



Cvičení č. 1

Úvod Biologický materiál Protilátky

Mgr. Julie Štíchová
424773@mail.muni.cz

ÚKIA

Ústav Klinické Imunologie a Alergologie

Alergologie

Alergická onemocnění

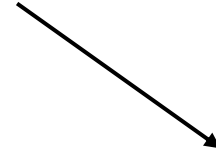
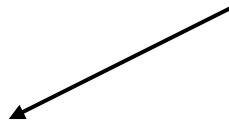
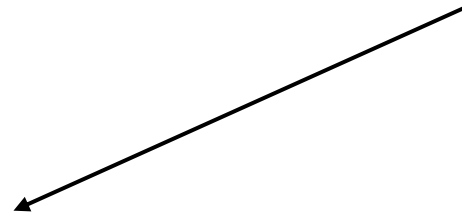
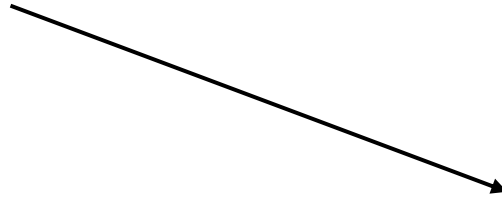
Imunologie

Autoimunity, imunodeficiency

Laboratoř

Buněčná část

Serologická část

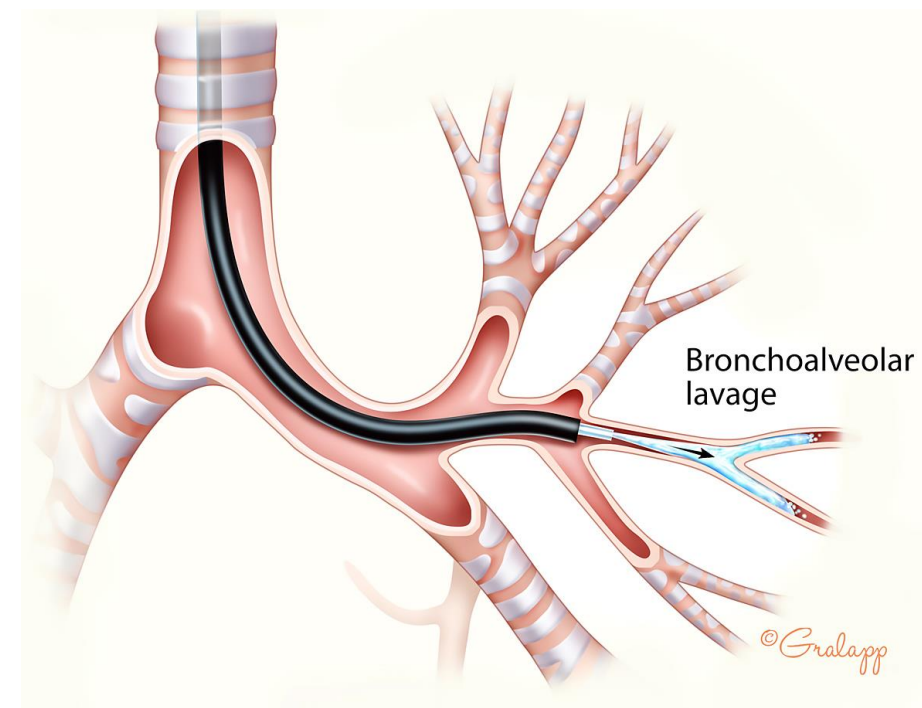


Laboratorní vyšetření

- **Fáze preanalytická**
 - Odběr biologického materiálu, transport
- **Fáze analytická**
 - Vlastní laboratorní vyšetření
- **Fáze postanalytická**
 - Skladování, likvidace

Biologický materiál

- **Žilní krev** – 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



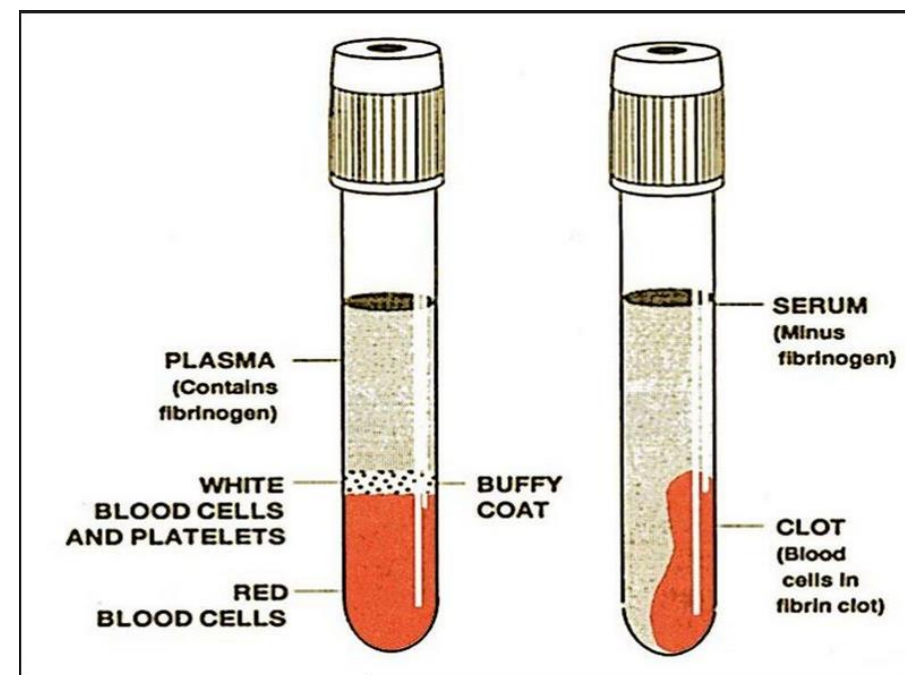
Sérum

- Ze **srážlivé** krve
- Zkumavky s gelem – akcelerace koagulace
- Sérum neobsahuje koagulační faktory a fibrinogen



Příjmová laboratoř - sanitáři

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



Biologický materiál

Buněčná laboratoř

EDTA



Vyšetření
lymfocytárních
subpopulací

HEPARIN



Funkční testy leukocytů

Serologická laboratoř

SERUM-GEL

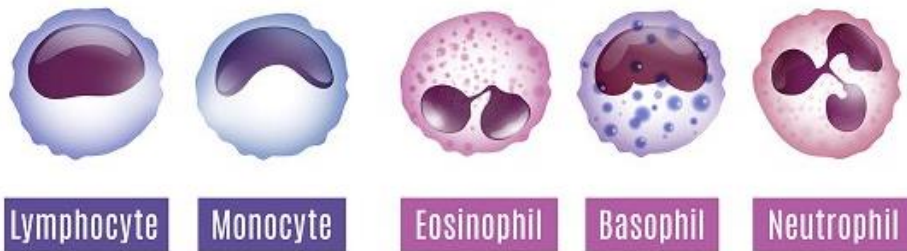


Stanovení analytů v
séru – proteiny a
protilátky

Rozdělení imunologických laboratorních metod

Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



- Absolutní a relativní počty
- Funkční vlastnosti

Serologická laboratoř

Stanovení proteinů v séru

- Autoantilátky
- Immunoglobuliny
- Proteiny akutní fáze
- Komplement
- Specifické IgE a další ...

Protilátky

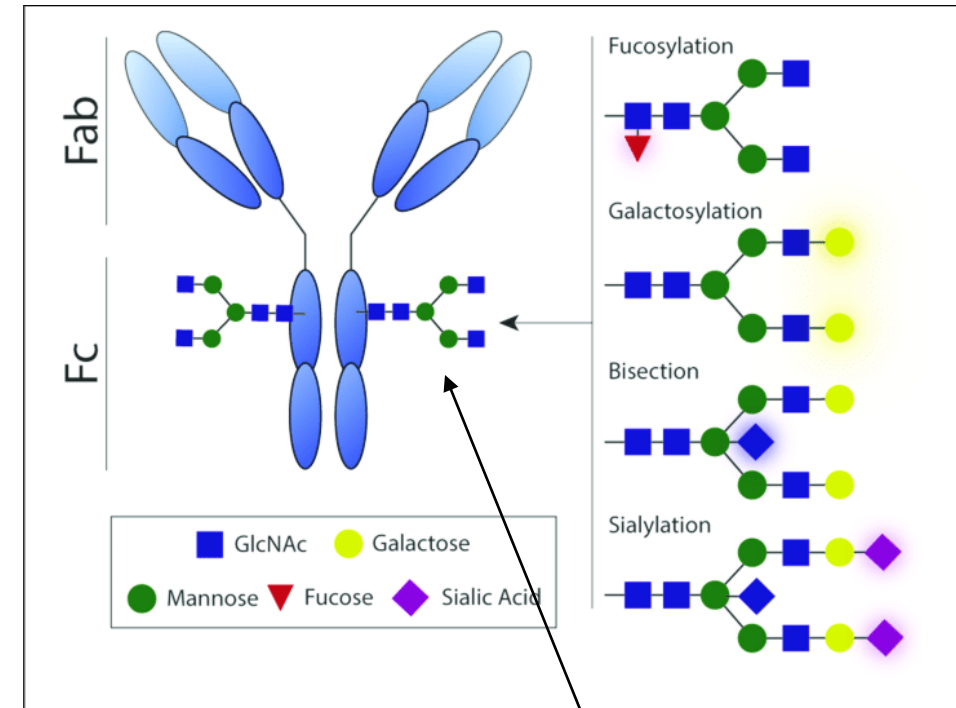
Chemické složení: **glykoproteiny**

Význam pro obratlovce:

