



# Cvičení č. 1

## Úvod Biologický materiál Protilátky

Mgr. Julie Štíchová  
424773@mail.muni.cz

# ÚKIA

Ústav Klinické Imunologie a Alergologie

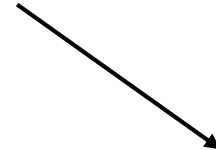
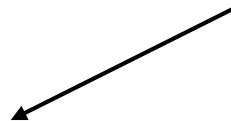
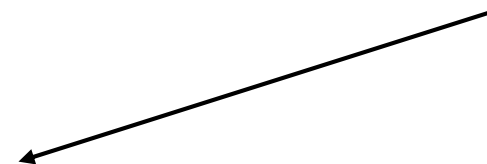
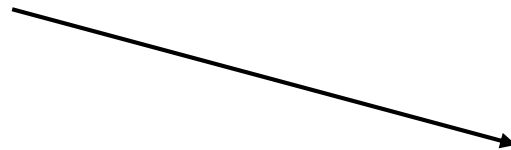
**Alergologická ambulance**  
Alergická onemocnění

**Imunologická ambulance**  
Autoimunity, imunodeficience

**Laboratoř**

**Buněčná část**

**Serologická část**



# Rozdělení imunologických laboratorních metod

## Buněčná laboratoř

Soustředí se na leukocyty



- 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**

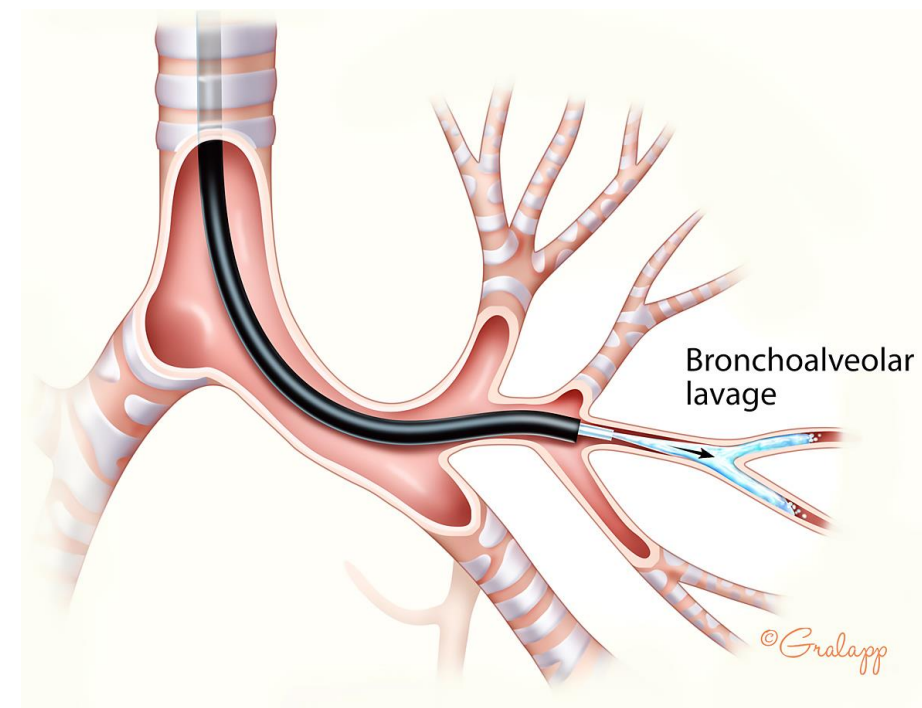
- Vlastní laboratorní vyšetření, kalibrace metody + kontroly, dokonalý technický stav přístrojů

- **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  $\text{Ca}_{2+}$
- 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

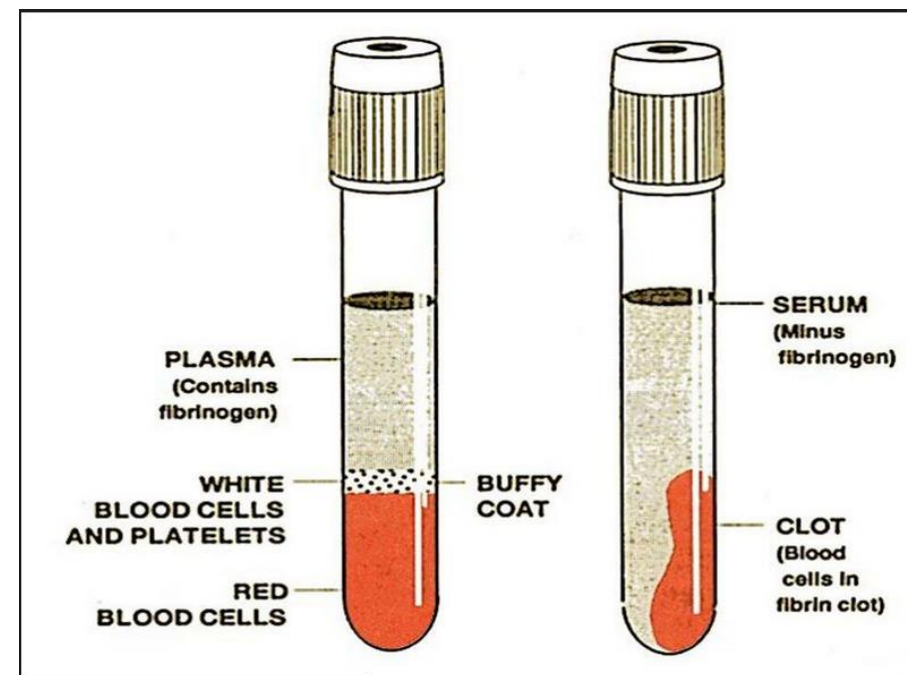
## Serologická laboratoř

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

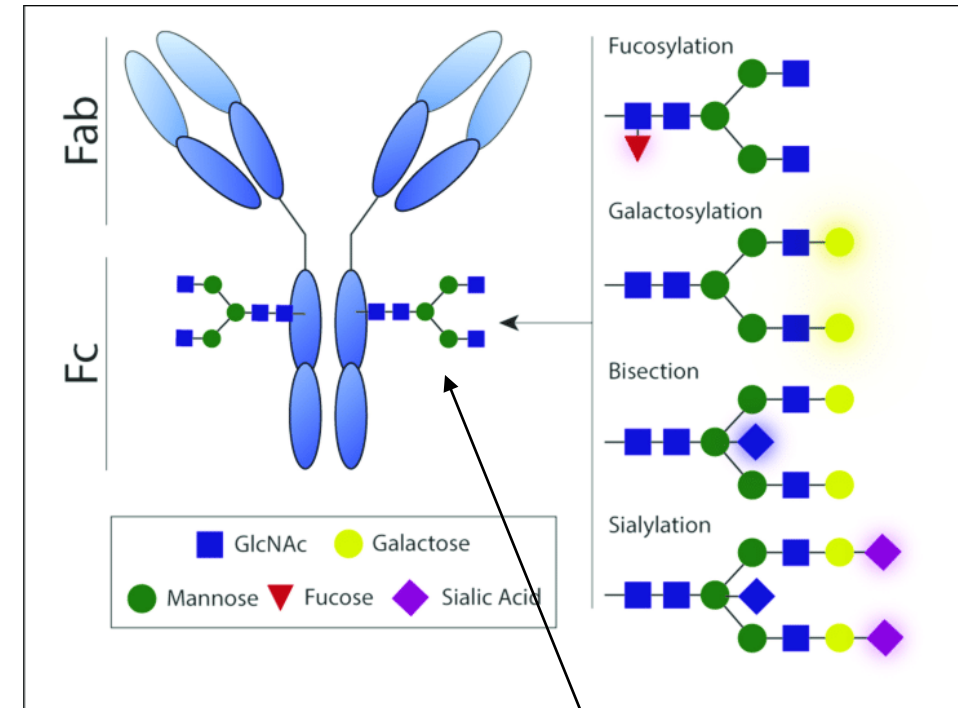
Chemické složení: **glykoproteiny**

Význam pro obratlovce:

