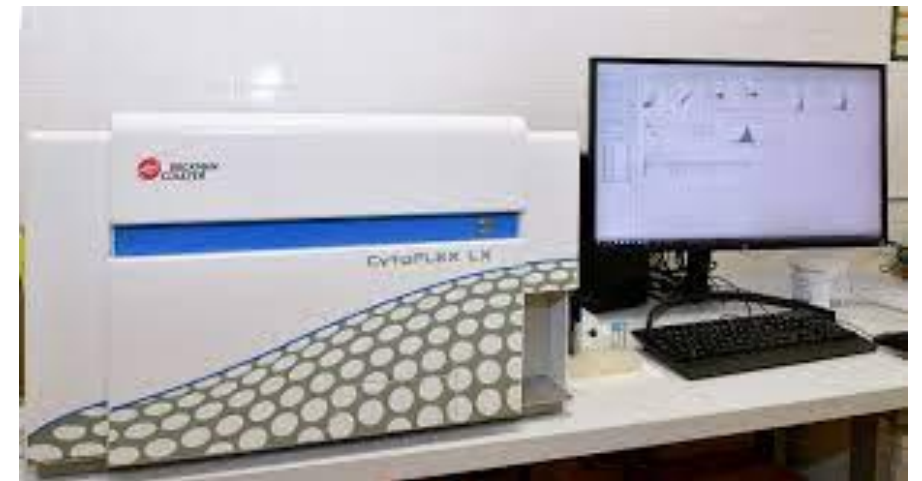
Mikroskopie je krásná, ale není možné každý kousek pacientova těla pomalu prohlížet pod mikroskopem a dělat statistiku například kolik lymfocytů je tam nachystáno nebo jaké a kolik již je v aktivním imunitním stavu.

Flow Cytometry (česky průtoková cytometrie) je technika na rychlé naskenování a vyhodnocení velkého souboru buněk.

Například odběr 5 ml krve, nebo biopsie z mízních uzlin. Vyšetření a statistika je hotova v rámci minut ! U mnoha onemocnění jde totiž o čas. U mnoha zase musíme sledovat každý den opakovaně (např akutní leukemické stavy)

Buňky jsou po té promíchány a naředěny v nosném roztoku (podobné pH jako fyziologický roztok) a pak hnány speciální

tryskou přes laser a detektor – vše extrémě jemná mechanika řízená počítačem.



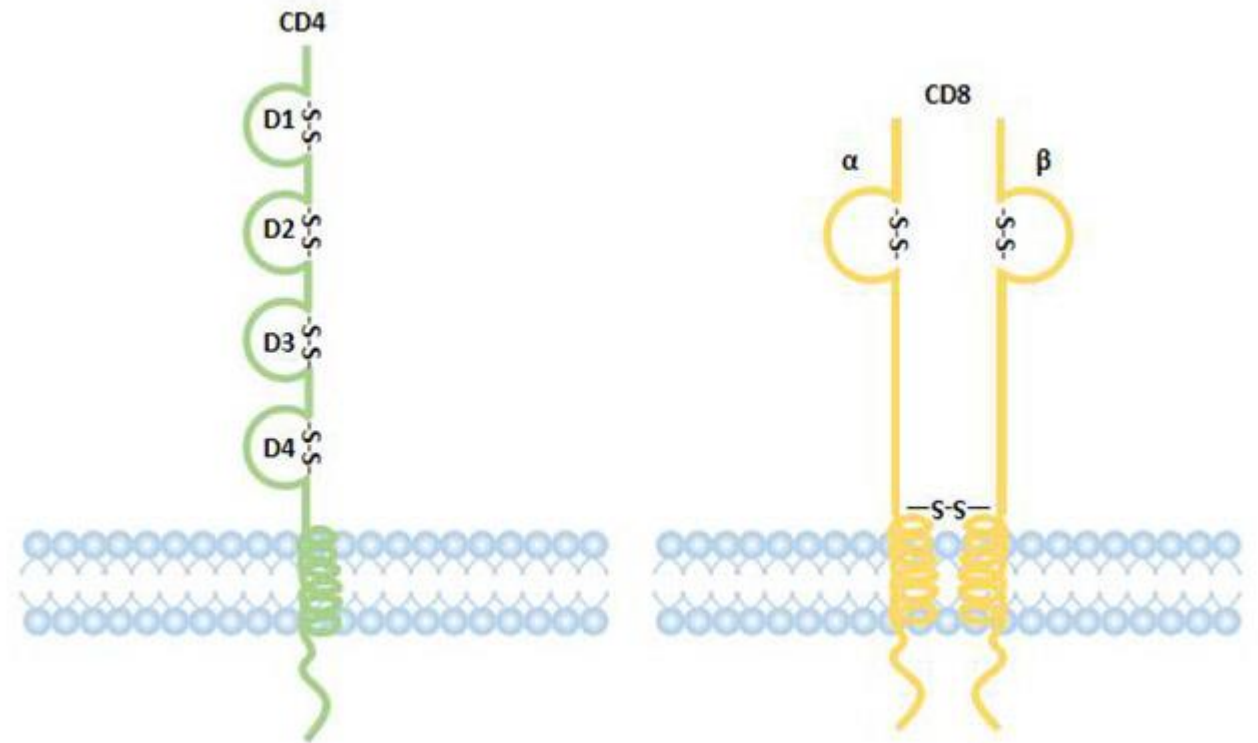
Zopakovali jsme si před chvílí, že například dva různé typy T-lymfocytů mají tyto dva různé markery (povrchové molekuly) na svém povrchu

CD4

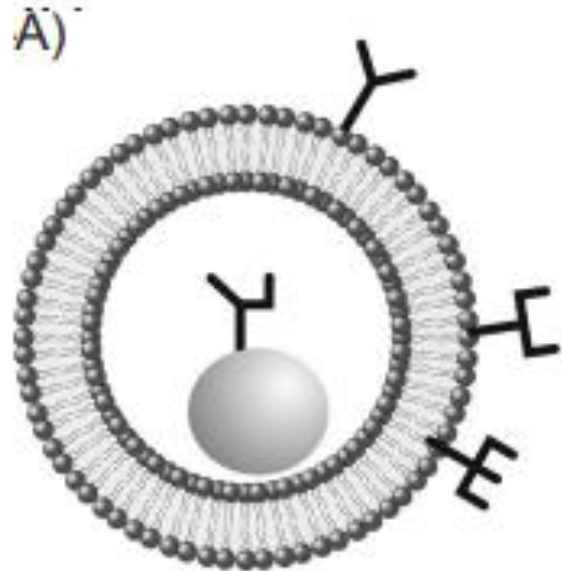
CD4 is a T helper cell marker, which is a single chain transmembrane protein.