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

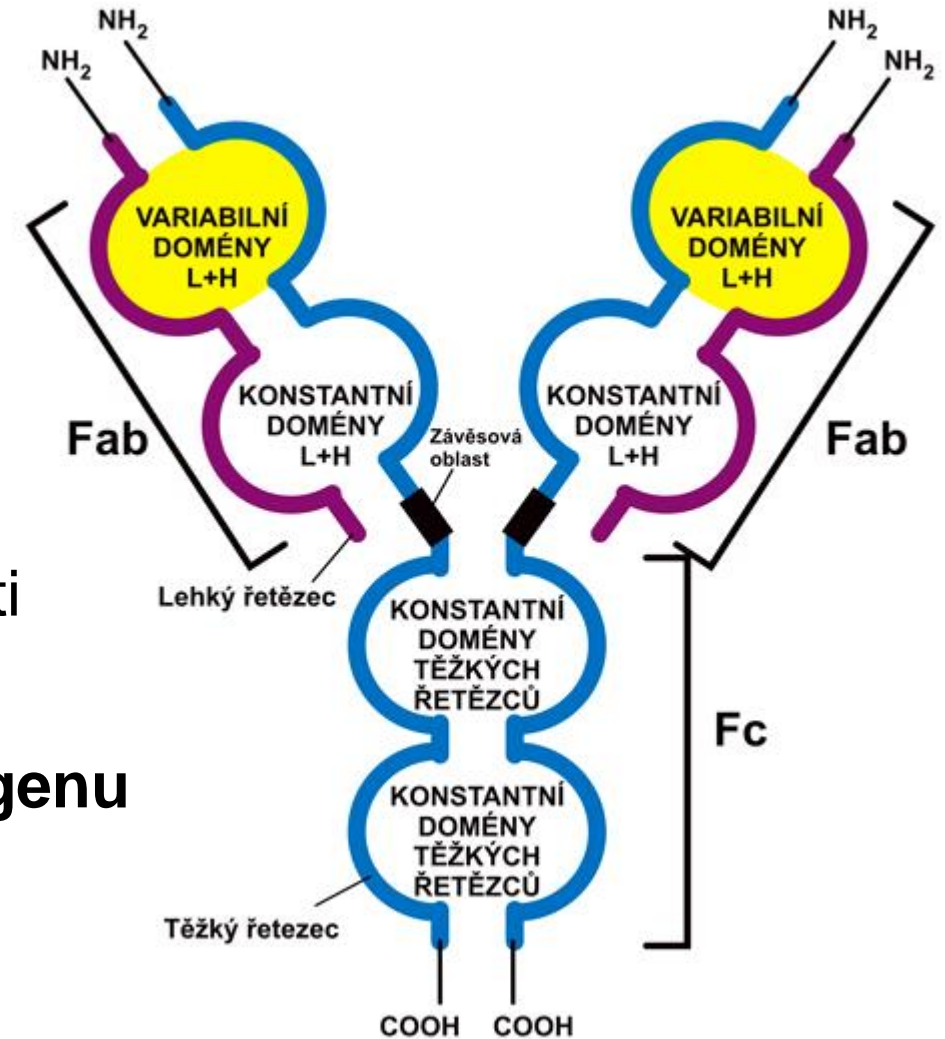
Význam pro medicínu:

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

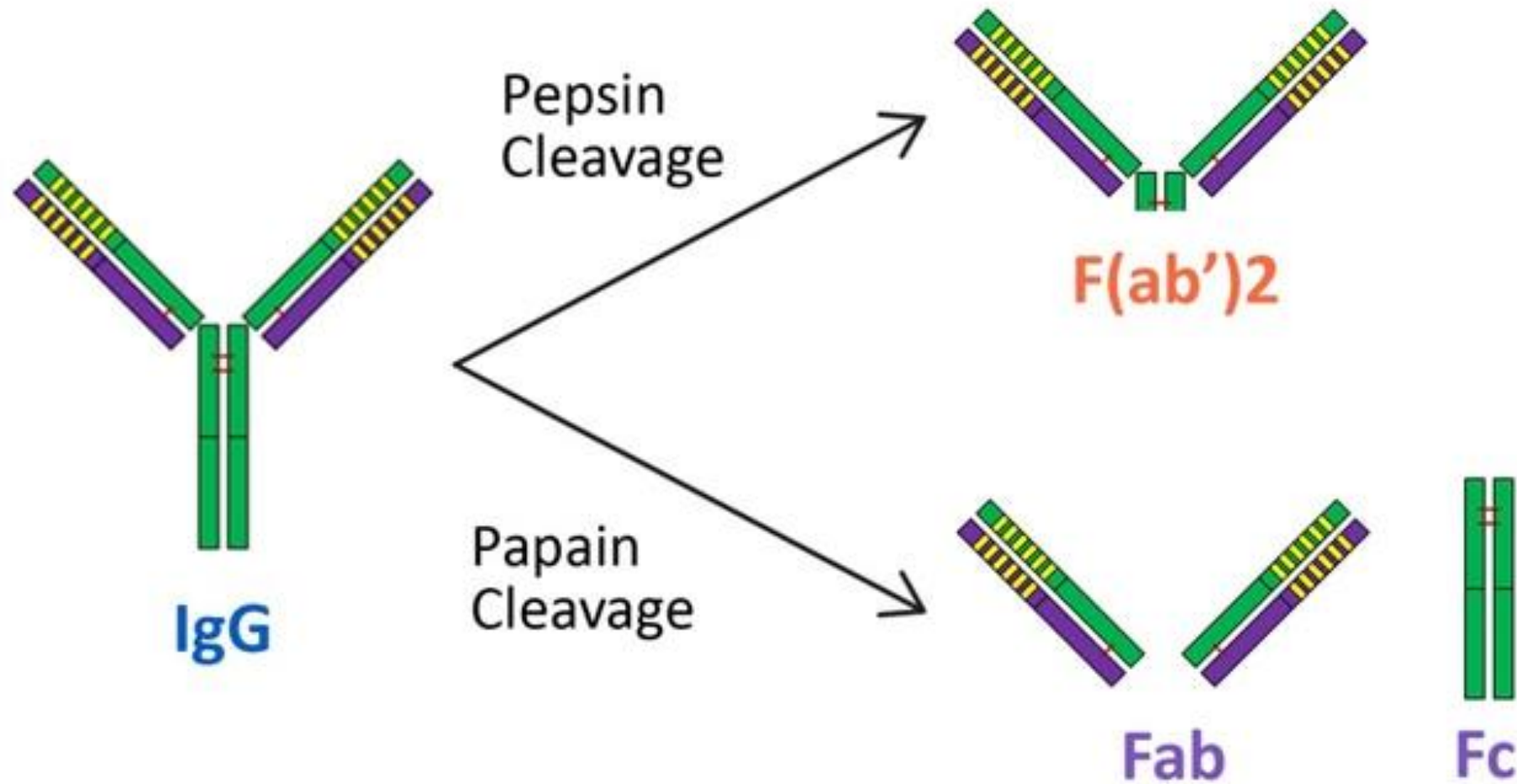


Struktura protilátky

- 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**



Štěpení protilátek enzymy



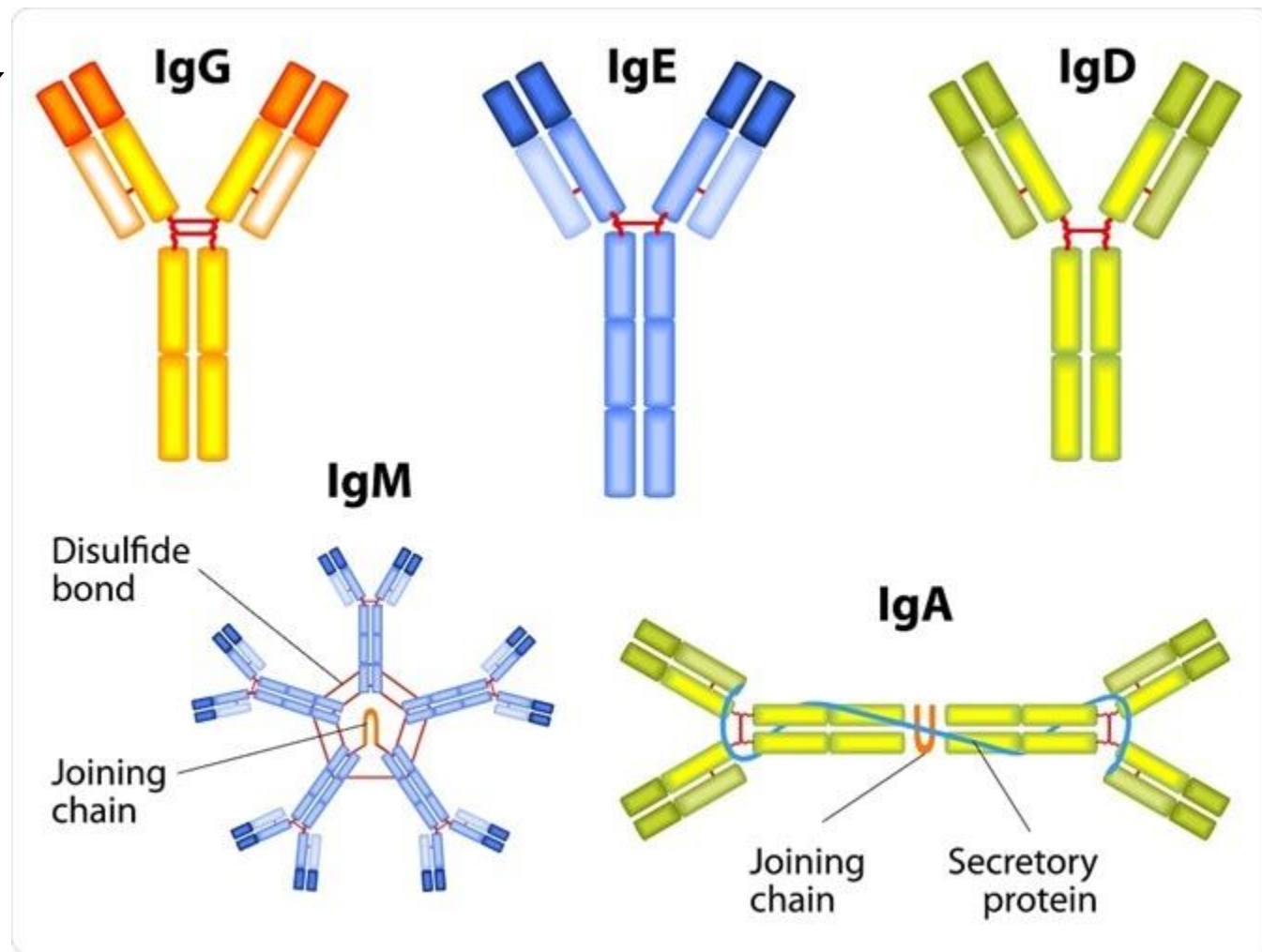
Třídy protilátek

- 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



Koncentrace protilátek v séru

- **IgG** 7,5 – 15,6 g/l
- **IgA** 0,8 – 4,5 g/l
- **IgM** 0,45 – 3 g/l
- **IgE** < 100 kU/l
- **IgD** < 100 IU/ml

Protilátky 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	+++	-	++	+	+++	-	+	-

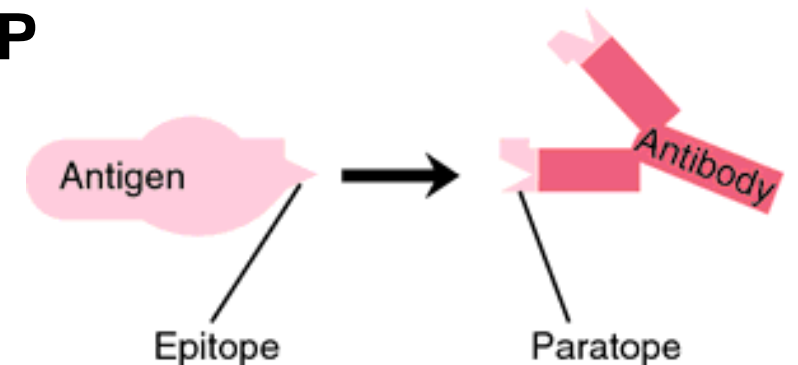
Protilátky různých tříd mají různý biologický poločas