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

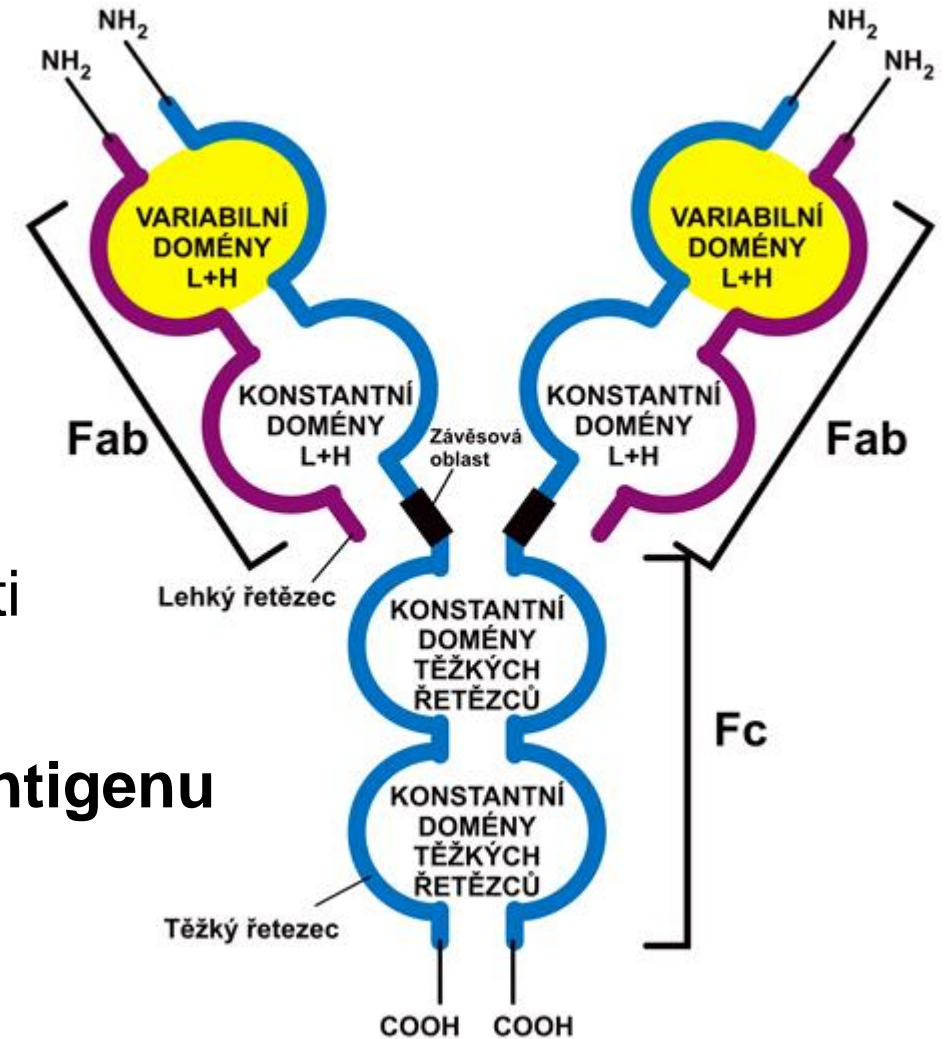
Význam pro medicínu:

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



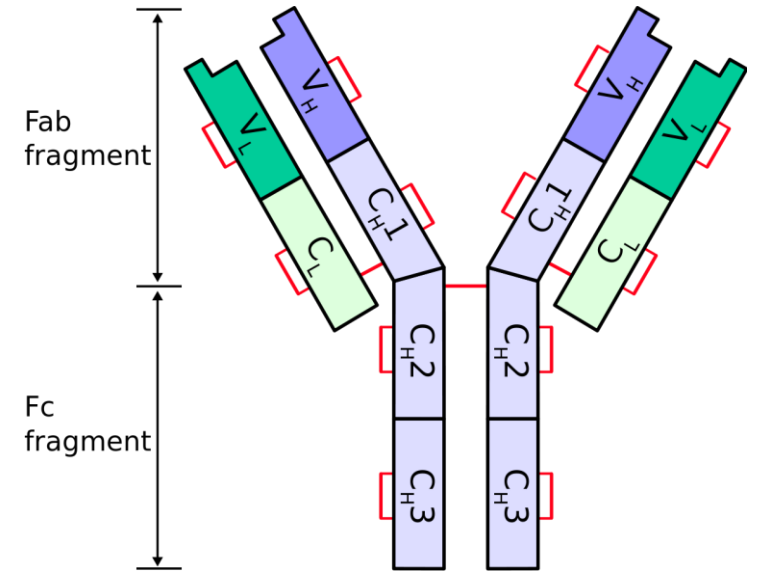
# Struktura protilátky

- 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**



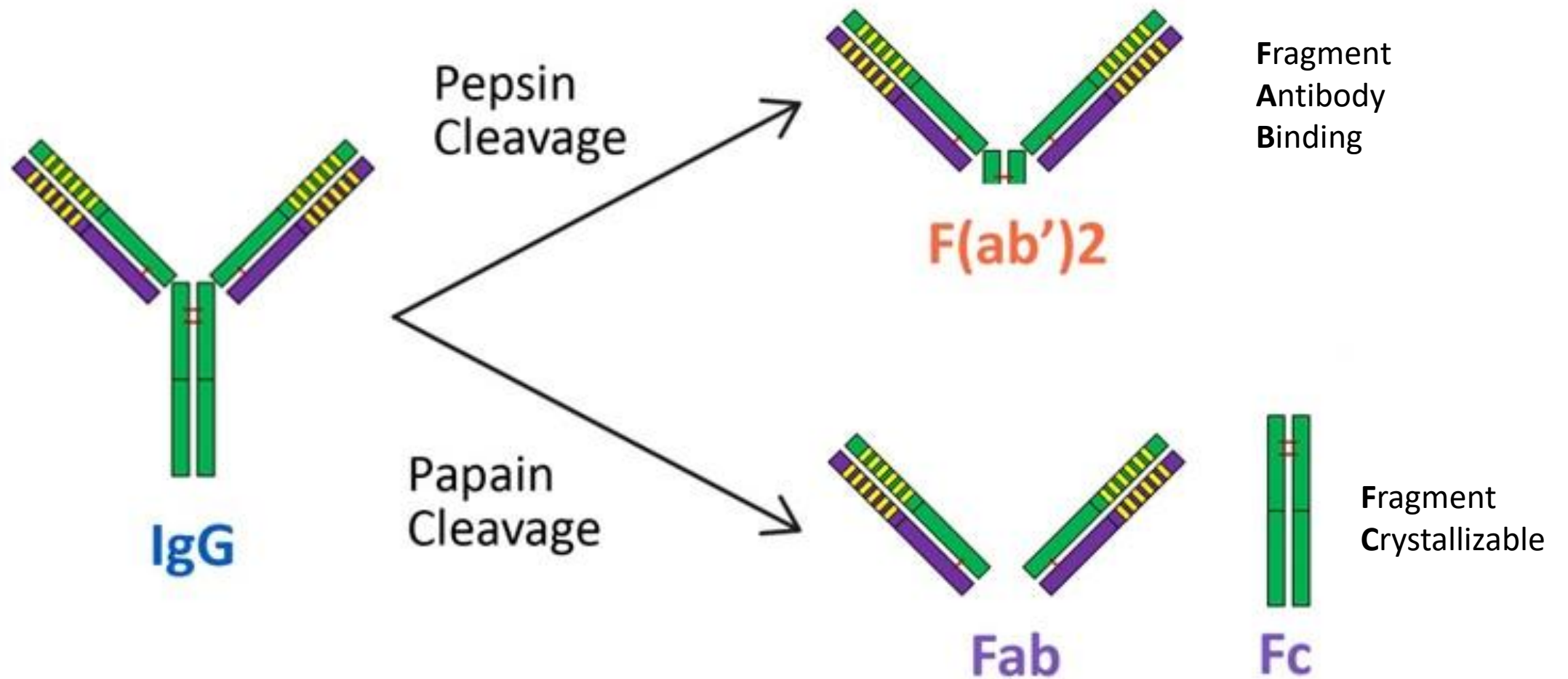
# Lehké řetězce

- Jsou dvojího typu:
  - kappa ( $\kappa$ )
  - lambda ( $\lambda$ )