CD8

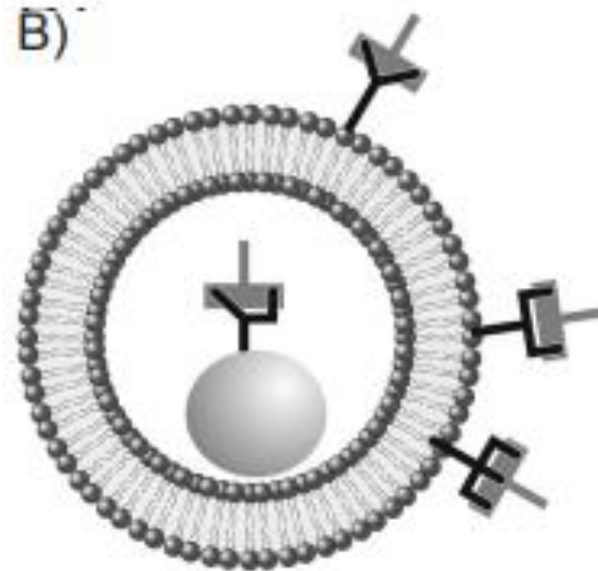
CD8 is a cytotoxic T cell marker, a heterodimer formed by the linkage of α and β chains by disulfide bonds, and the extracellular structure is an IgSF member. The cytoplasmic region of CD8 molecule can be combined with p56lck kinase to participate in signal transduction.



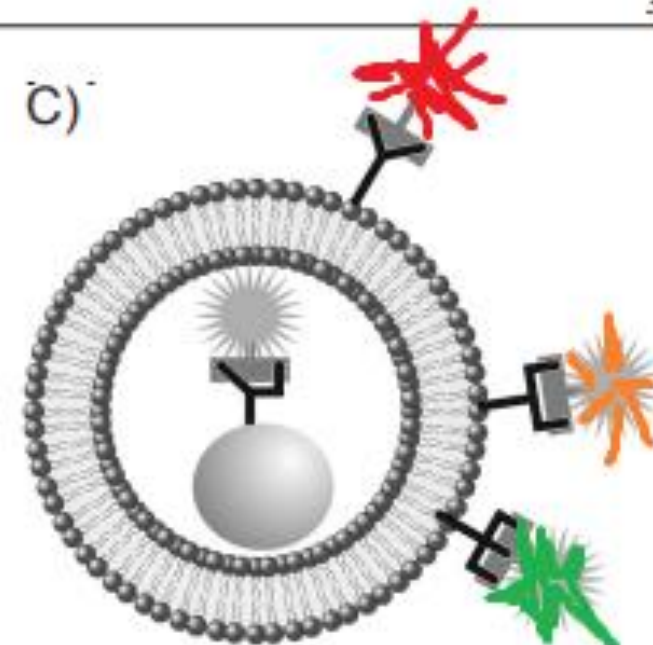
Povrchový znak CD8 nebo CD 4 lze dobře využít k „nabarvení“ a identifikaci buňky (na určitý typ povrchvé molekuly navážeme specificky určitý typ fluorescenčního barviva, např CD4 červené, CD8 zelené)



Povrchá mol.

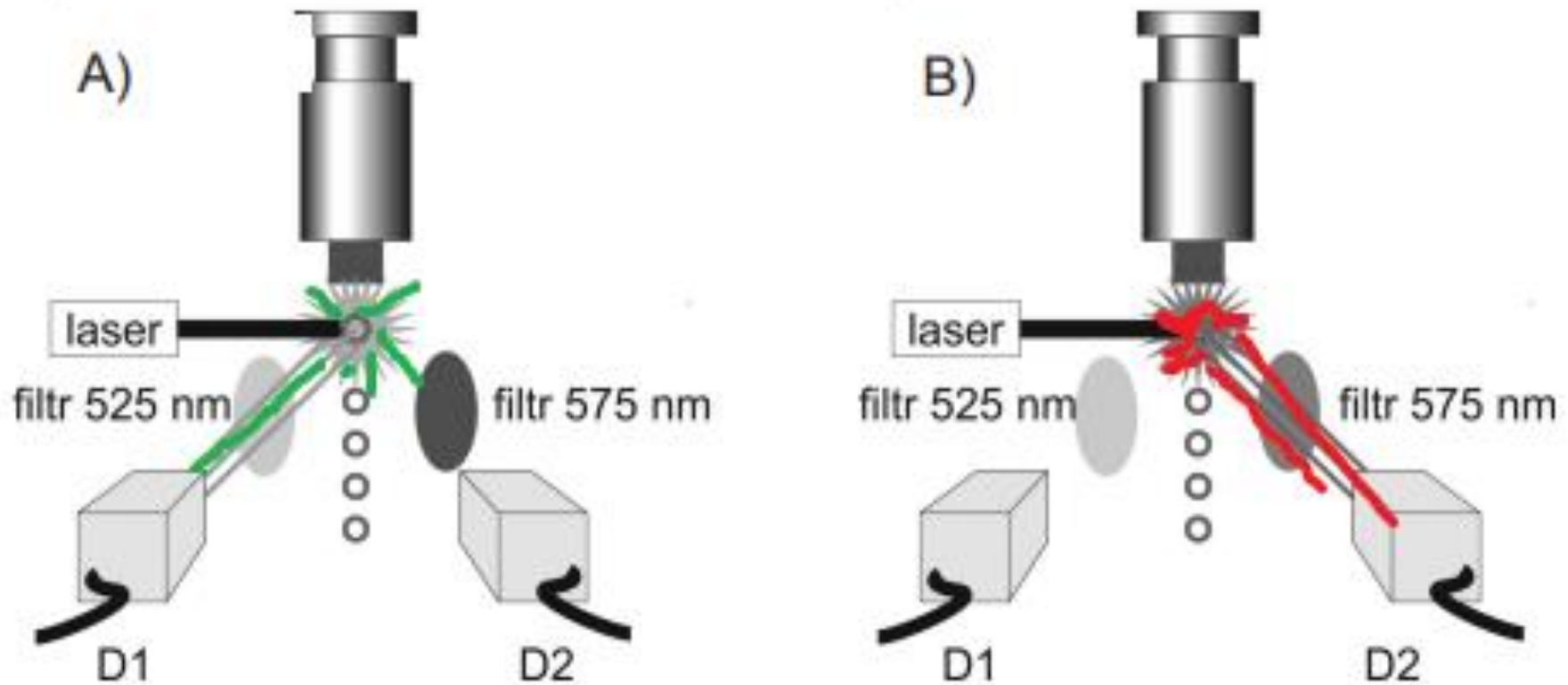


Protilátka



Protilátka+Fluo

Buňky s nabarveným znakem CD8 (zelená značka – fluoreskující zeleně) nebo CD4 (červená) pak nalejeme do průtokového cytometru. A počítač už rychle počítá kolik teče CD8 pozitivních, kolik CD4 pozitivních a kolik ostatních (nesvítících; ... třeba erytrocyty, krevní destičky a další) :