- 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

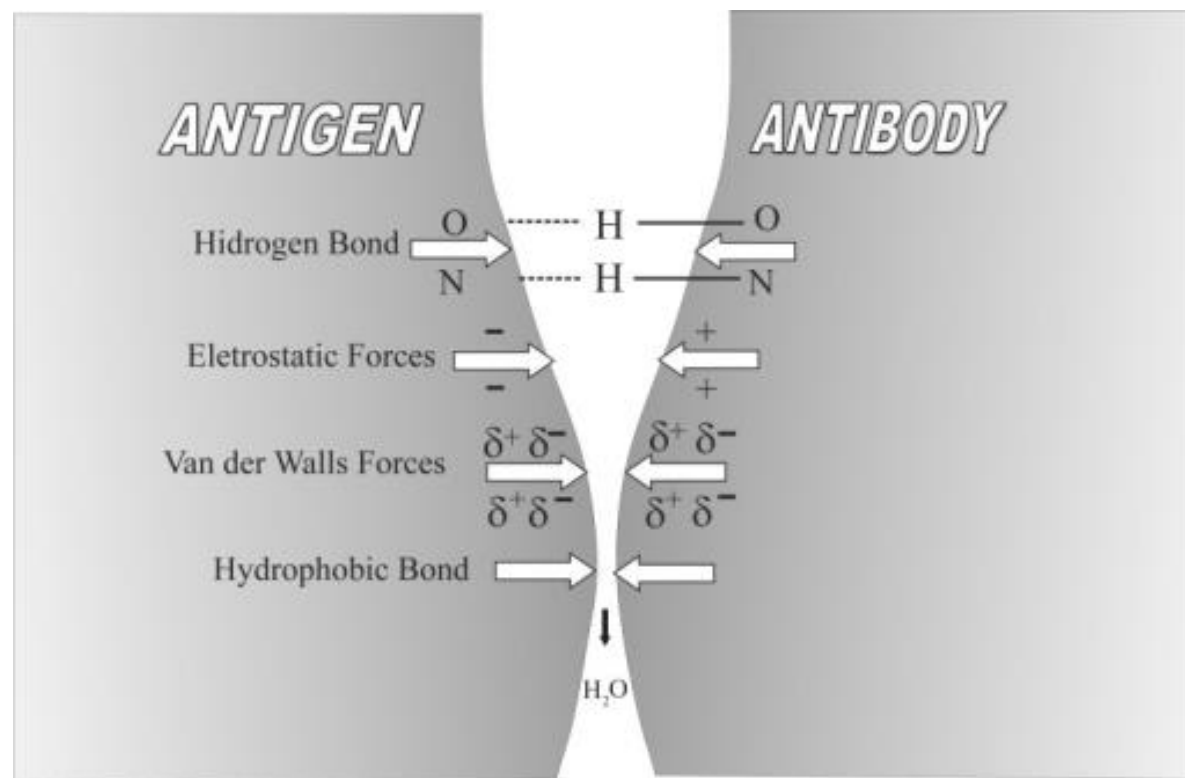
Principy reakce antigen-protilátka

- **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



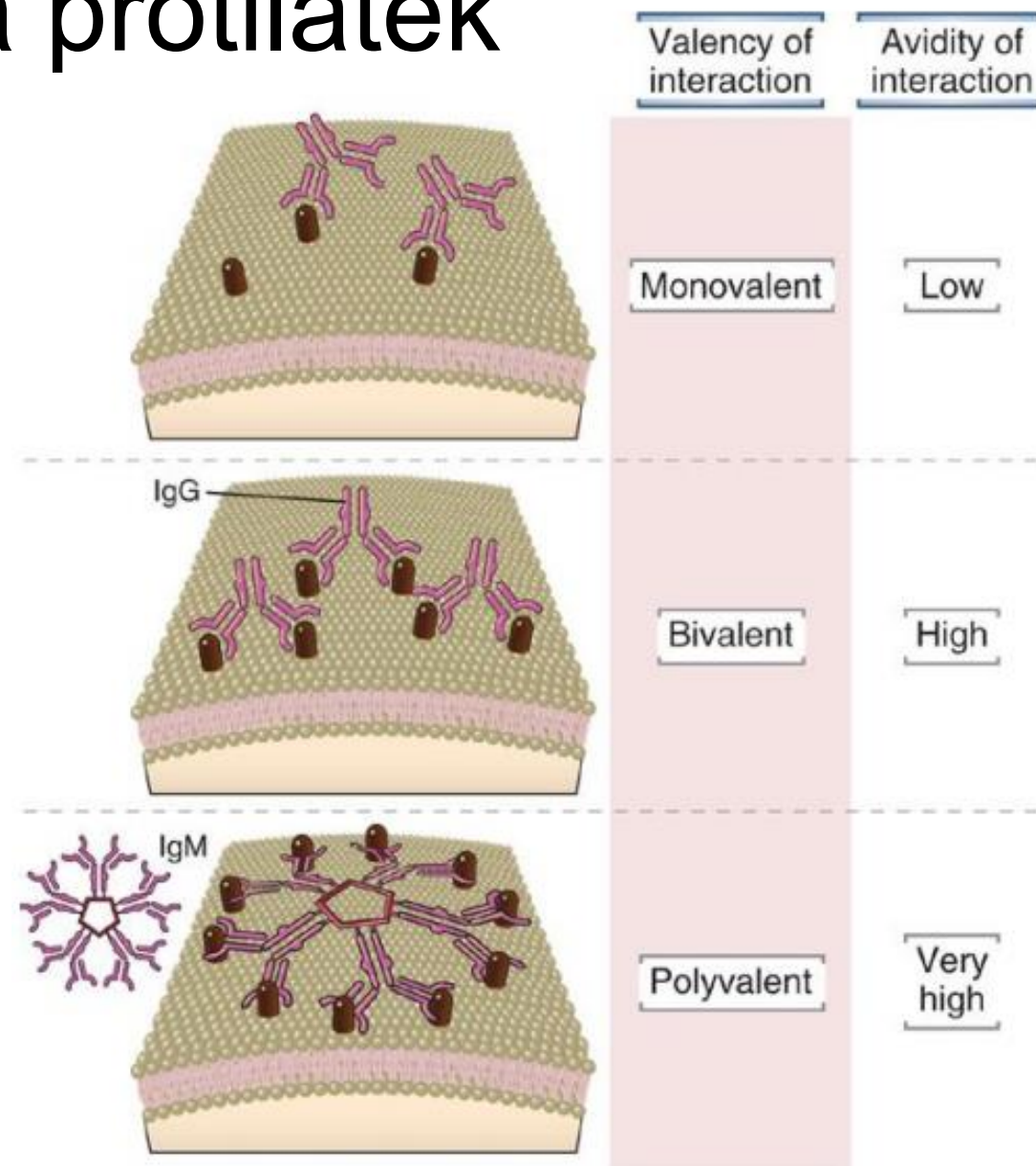
Afinita vs avidita protilátek

- Afinita

- síla interakce mezi 1 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

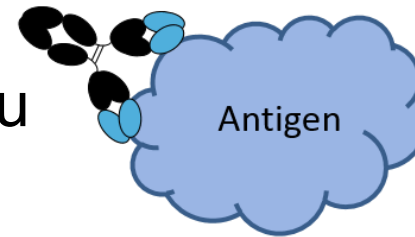


Protilátky mohou být

- 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 – **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

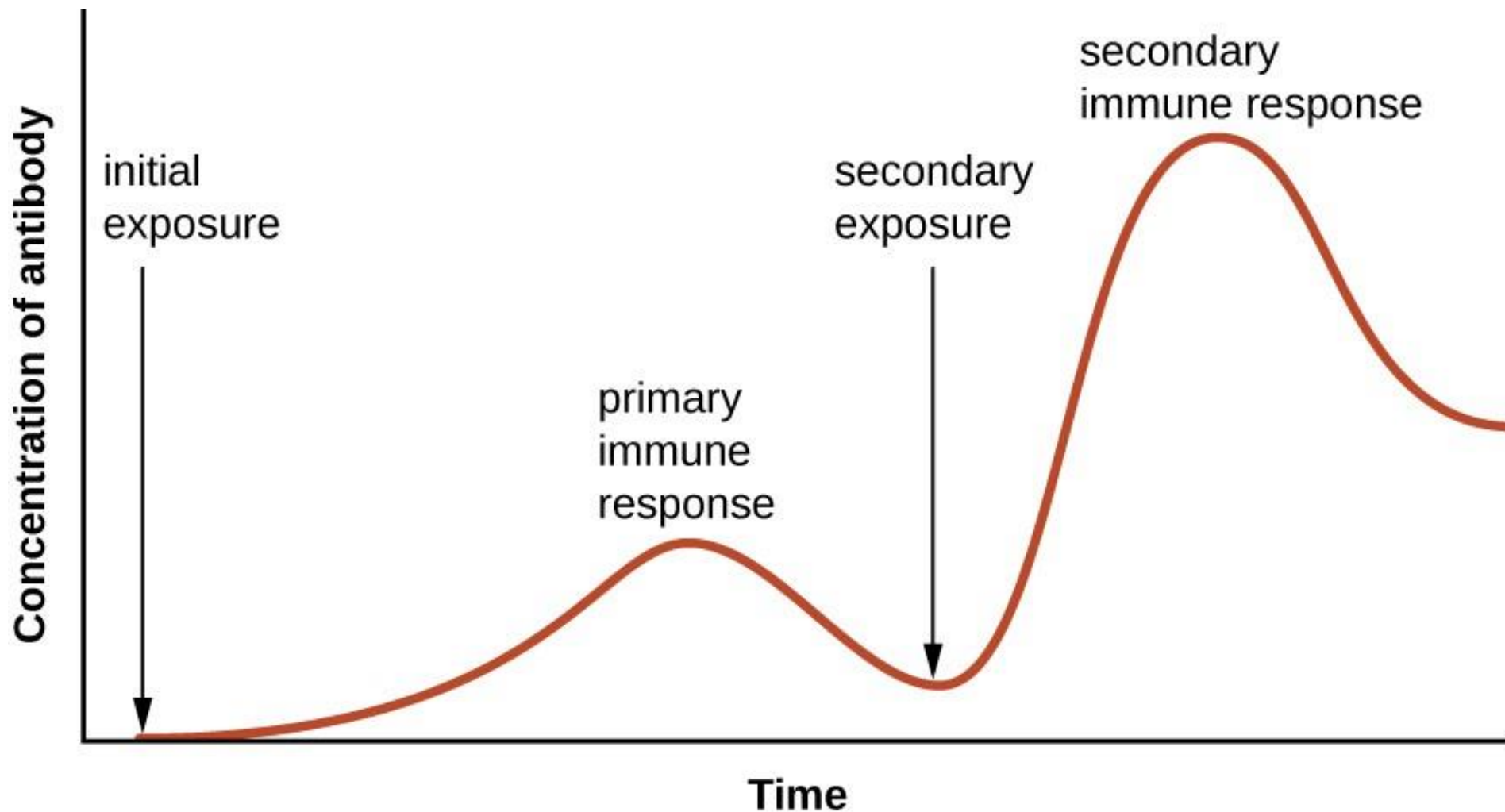
- Fylogeneticky co nejvzdálenější druh vzhledem k povaze antigenu



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

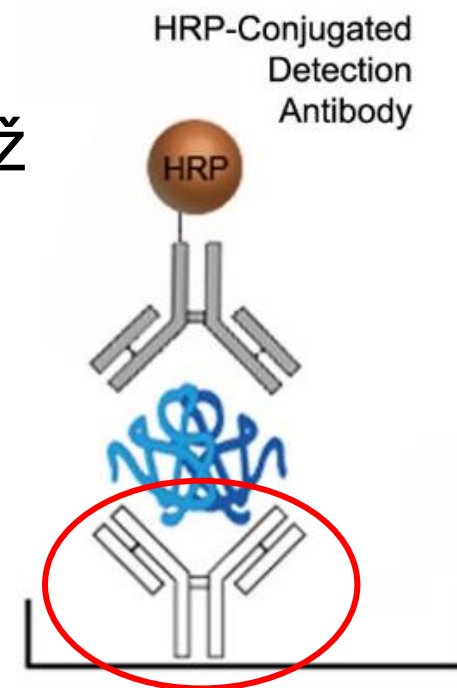
Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