- 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



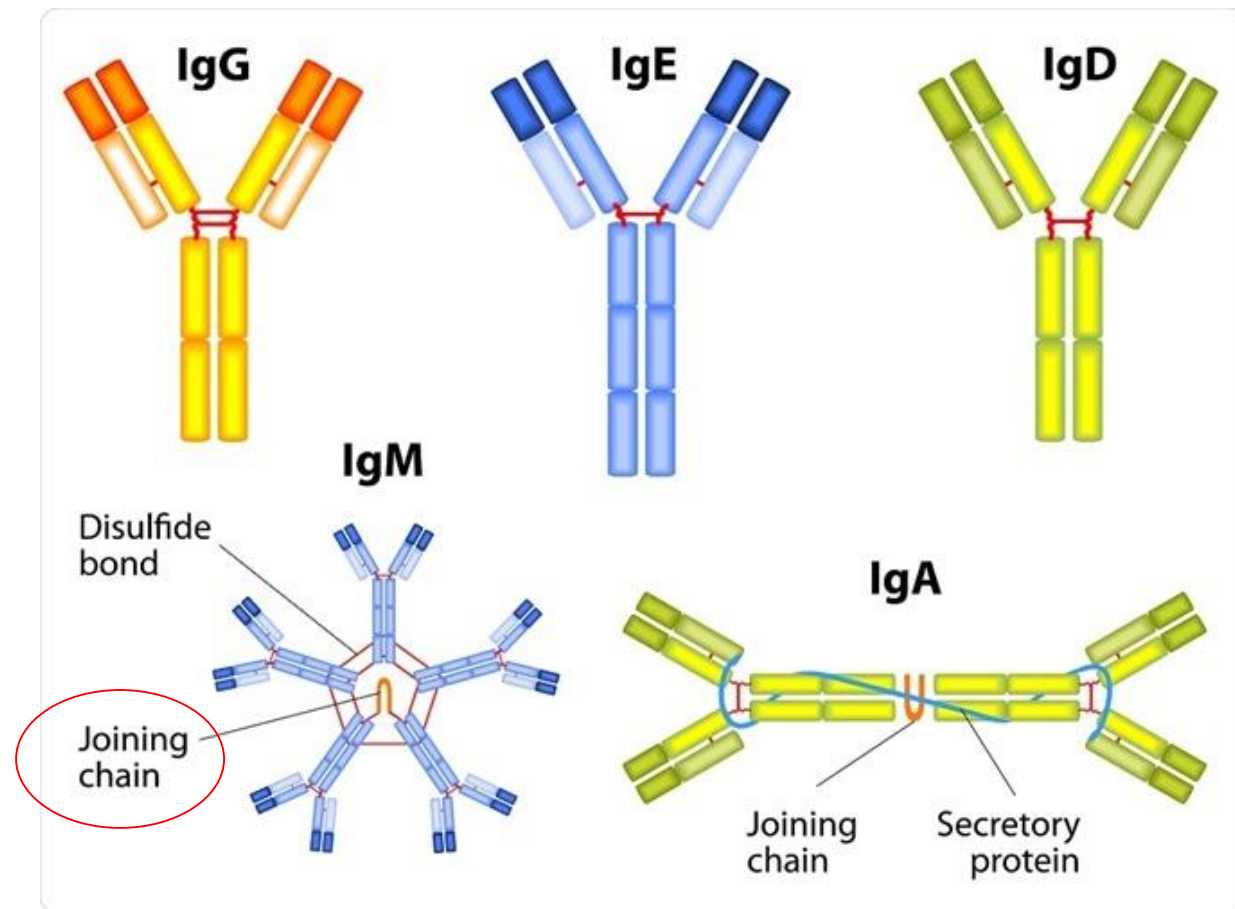
# Třídy protilátek

- 5 tříd – podle typu konstantní části těžkého řetězce
- IgG - monomer
  - 4 podtřídy IgG<sub>1</sub>-IgG<sub>4</sub>
- IgA - monomer, dimer
  - 2 podřidy IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>

IgE - monomer

IgD - monomer

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



# Protilátky různých tříd mají specifické funkce

efektorové funkce určuje Fc fragment

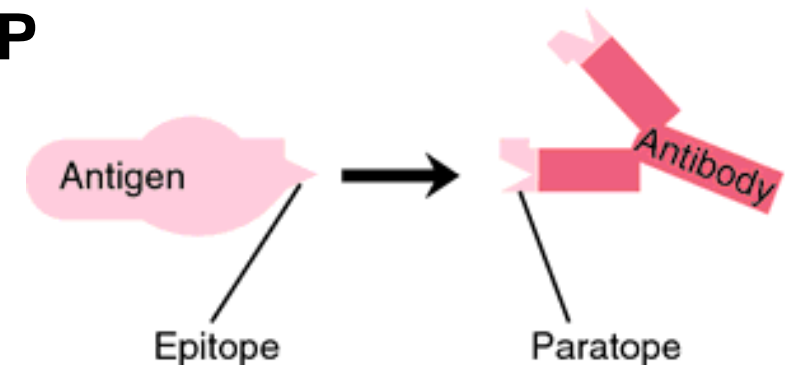
| Functional activity                   | IgM | IgD | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA | IgE |
|---------------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|
| Neutralization                        | +   | -   | ++   | ++   | ++   | ++   | ++  | -   |
| Opsonization                          | +   | -   | ++   | *    | ++   | +    | +   | -   |
| 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

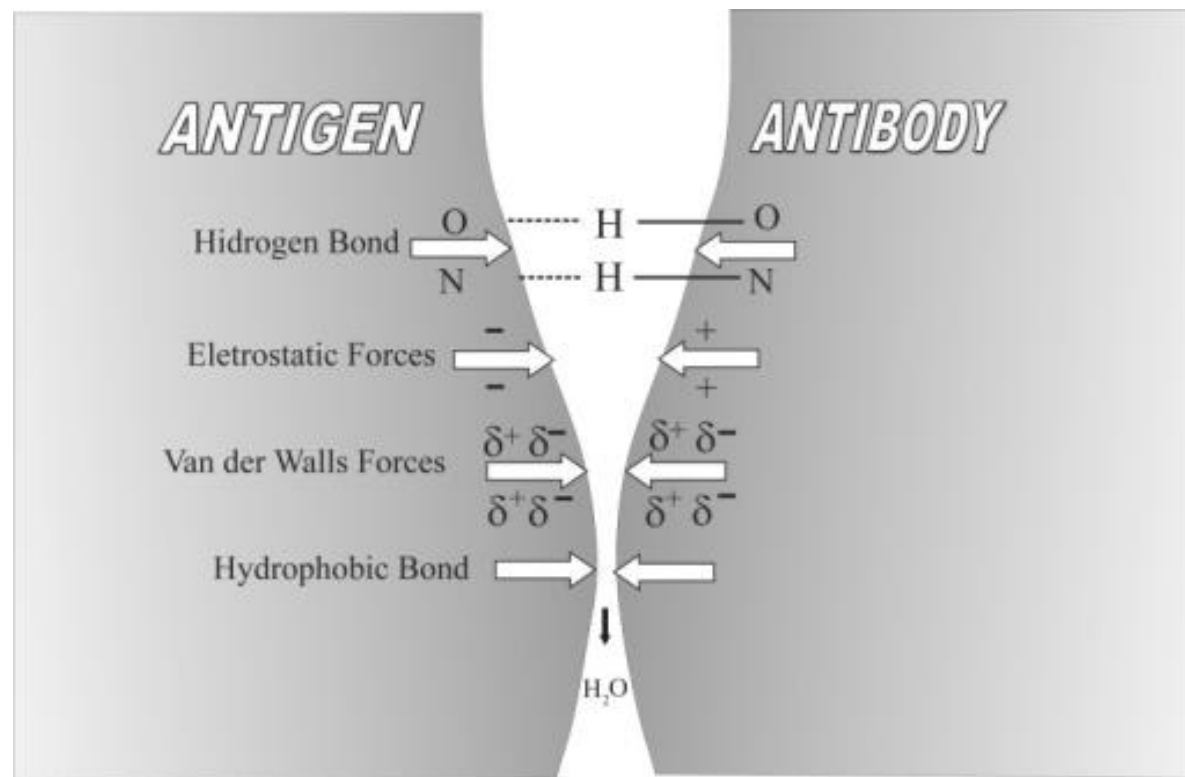
- **Imunogen** – látka na niž imunita reaguje (např. aktivace fagocytů)
- **Antigen (Ag)**
  - Látka schopná vyvolat tvorbu **protilátek**
  - Konkrétní místo na jeho povrchu, kam se váže protilátka – **EPITOP**
- **Protilátka (Ab)**
  - Specifický produkt terminálních vývojových stádií B lymfocytů
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