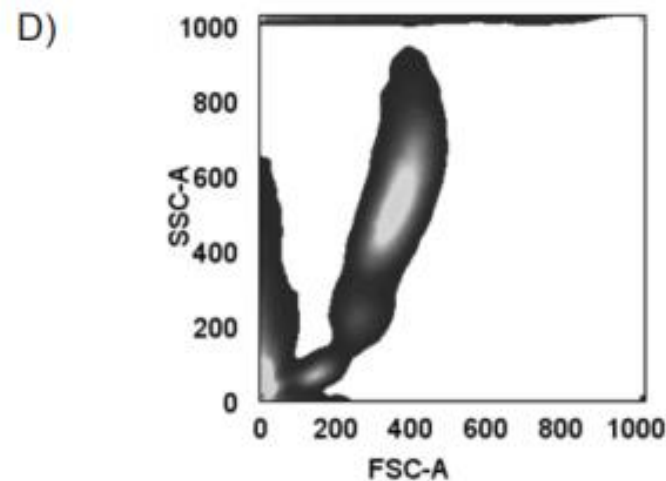
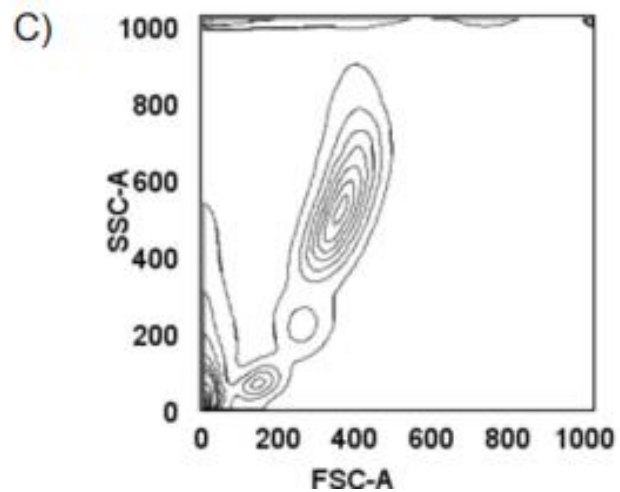
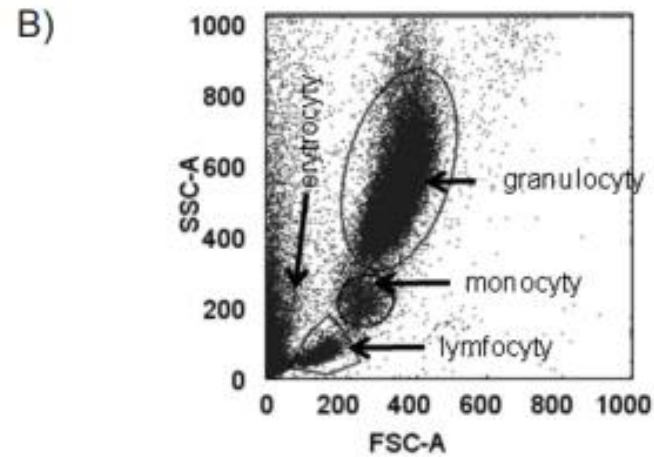
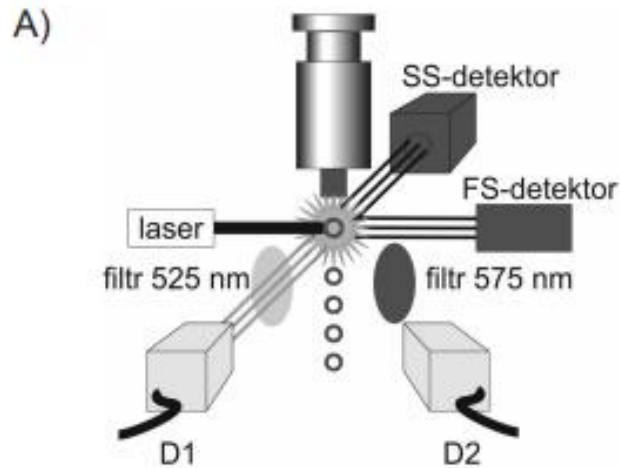


Obr. 3.14.2. Základní princip fluorescenčního modu průtokového cytometru – suspenze buněk je protlačována velmi ma-

Moderní multiparametrické cytometry

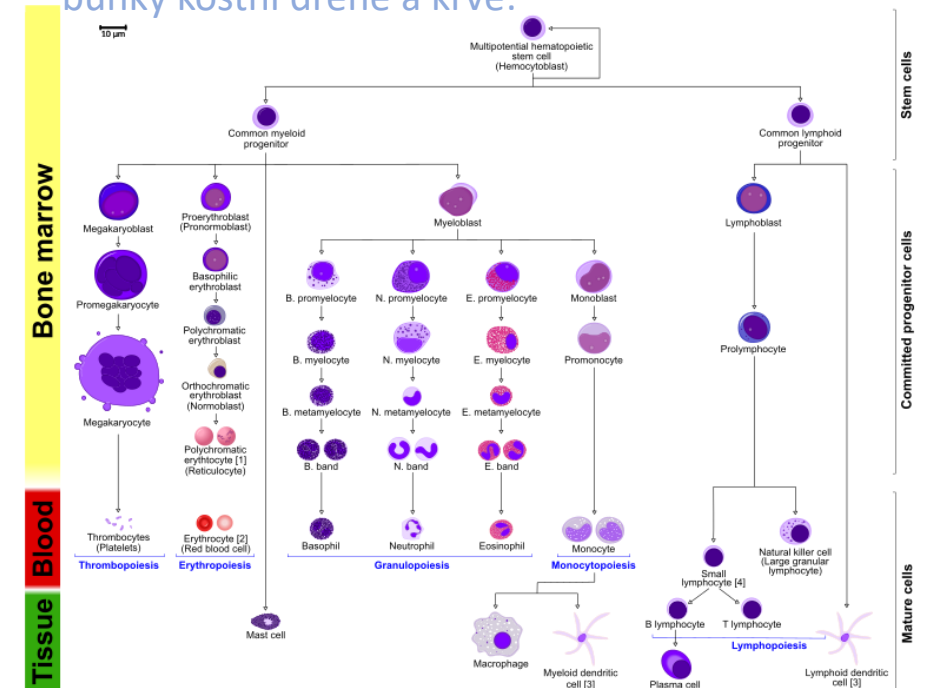
-měří nejen povrchové CD znaky, ale i velikost a vnitřní strukturu (pomocí rozptylu světla)

Graficky se pak počet vyznačuj do grafů (co buňka to tečka)