ELISA

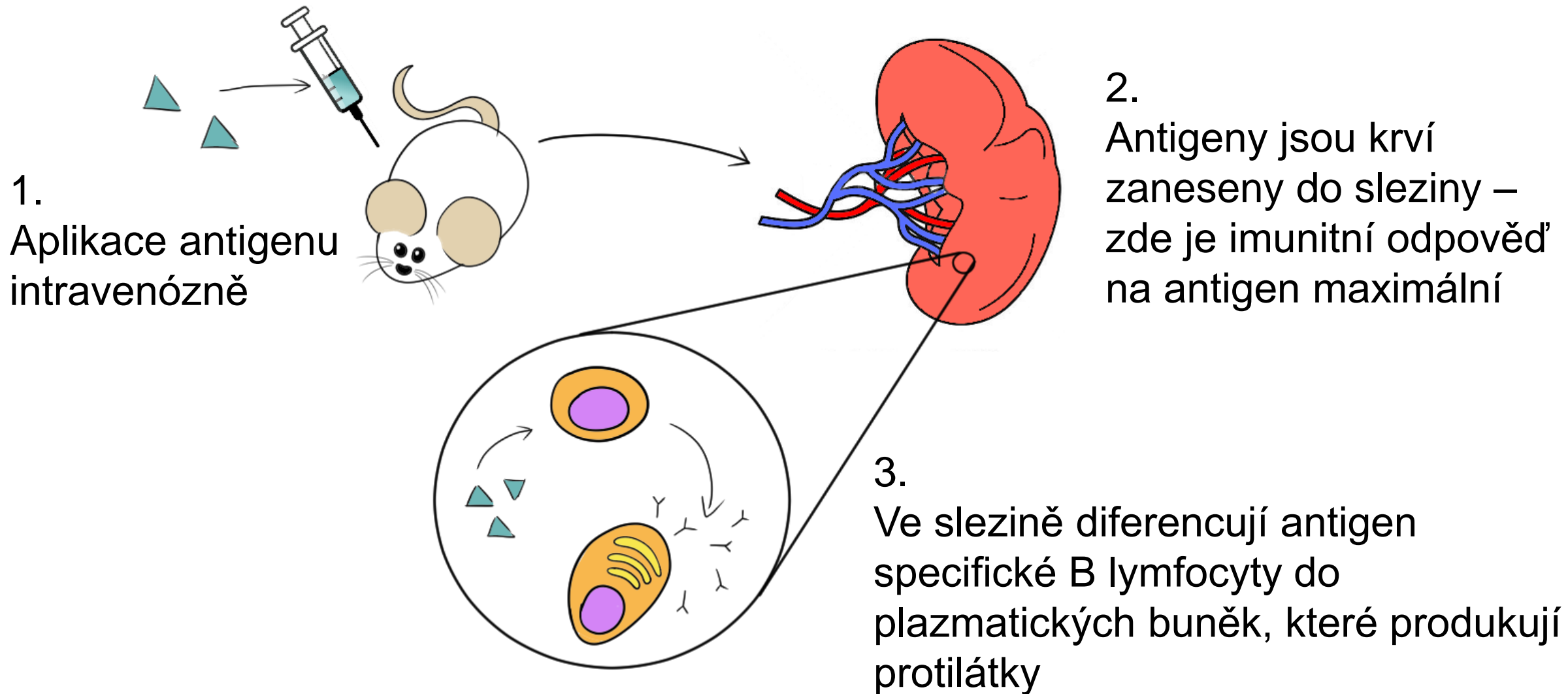
- Záchytné protilátky
- Záchyt různých variant antigenu
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita



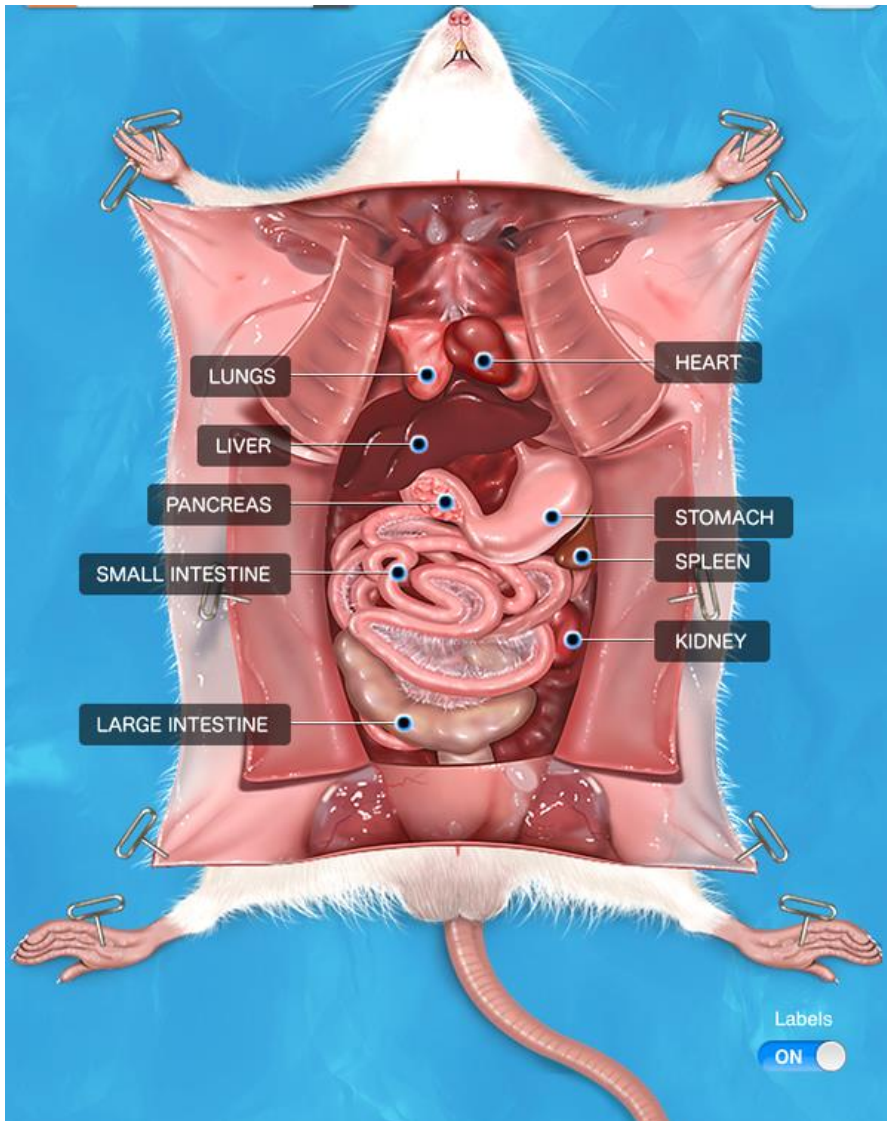


Výroba monoklonálních protilátek

Výroba monoklonálních protilátek



Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

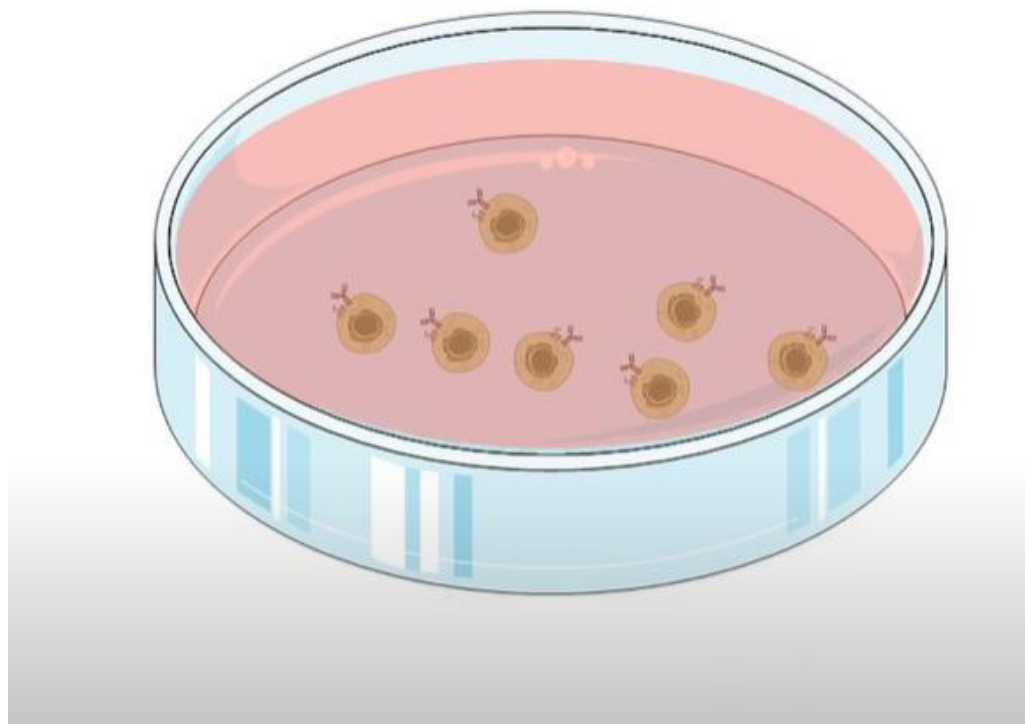
5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



Problém

Izolované B-lymfocyty dlouho nepřežijí
Jak tedy získat dostatek protilátek?