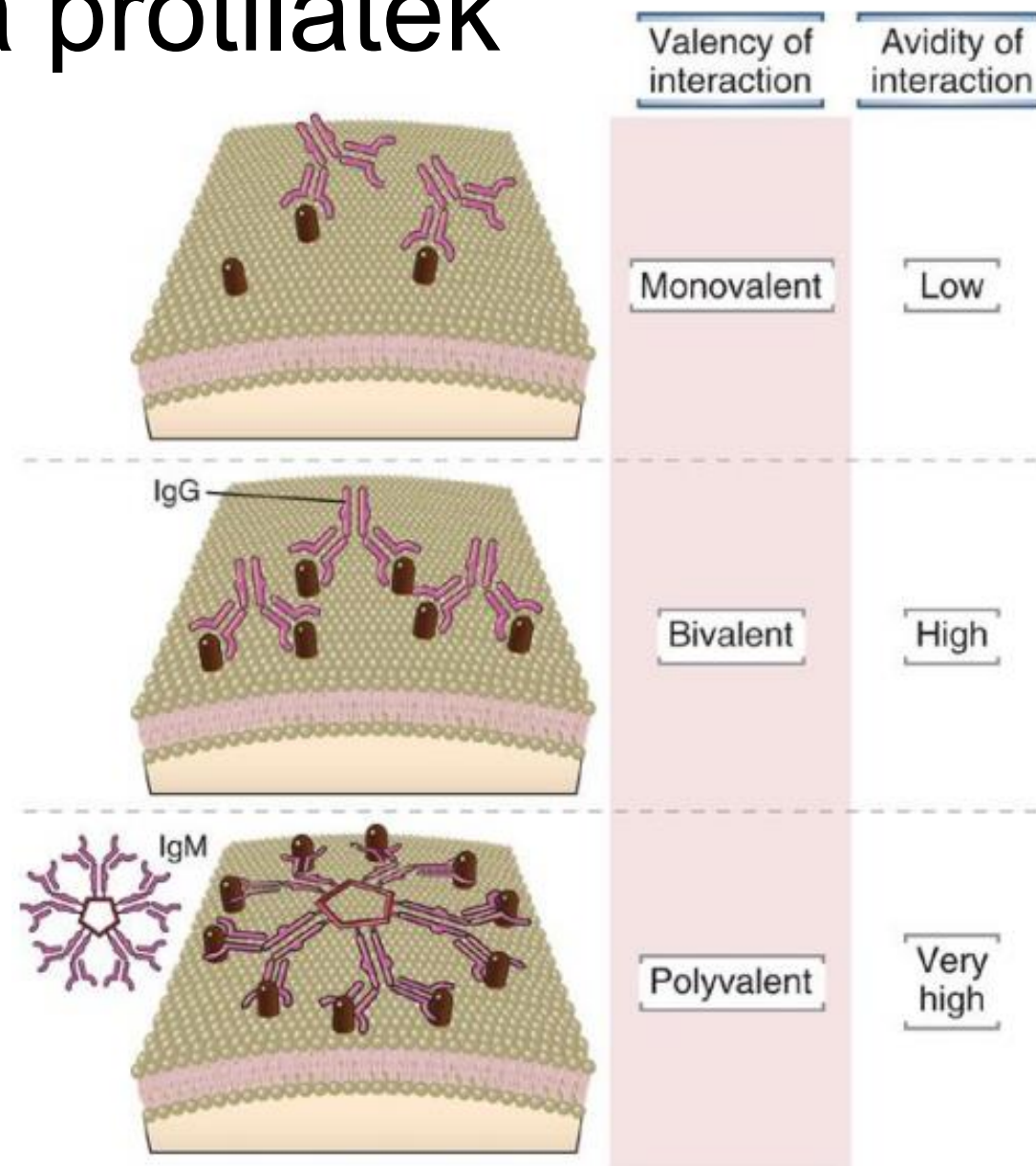
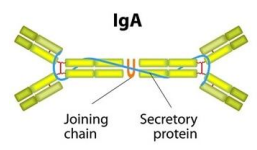
# Afinita vs avidita protilátek

- Afinita

- síla interakce mezi 1 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

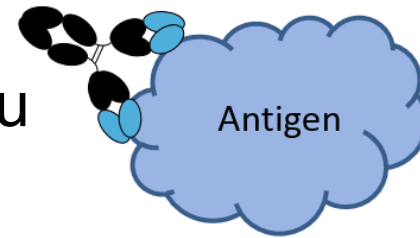


# Protilátky mohou být

- Monoklonální

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

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 imunogenost a udržují antigen déle v těle
  - soli  $\text{Al}_2\text{O}_3$
  - 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



Rabbit



Sheep



Goat



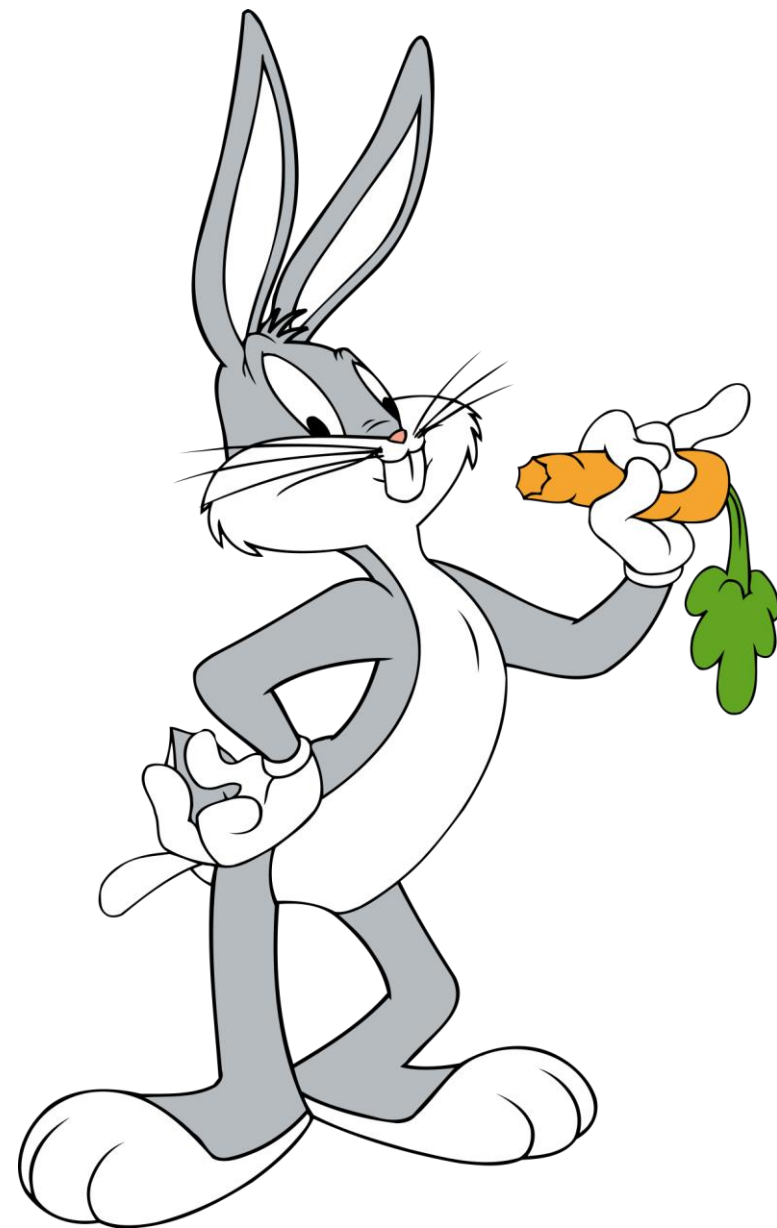
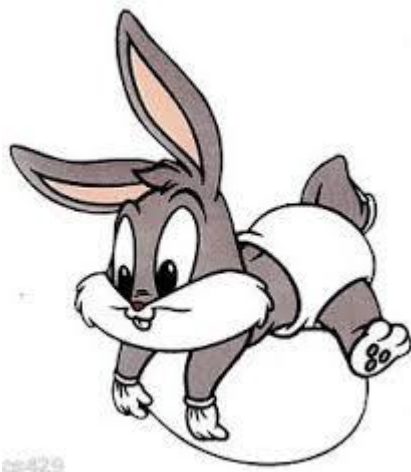
Llama