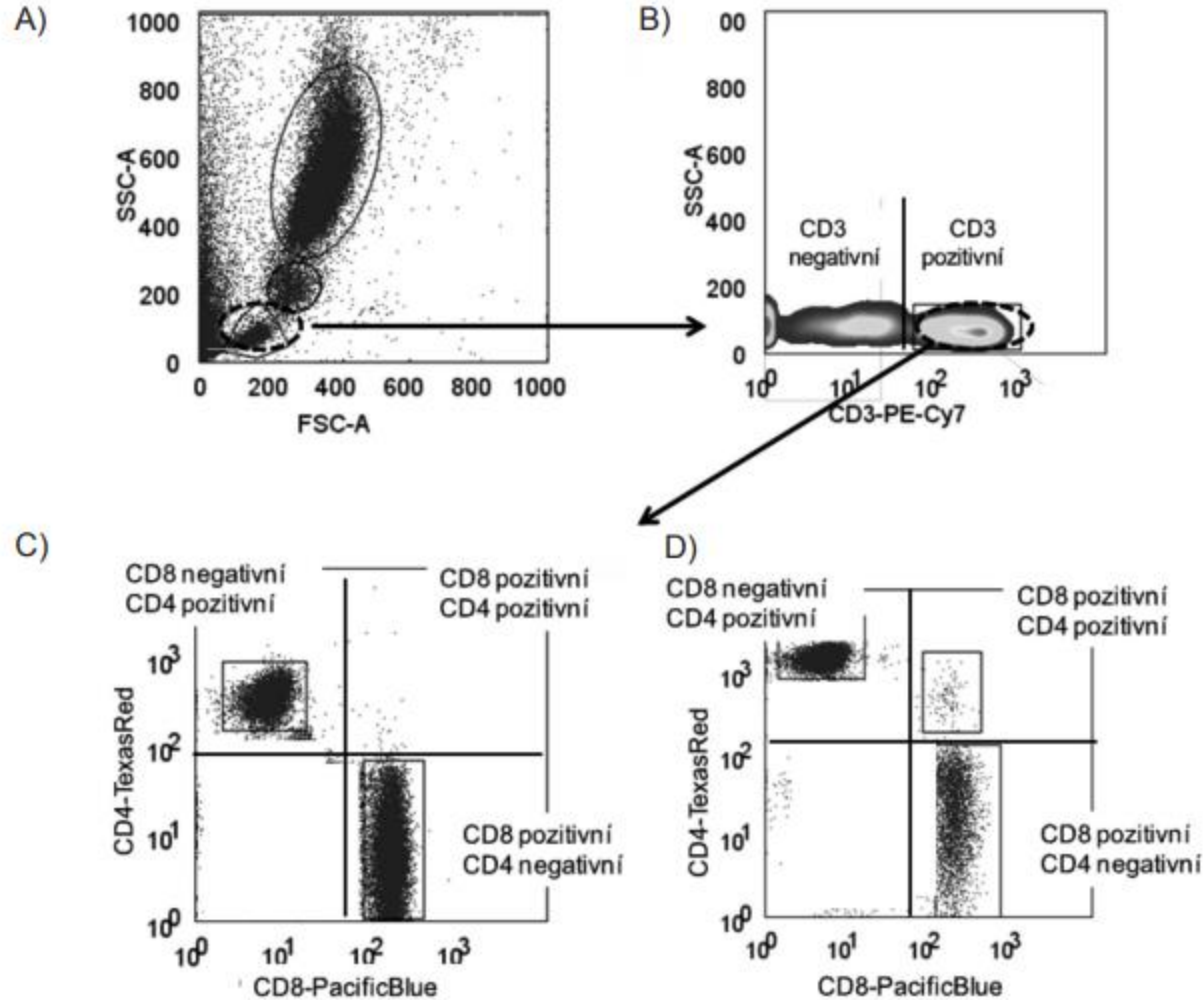


Ve zkumavce pak rozlišíme
kolik granulocytů
kolik je monocytů
kolik lymfocytů atd

...měříme zastoupení pro všechny tyto
buňky kostní dřeně a krve:



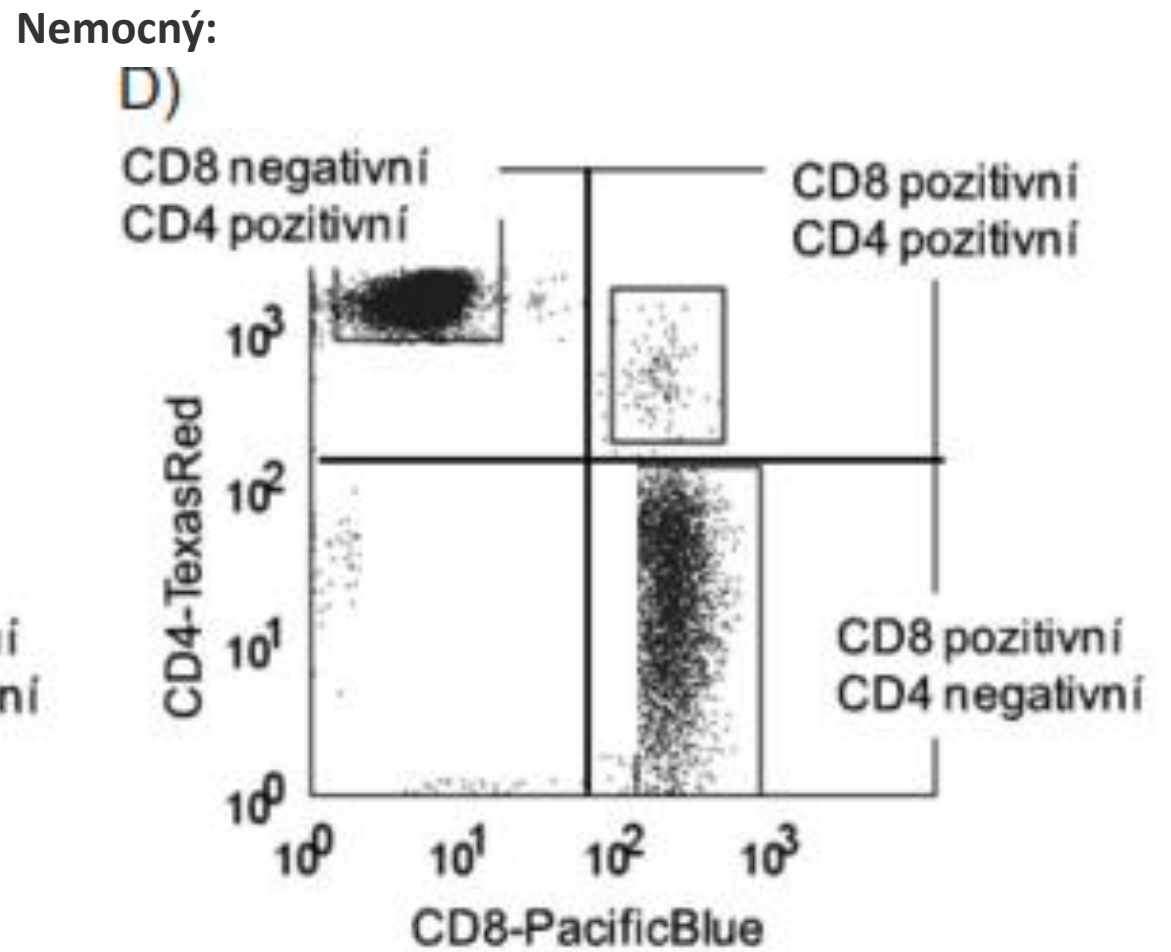
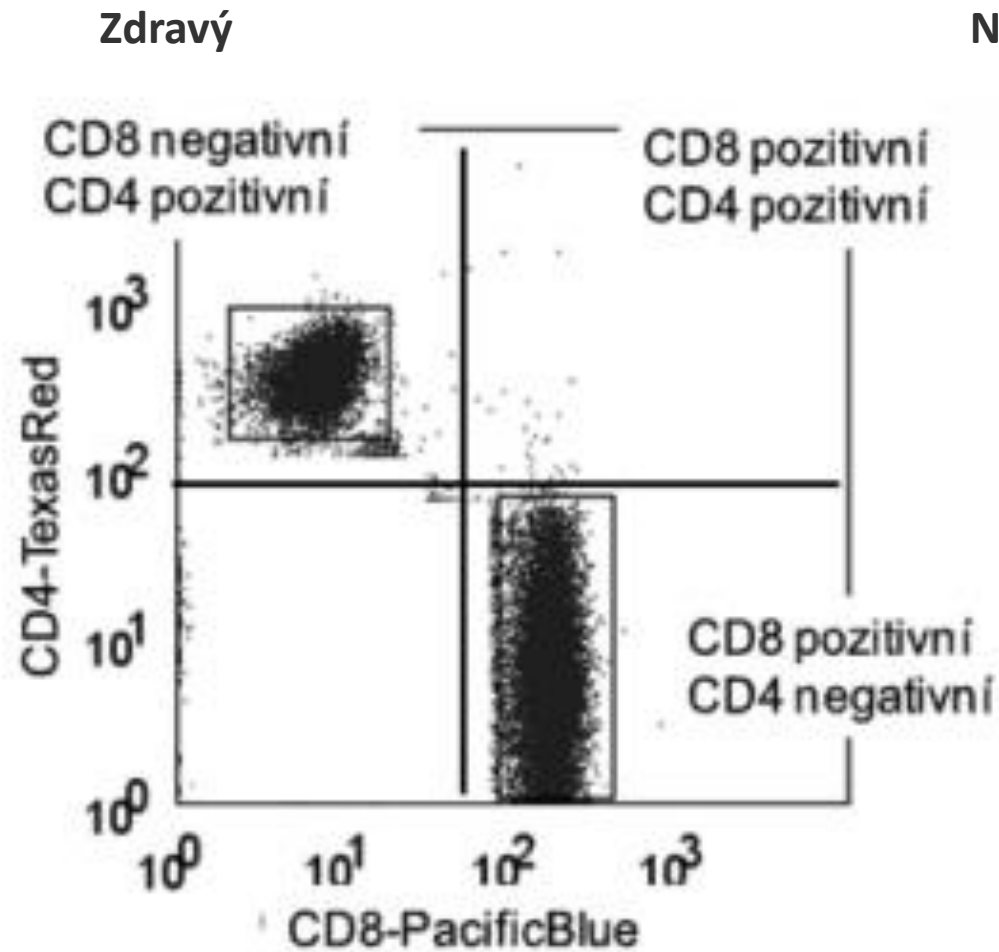
Tak může vypadat výsledek vyšetření pacientovy krve:



Software umožňuje postupně zoomovat na podmnožiny a zobrazovat různé detailní statistiky pro různé subpopulace buněk

Obr. 3.14.5. Postupná analýza vzorku od globálního scatter-plotu k detailní analýze subpopulace T-lymfocytů. **A)** Rozdělení leukocytů na základě velikosti a granularity buněk. **B)** Zagatování T-lymfocytů na základě CD3 znaku. **C)** rozlišení CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, fyziologicky standardní situace. **D)** CD4+ a CD8+ „double pozitivní“ T-lymfocyty u pacienta s počínající lymfoblastickou leukémií (důsledek narušeného vývoje T-lymfocytů).

Najdete rozdíl zdravého a leukemického pacienta ??????????????????????

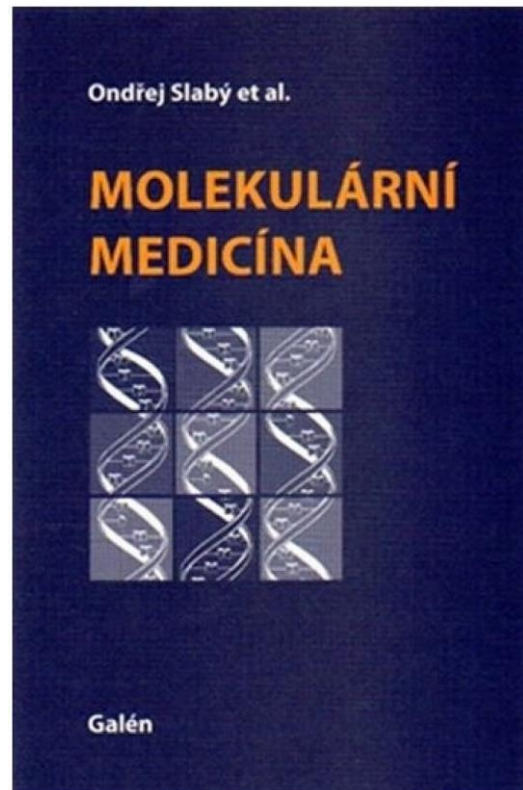


Pacient má v diagramu množinu s atypickými blasty. Při malých počtech toto laborantky na mikroskopu často ani nerozliší a neodhlaila by se tato patologie v časném stadiu.

(cytometry se klinicky začli používat od 90. let – proto obrovský pokrok v diagnostice - hlavně leukemií a HIV)

Pro zvědavé i pro budoucí praxi:

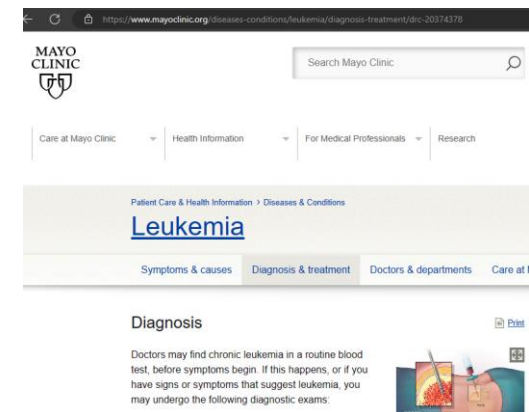
Průtokovou cytometrii i sadu jiných moderních klinických laboratorních metod lze najít celkem srozumitelně v češtině ve výukové publikaci brněnských autorů...



Některé leukemie se řeší jen farmakologicky, některé vyžadují vybití a transplantaci hematopoietických buněk. Celkem srozumitelné odkazy na diagnostiku leukemií a program vyhledávání dárců kostní křeně:



[Český národní registr dárců dřeně | Kostnidren.cz](https://www.kostnidren.cz)