B cells survive for not more than a week!



Výroba monoklonálních protilátek

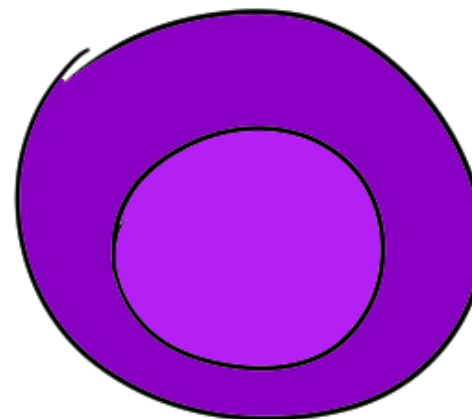
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

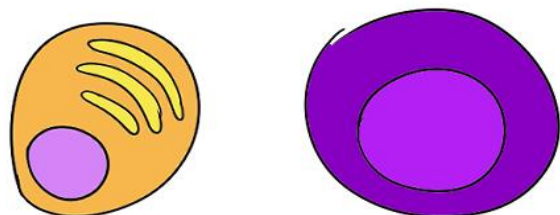


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

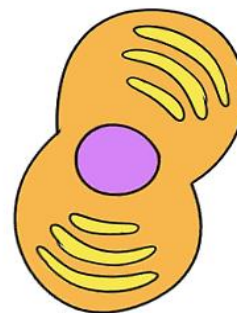
6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

Výroba monoklonálních protilátek

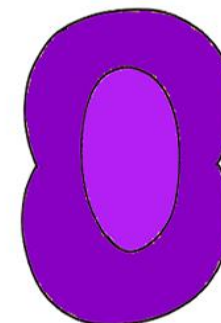
Nezfúzované B lymfocyty
a myelomové buňky



Zfúzované
B lymfocyty



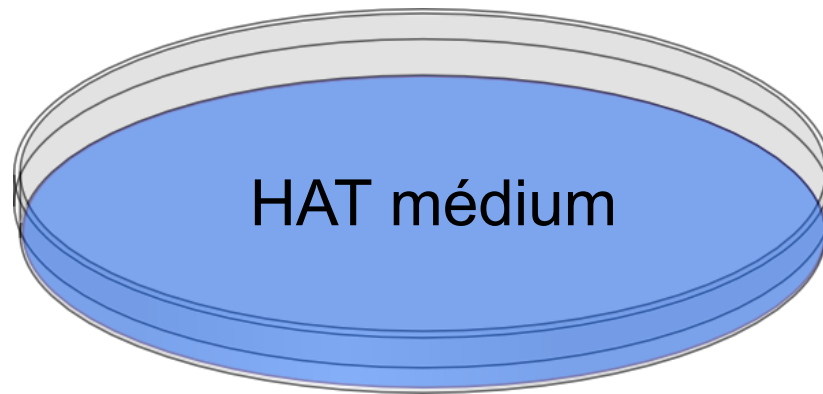
Zfúzované myelomové
buňky



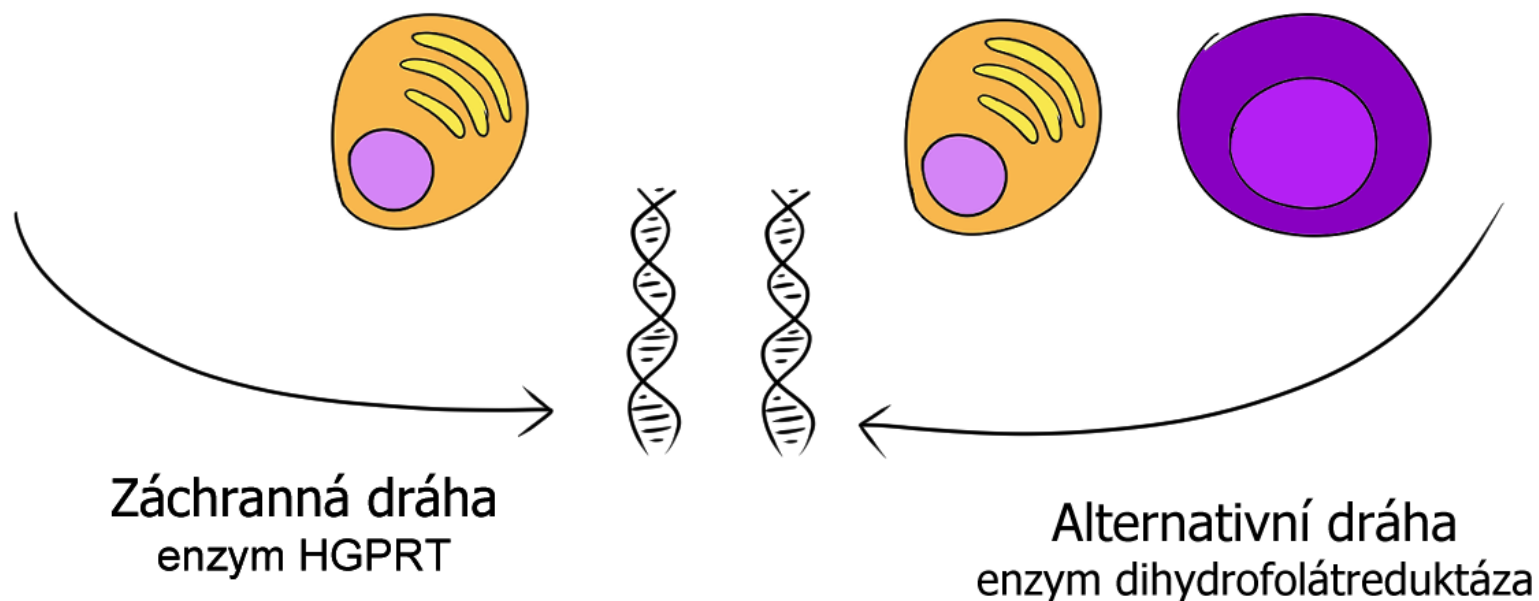
HYBRIDOM



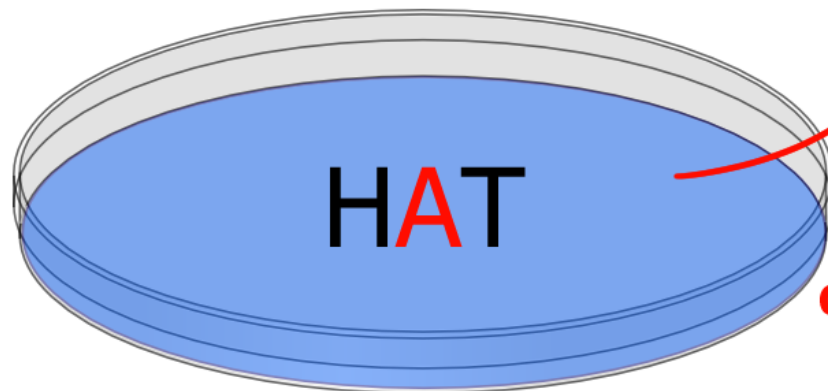
7. Buněčná směs je
kultivována v selekčním
HAT médiu
(Hypoxantin, Adenosin,
Thymidin)