## 4. Způsob aplikace – nejčastěji intradermálně, subkutánně

- Antigen je vycytán ve spádových lymfatických uzlinách – maximální odpověď

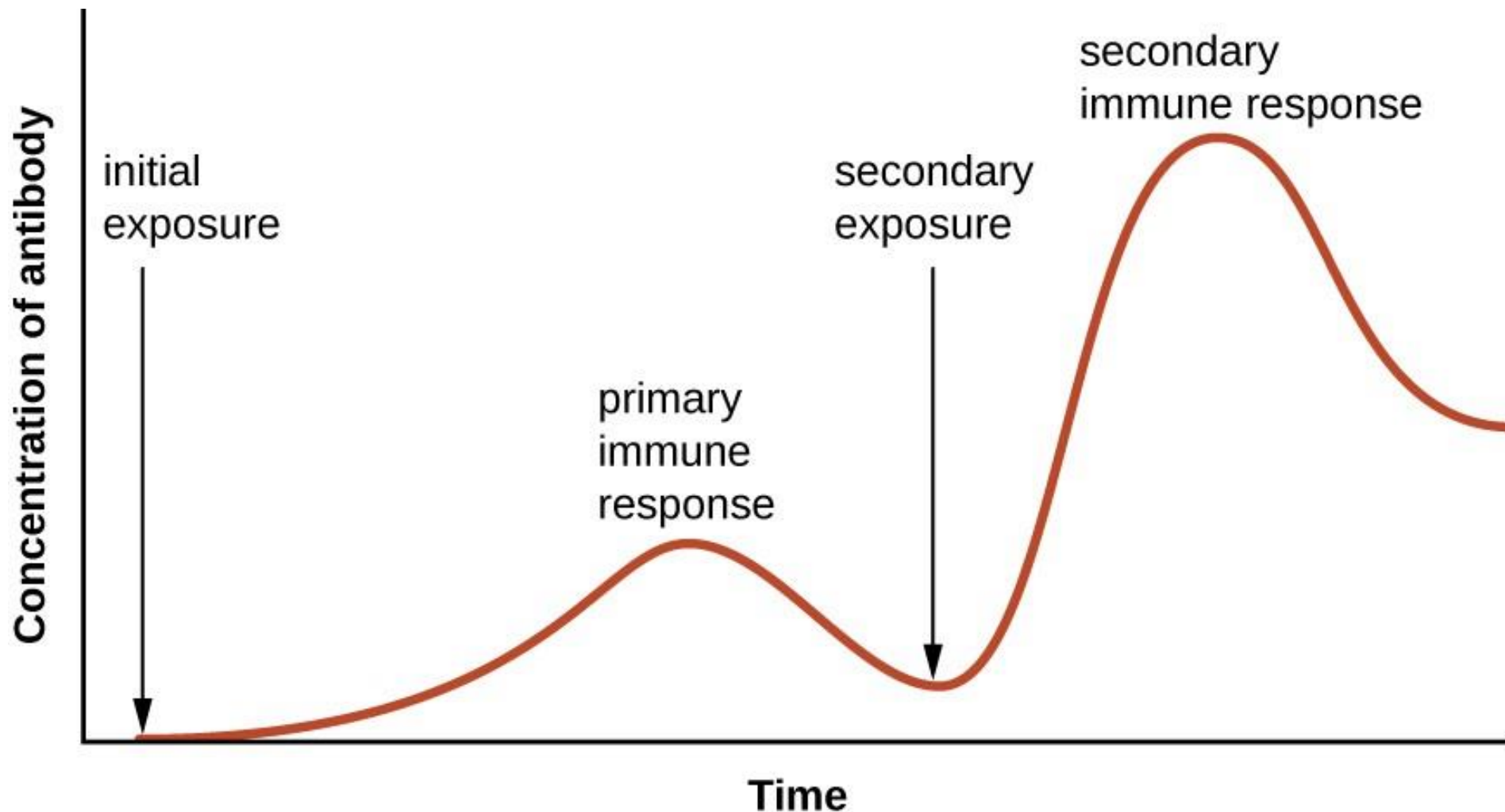
# Má význam věk zvířete?

- Ano
- Imunizujeme pouze mladé dospělé
  - Vyvinutý a silný 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. 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

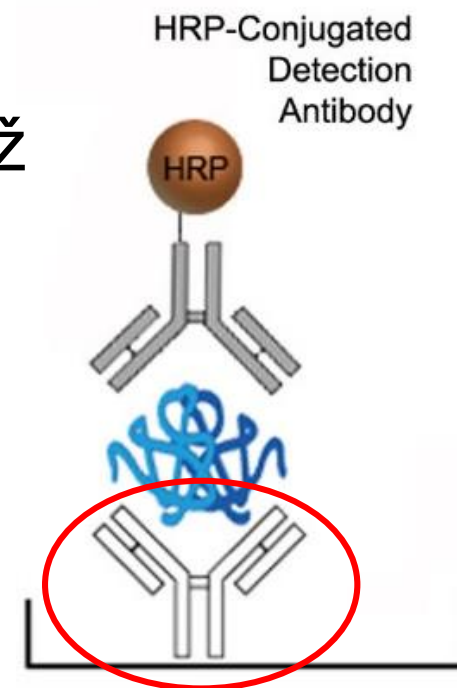
## Léčba

- Antiséra proti hadím jedům



## ELISA

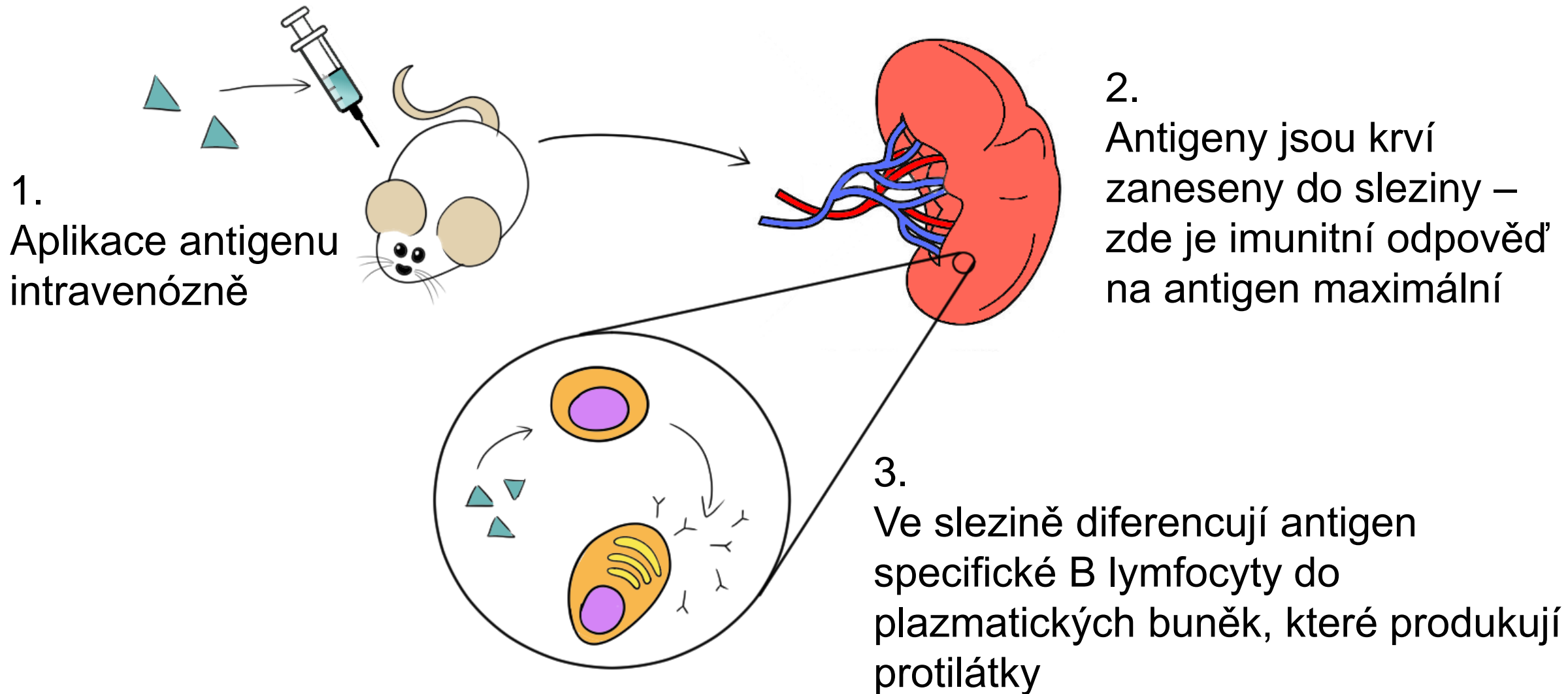
- Záchytné protilátky
- Záchyt různých variant antigenu
- Vyšší senzitivita než monoklonální Ab
- Nižší specifita