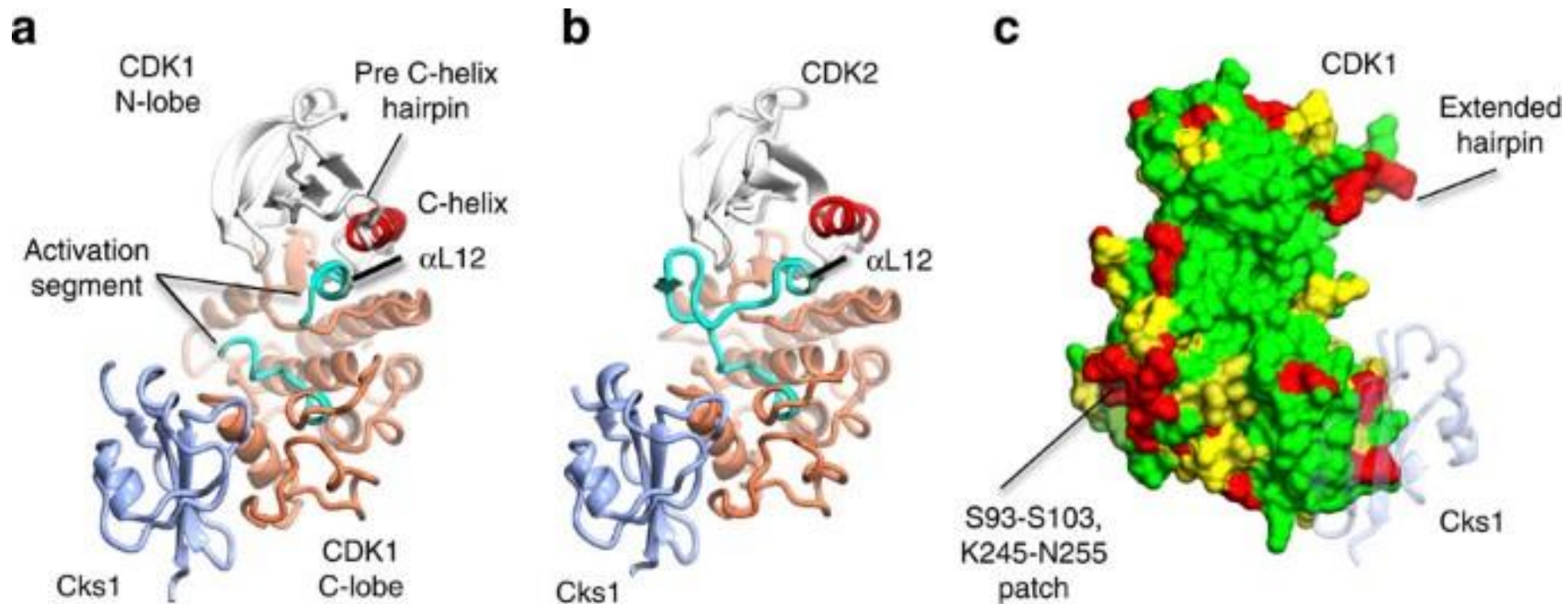


[Leukemia - Symptoms and causes - Mayo Clinic](https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/leukemia/diagnosis-treatment/dic-2074378)

Téma 3

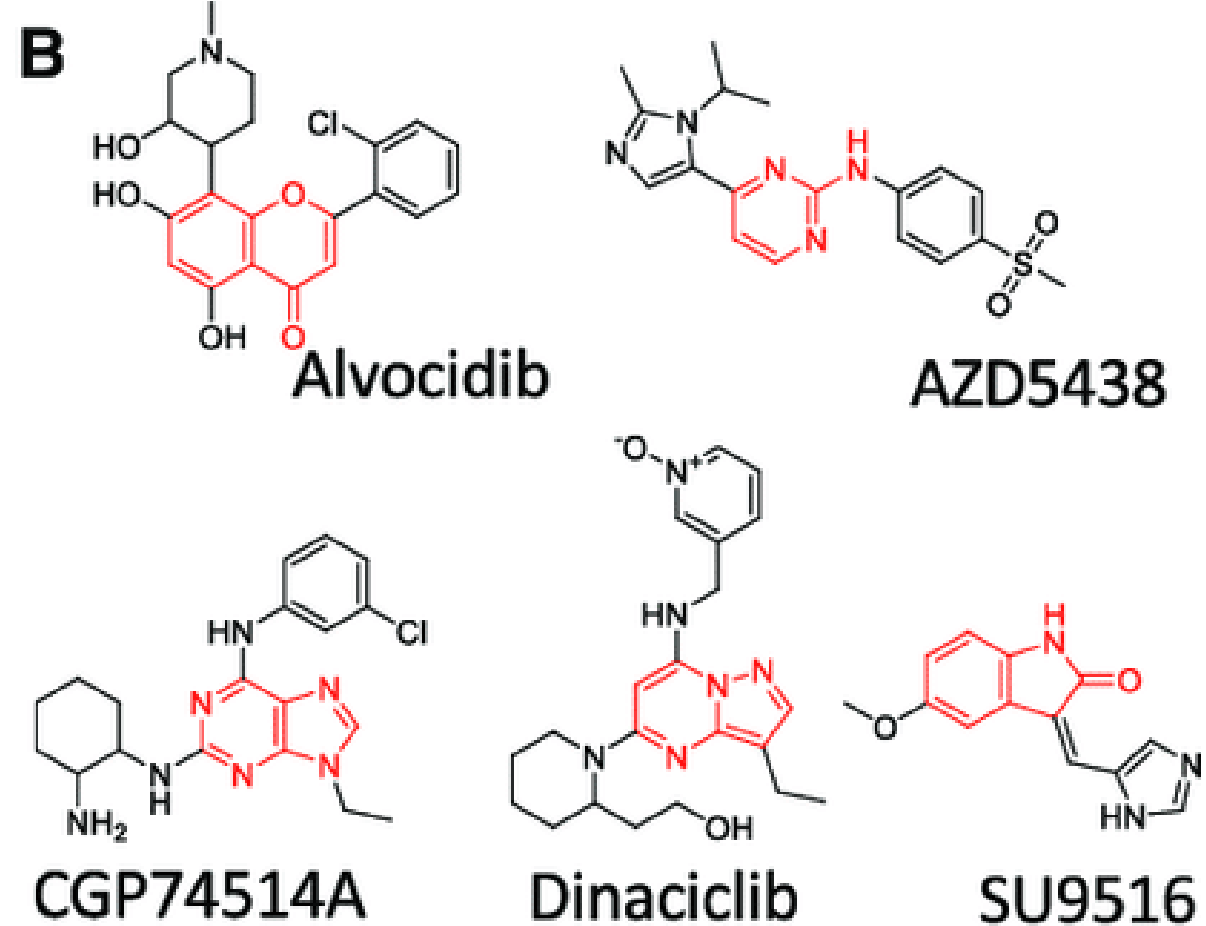
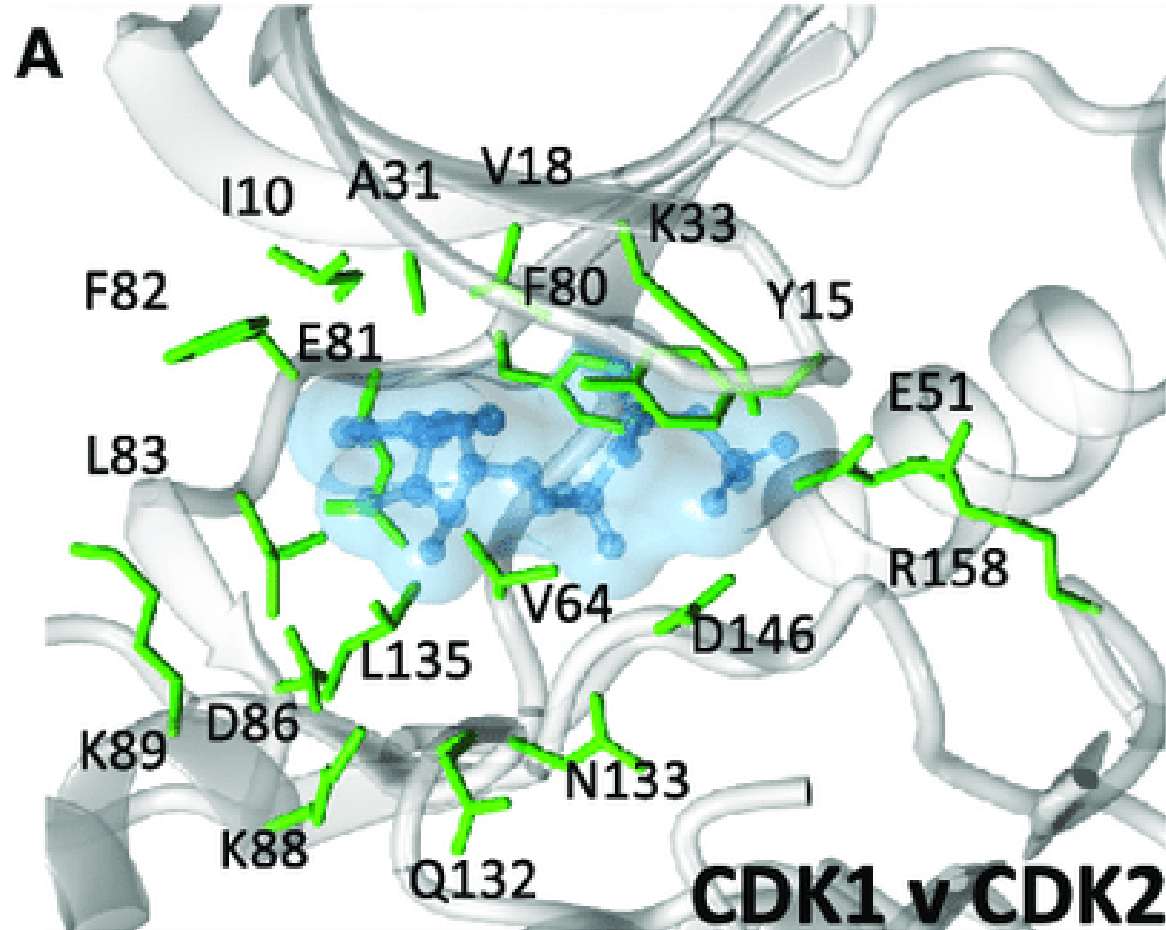
IN SILICO návrhy léčiv