Selekce – enzymatický blok

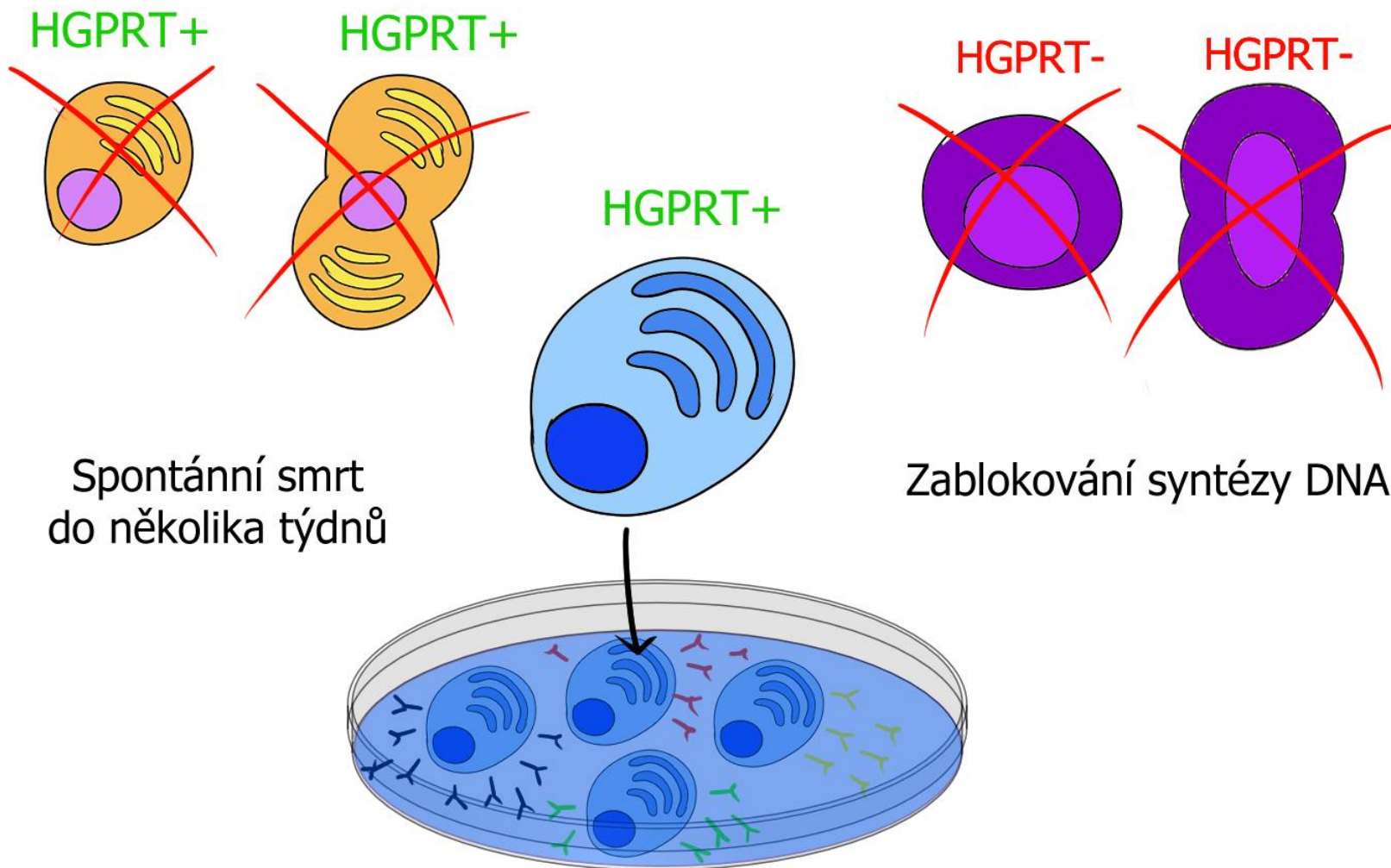


HGPRT = Hy
FosfoRibosy



**Aminopterin
blokuje
dihydrofolátreduktázu**

Selekce – enzymatický blok

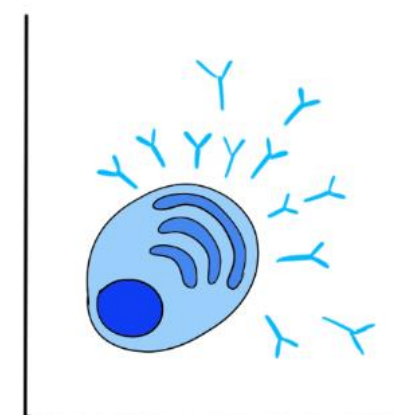
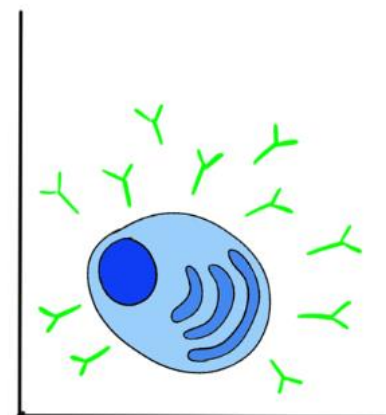
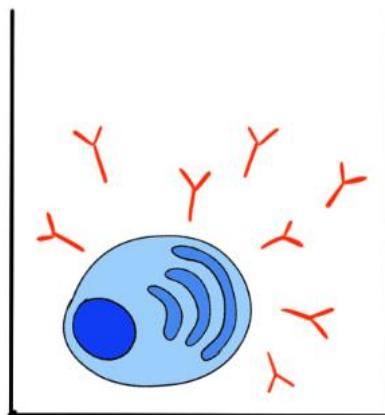
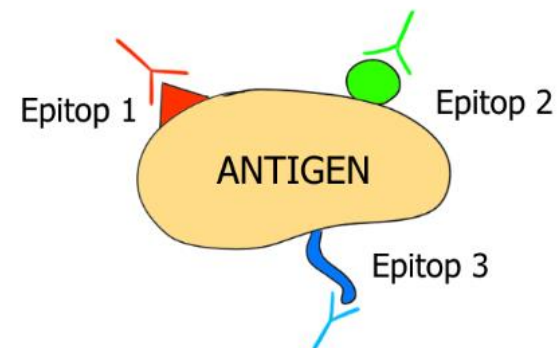