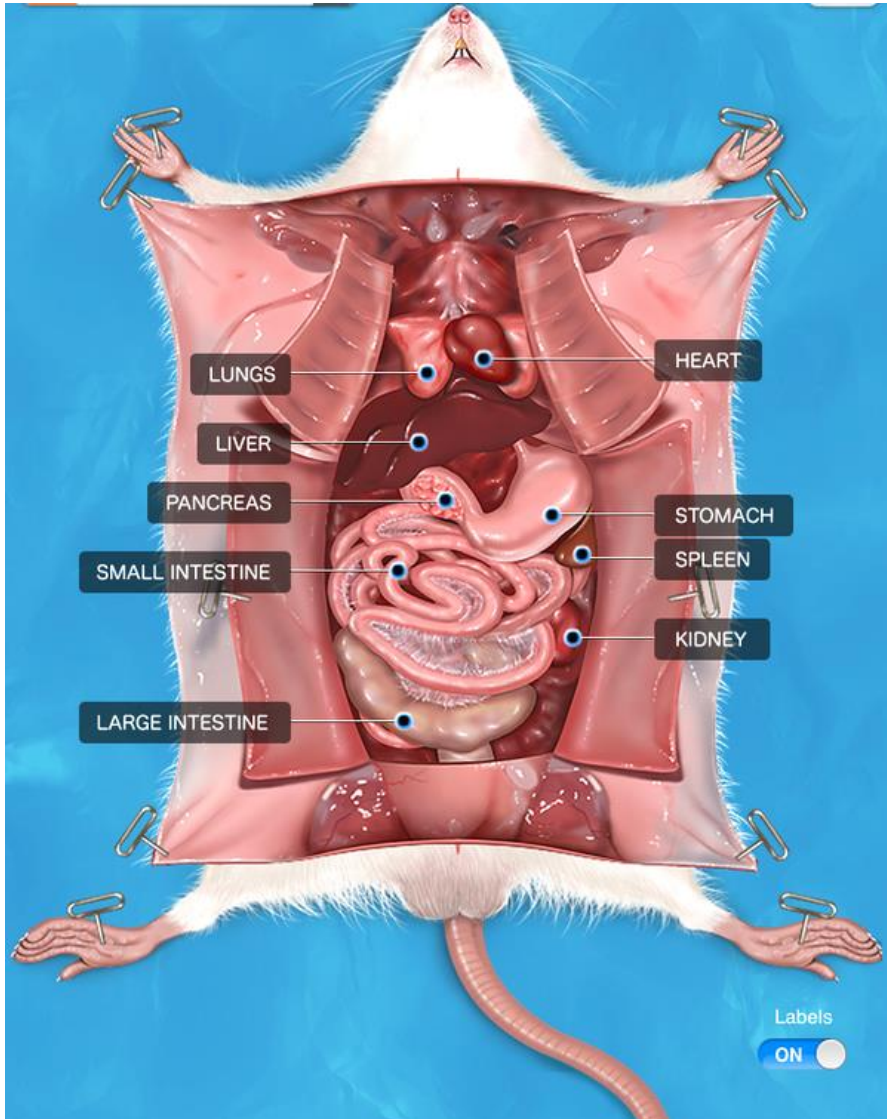


# Výroba monoklonálních protilátek

# Výroba monoklonálních protilátek



# Výroba monoklonálních protilátek



4. Po několika týdnech je z imunizované myši vyjmuta slezina

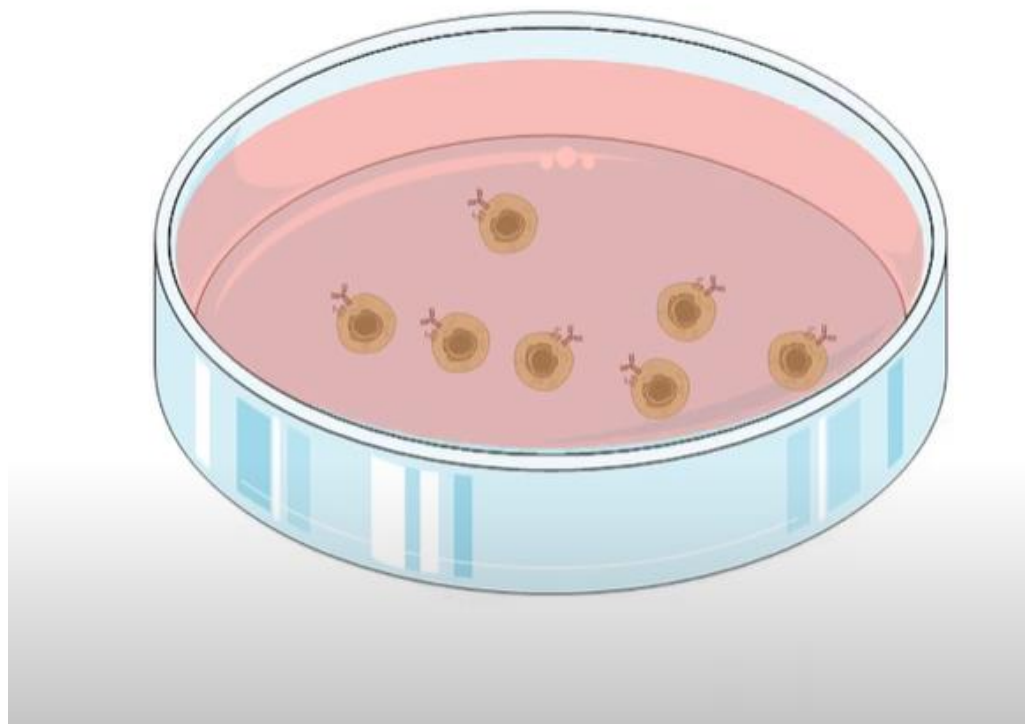
5. Izolace plazmatických buněk ze sleziny



# Problém

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

B cells survive for not more than a week!



# Výroba monoklonálních protilátek

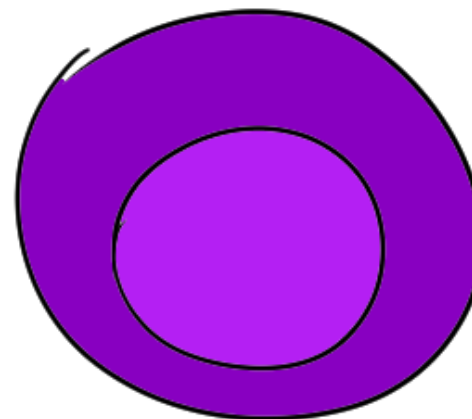
- 1975 – Kohler a Milstein – fúze s myšími myelomovými buňkami

Slezinná plazmatická  
buňka



- Produkuje Ag specifické protilátky
- Velmi krátká životnost

Myelomová buňka

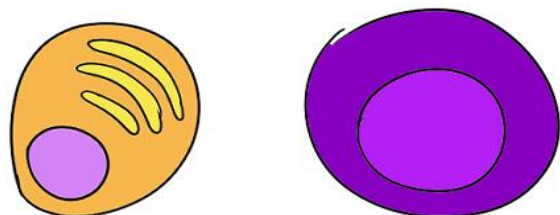


- Neprodukuje protilátky
- Je nesmrtelná

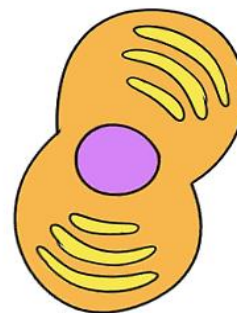
6.Fúze buněk polyethylenglykolem (PEG)

# Výroba monoklonálních protilátek

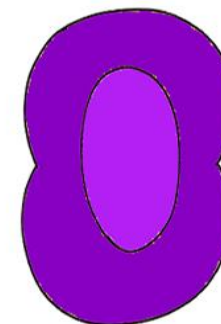
Nezfúzované B lymfocyty  
a myelomové buňky