Nejdříve je potřeba do počítače nahrát 3D strukturu atomů tvořících enzym:



A přesně zjistit kde je tzv. AKTIVNÍ MÍSTO enzymu

Pak pomoci počítače zkusíme hledání (tzv. dokování) specifických inhibitorů do modelu enzymu.

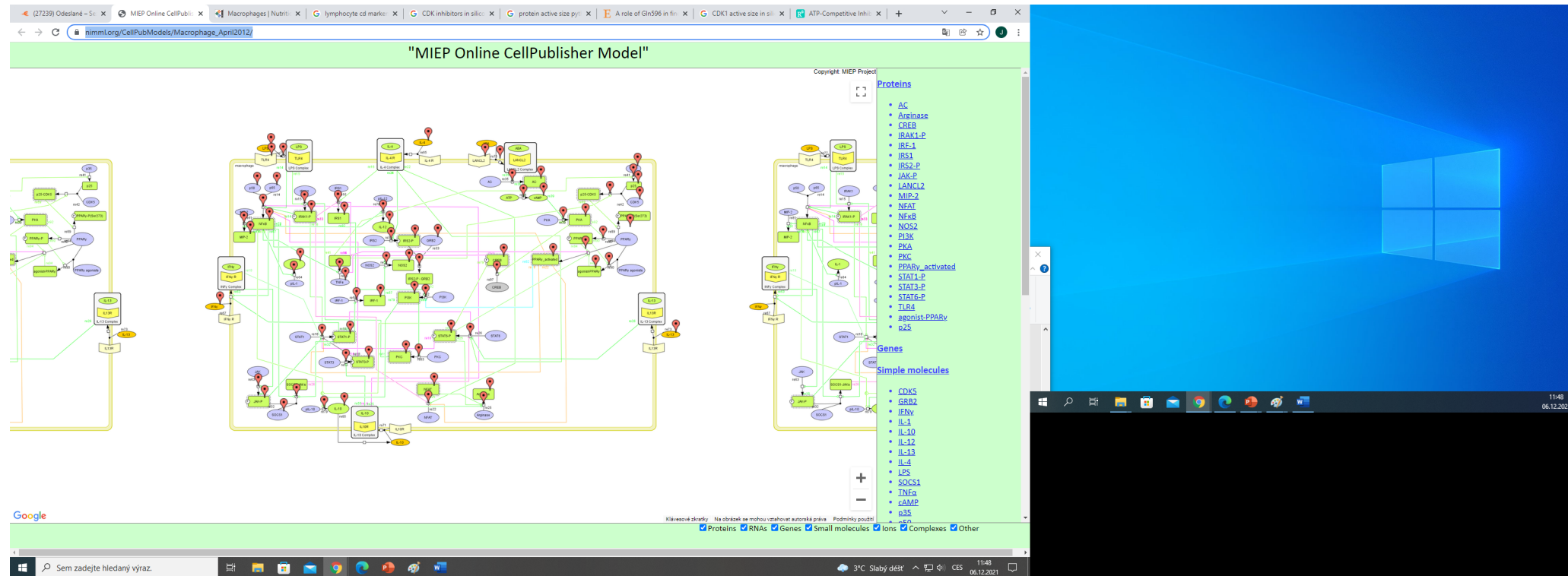


- Ten který „sedne“ nejlépe a „zašpuntuje“ aktivní místo natrvalo je ideální pro použití a testování na zvířatech a pak na klinické studii.
- Není to samozřejmě lehký proces. Neboť řada perfektní „špuntů“ se ukáže jako nebezpečných pro řadu jiných životně důležitých enzymů, třeba zastavuje nebo zpomaluje enzymy P450 v játrech a to je průšvih a proto musíme testovat a hledat jiné makromolekuly pro zašpuntování.
- „zašpuntování“ aktivního místa enzymu je jen jeden z typů IN SILICO simulací. Farmakologické látky hledáme samozřejmě pro celou škálu jiných interakcí – např afinitu k receptoru, afinitu k DNA (cytostatika), perforační molekuly, adherentní molekuly na povrchy buněk atd
- Co je navrženo IN SILICO, se následně nejdříve musí otestovat IN VITRO (na nějaké vzorové živé buněčné kultuře) a pak IN VIVO (studie na zvířeti, pak studie na pacientech), až pak je léčivo registrováno pro použití v klinické praxi

Celý obor počítačového simulování se jmenuje IN SILICO PHARMACOLOGY

Více přehledově např na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1978274/>

IN SILICO modely se používají nejen na molekuly, ale začínají používat také na modelování sady interakcí imunitních buněk v konkrétním případě nemoci :
tzv. Kinetické Modely interakcí buněk



https://nimml.org/CellPubModels/Macrophage_April2012/

Téma 4

Aktualita:

Navázání RADIO-léčiva na
nádorové buňky prostaty



Téma 4

Aktualita: Navázání RADIO-léčiva na nádorové buňky prostaty

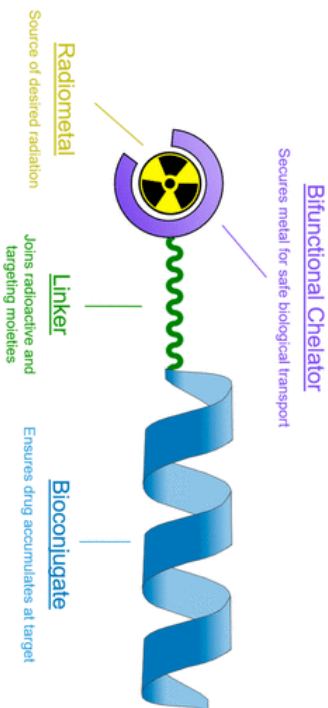
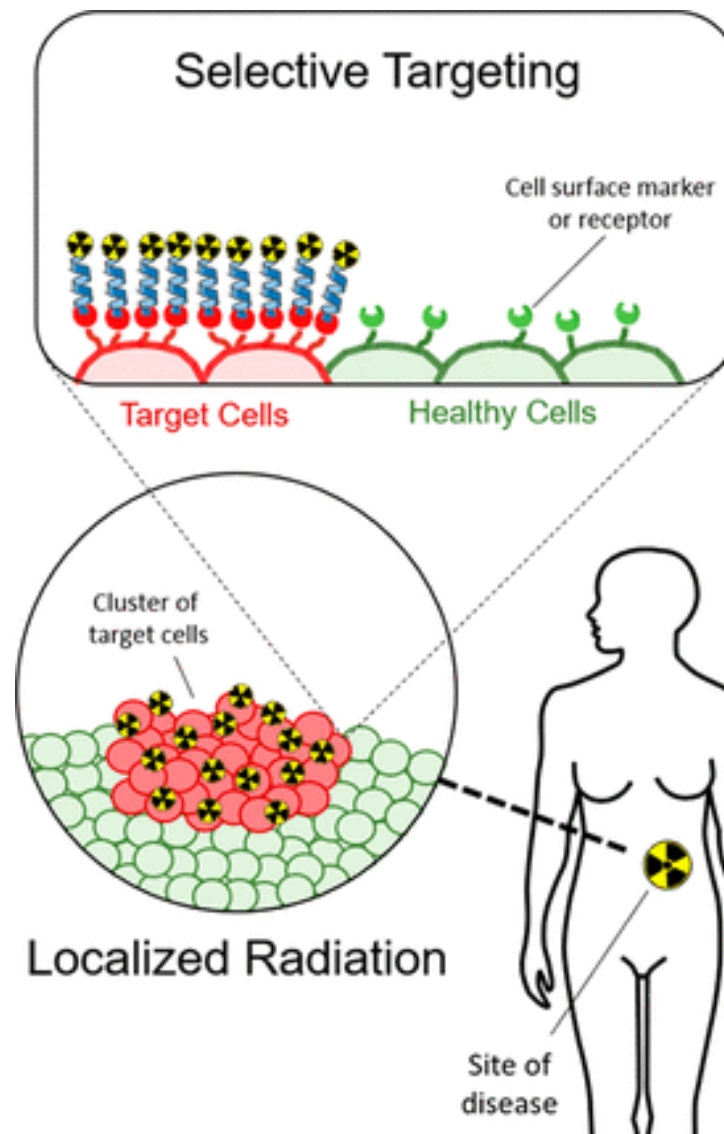
V posledním roce byly pro americké i evropské pacienty schválena tzv. radioligandová léčba nádorů prostaty – založená na **radiofarmakum PSMA-617**

Centrální molekulou tohoto léčiva je radioaktivní jádro kovu Luthenium, které vyzařuje nízkenergetické β^- záření.

Hlavním ukolem při vývoji léčiva bylo Luthenium dobře navázat na nosič a zajistit, aby nosič měl afinitu jen k nádorovým buňkám prostaty a „nechytal se“ na jiné zdravé buňky v těle. To se zajistilo pomocí specifické protilátky. Záření v nádorové buňce (v malém okolí od zářiče, čili neozářuje okolní zdravé) indukuje poškození DNA a přivádí tak buňku k apoptoze a eliminuje primární nádor i metastázy

Pokročilé počtení:

[Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy | Chemical Reviews \(acs.org\)](#)
[Zářící léčba karcinomu prostaty s českou stopou | proLékaře.cz \(prolekare.cz\)](#)



- Jeden z případů úspěšně léčených pacientů radiofarmakem (patrný ústup metastáz)

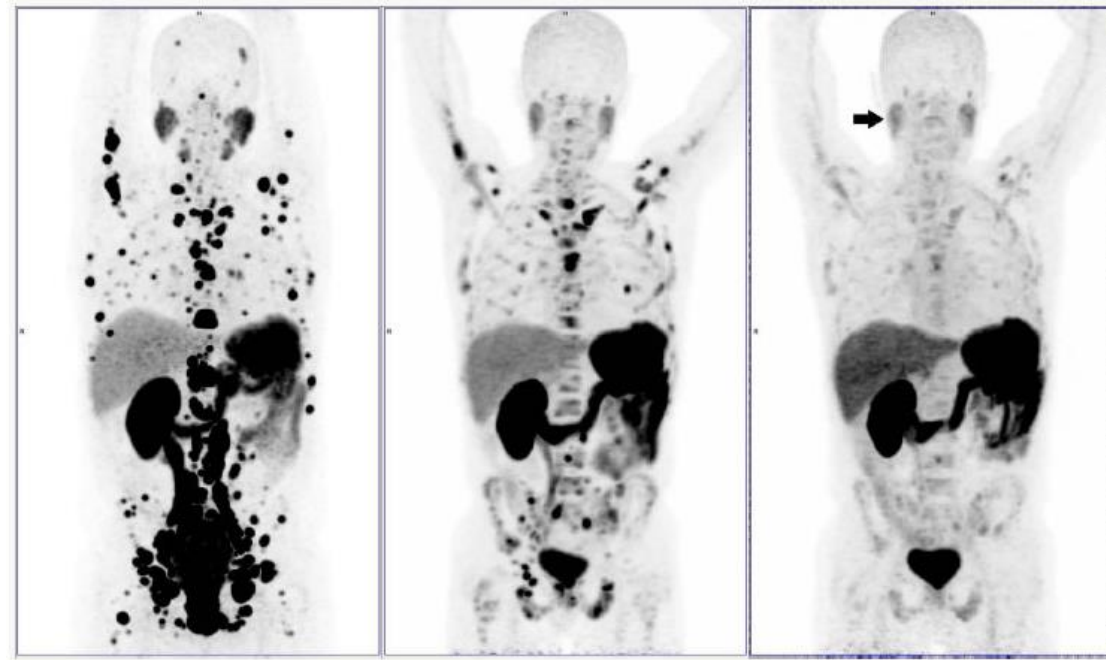


Figure 4. Comparative PET/CT Scan, before (left), after 3 doses (center) and at the end of treatment (right).