Výroba monoklonálních protilátek

8. Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek

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

10. Přechištění, kvantifikace, validace



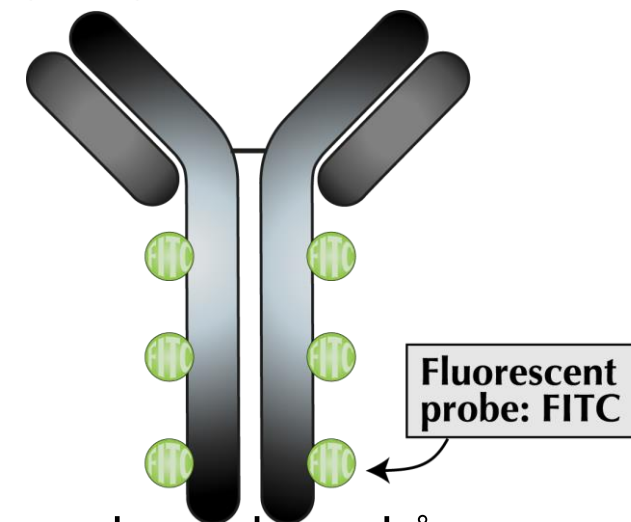
Využití monoklonálních protilátek

- 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

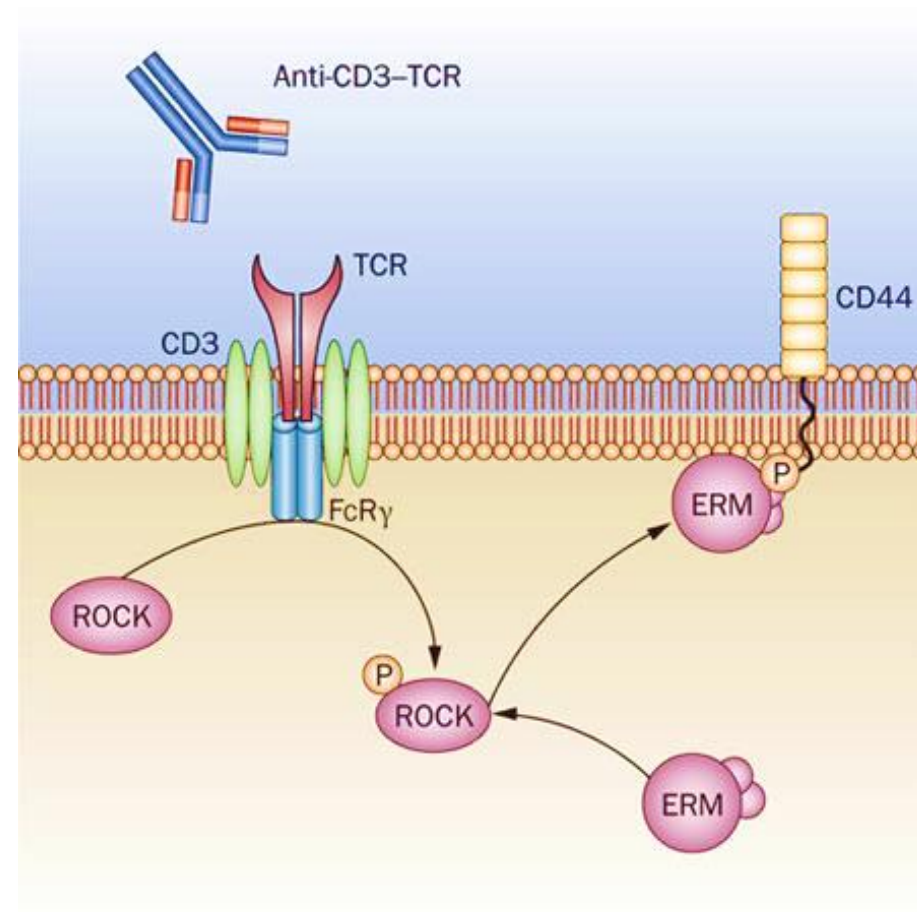
Využití monoklonálních protilátek

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

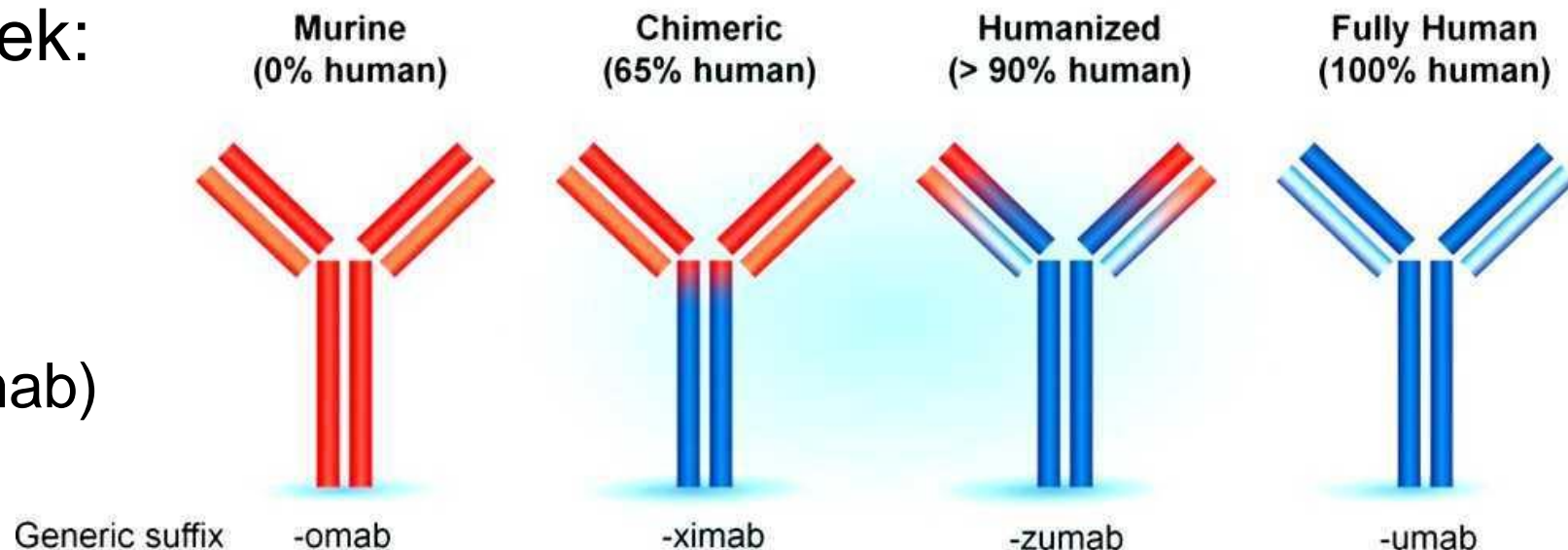


Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

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

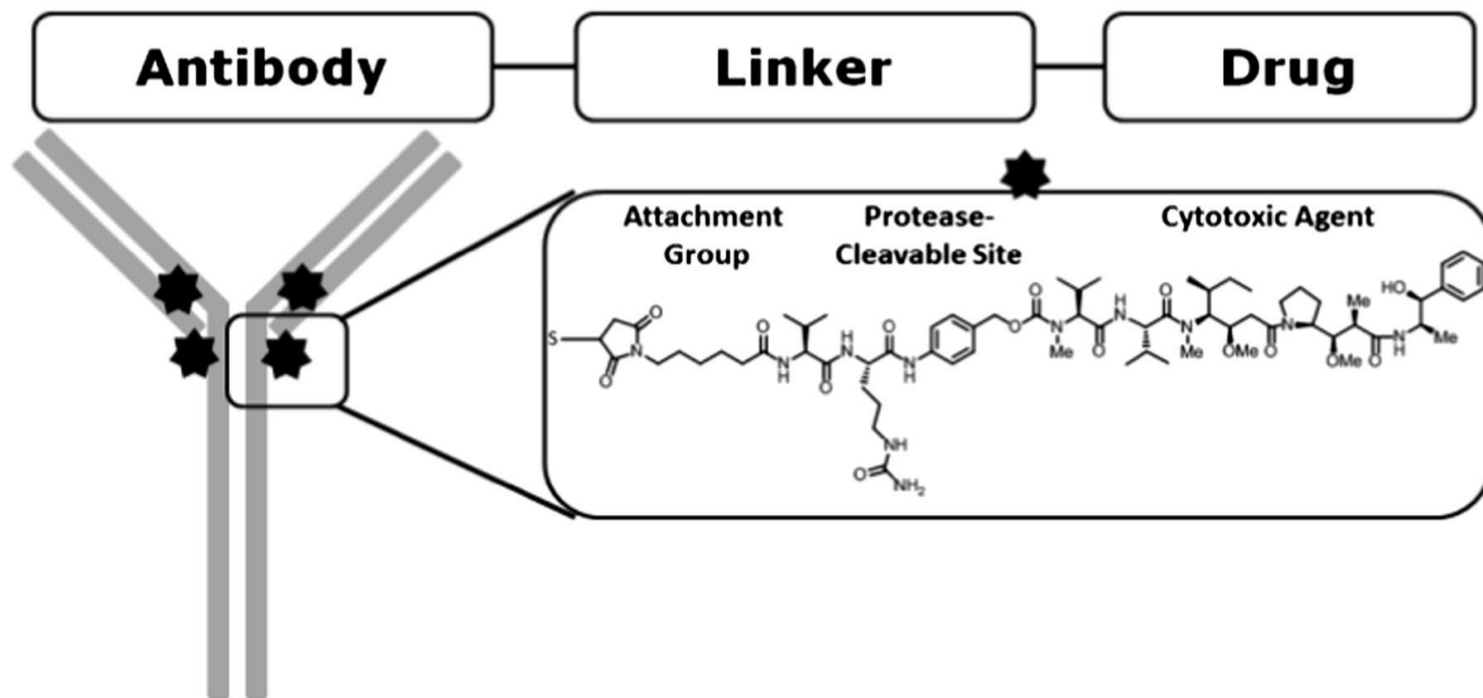
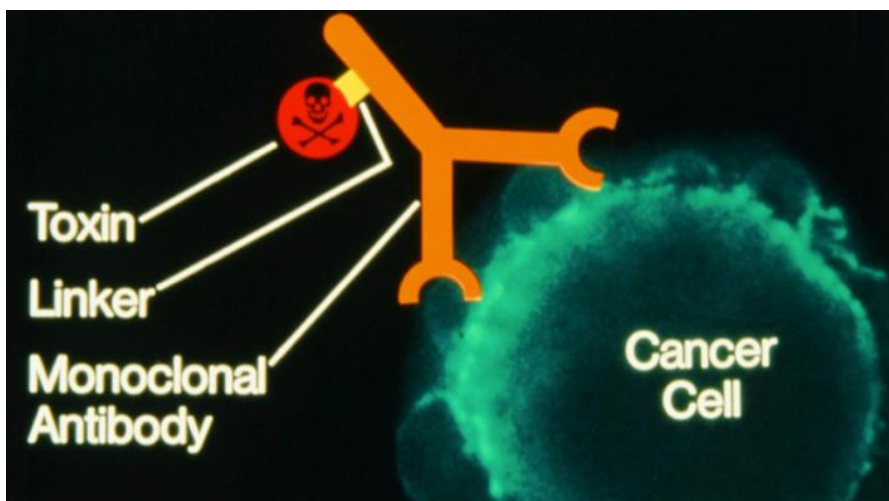


Využití monoklonálních protilátek

- 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