Zfúzované  
B lymfocyty



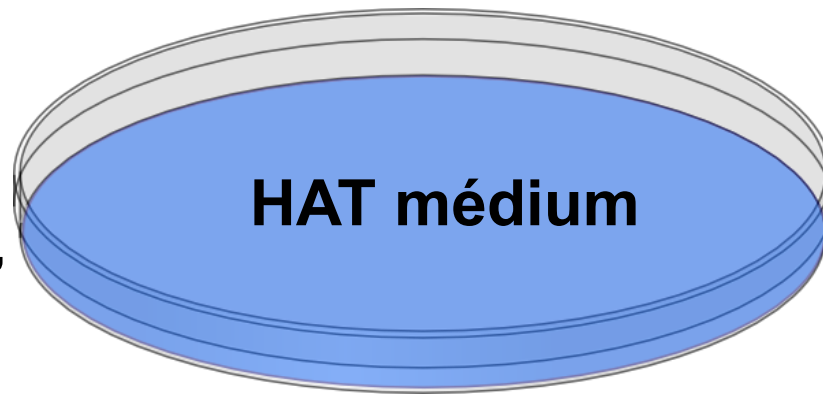
Zfúzované myelomové  
buňky



HYBRIDOM



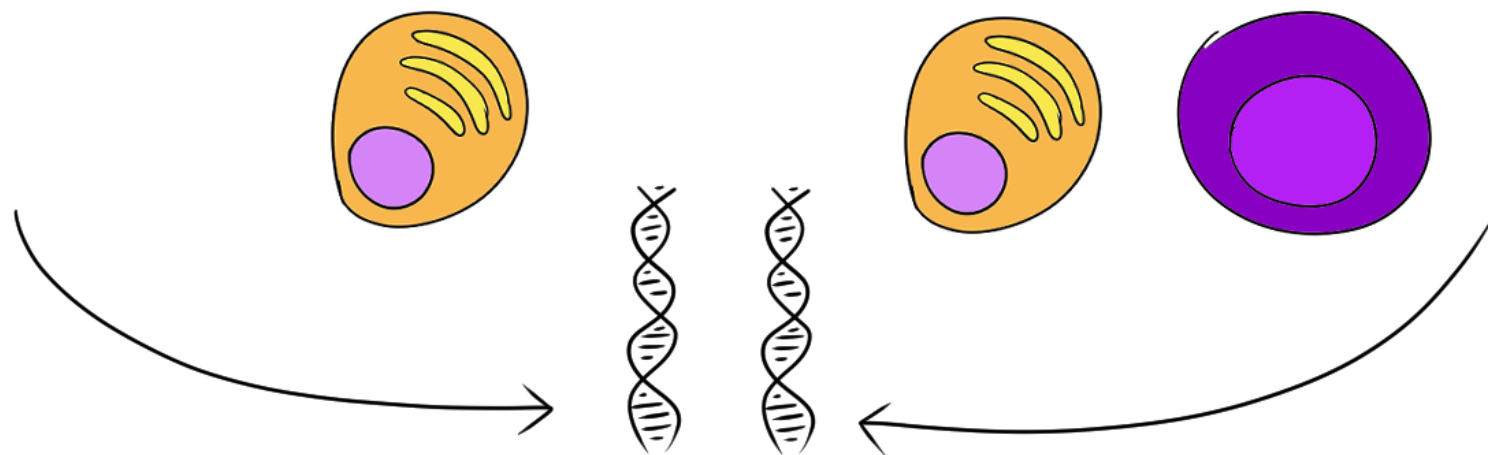
7. Buněčná směs je  
kultivována v selekčním  
**HAT médiu**  
(Hypoxantin, Aminopterin,  
Thymin)





# Selekce – enzymatický blok

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

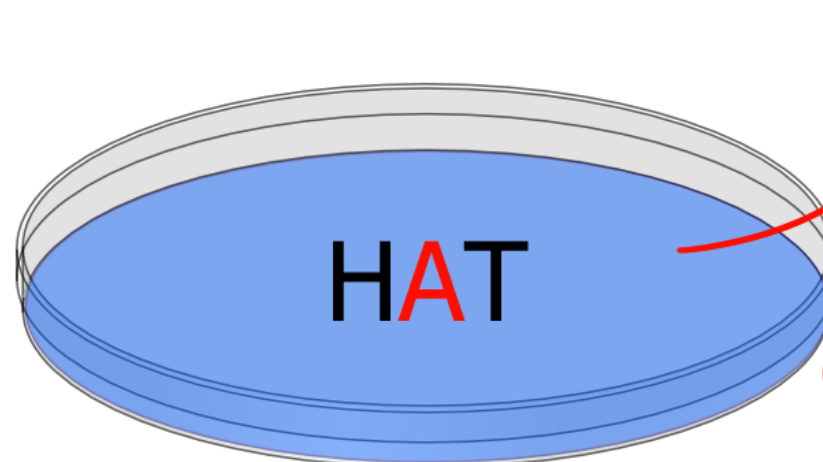


Myelomové buňky  
syntetizují DNA  
pouze pomocí  
alternativní dráhy

Záchranná dráha  
enzym HGPRT

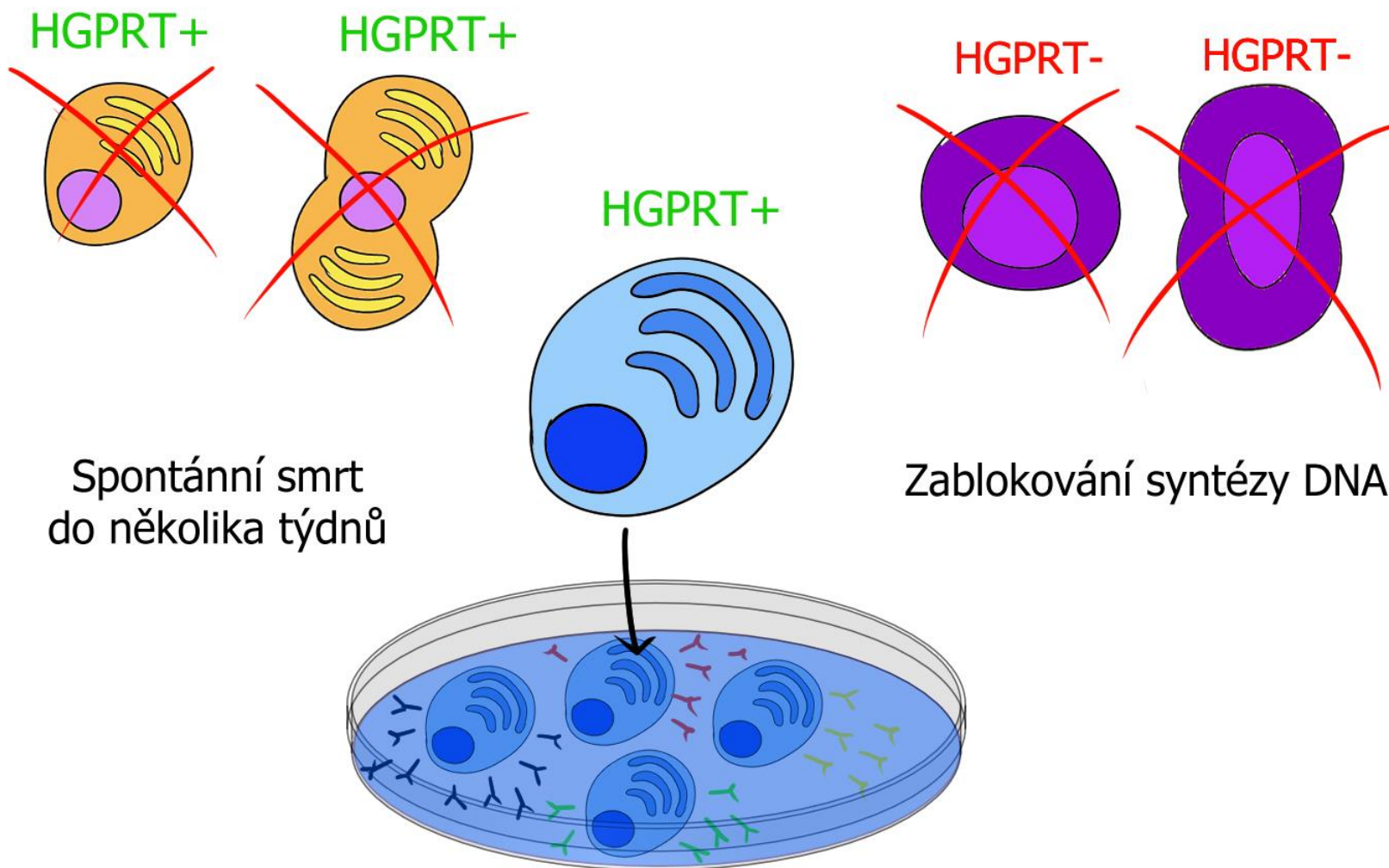
Alternativní dráha  
enzym dihydrofolátreduktáza

HGPRT = Hypoxantin Guanin  
FosfoRibosyl Transferáza



**Aminopterin  
blokuje  
dihydrofolátreduktázu**

# Selekce – enzymatický blok



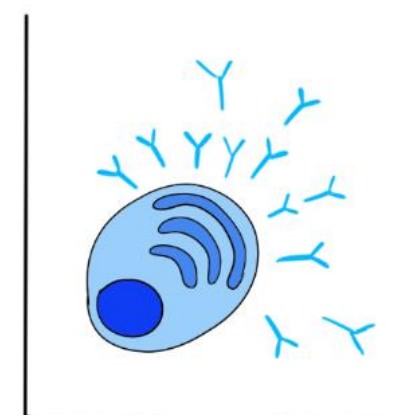
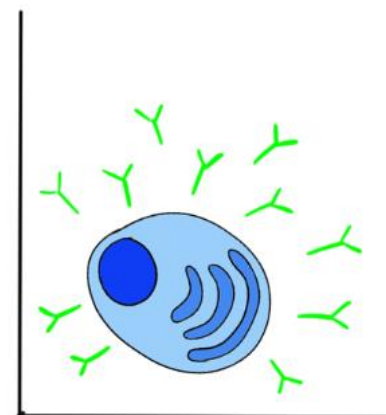
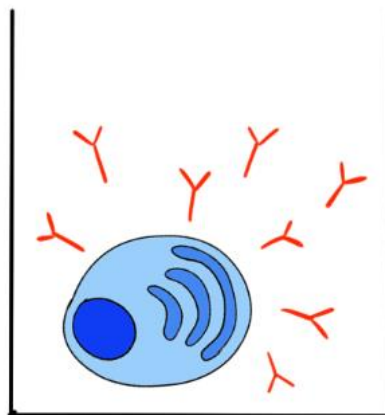
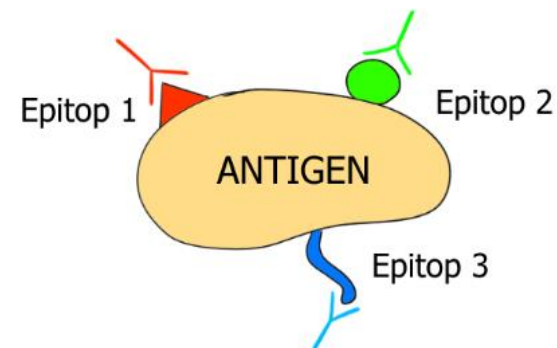
Spontánní smrt  
do několika týdnů

Zablokování syntézy DNA

# Výroba monoklonálních protilátek

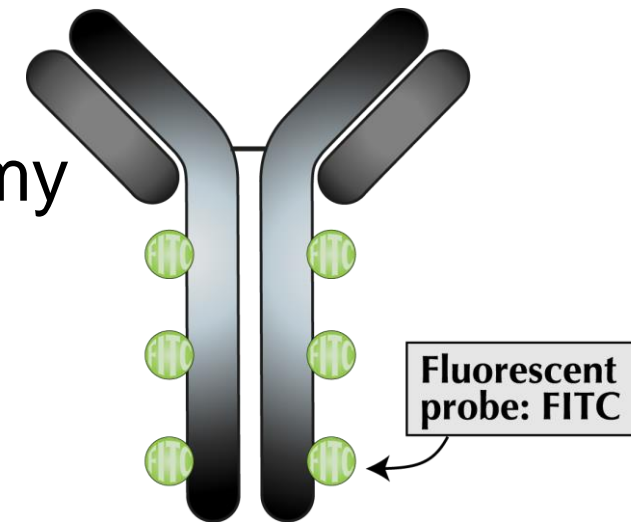
8. Hybridomy jsou rozděleny do jednotlivých jamek
9. Dále se udržují pouze ty buňky, které produkují Ab proti požadovanému epitopu

10. Přečištění, kvantifikace, validace



# Využití monoklonálních protilátek

- Konjugace monoklonálních protilátek s fluorochromy
- Základní 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

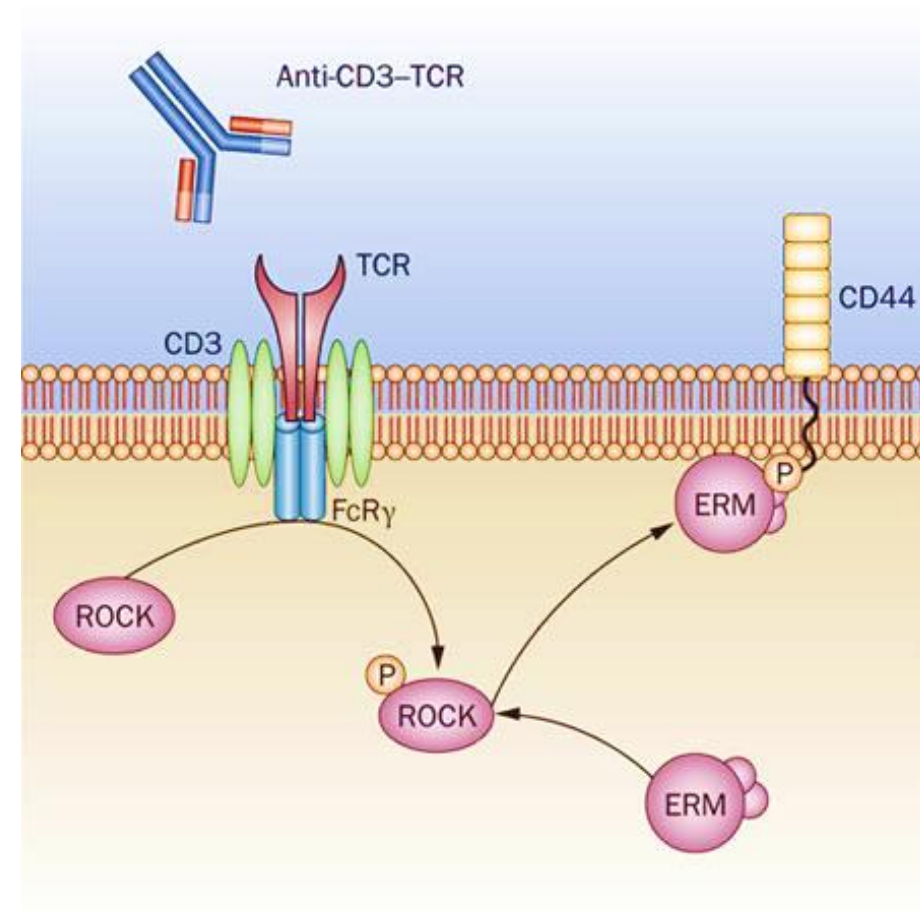
# Využití monoklonálních protilátek

Monoklonální protilátky neznačené jako stimulancia buněk:

Příklad:

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

- Produkce cytokinů – INF- $\gamma$ , IL-2
- Proliferace

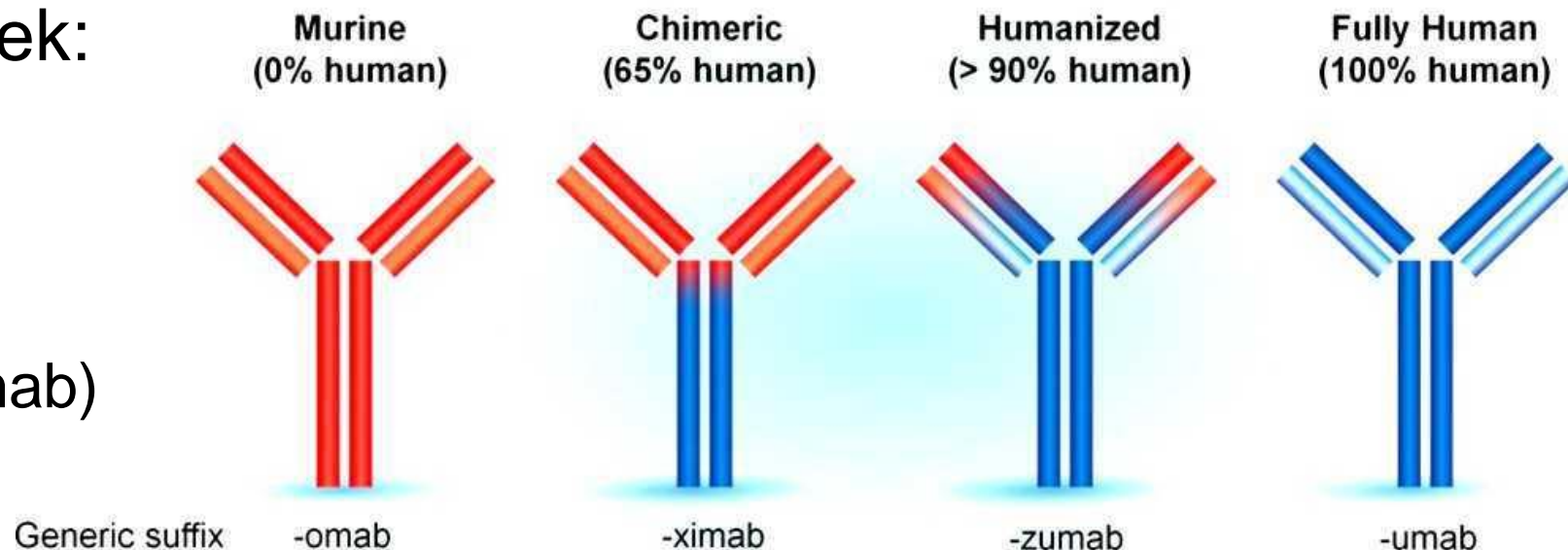


# Využití monoklonálních protilátek

- Monoklonální protilátky jako léčiva: BIOLOGICKÁ LÉČBA

- Různé druhy protilátek:

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



High

Potential for immunogenicity

Low

# Využití monoklonálních protilátek

- Imunosuprese
  - Anti CD20 (Rituximab): B lymfocytární malignity
- Blokáda prozánětlivých cytokinů
  - Anti TNF- $\alpha$  (Infliximab): léčba Crohnovy choroby, revmatoidní artritidy
- Blokáda adhezivních molekul
  - Anti CD11a (Efalizumab): léčba lupénky
- Protialergická léčba
  - Anti-IgE (Omalizumab): léčba těžkých forem astmatu





# 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 |