

Buňky imunitního systému

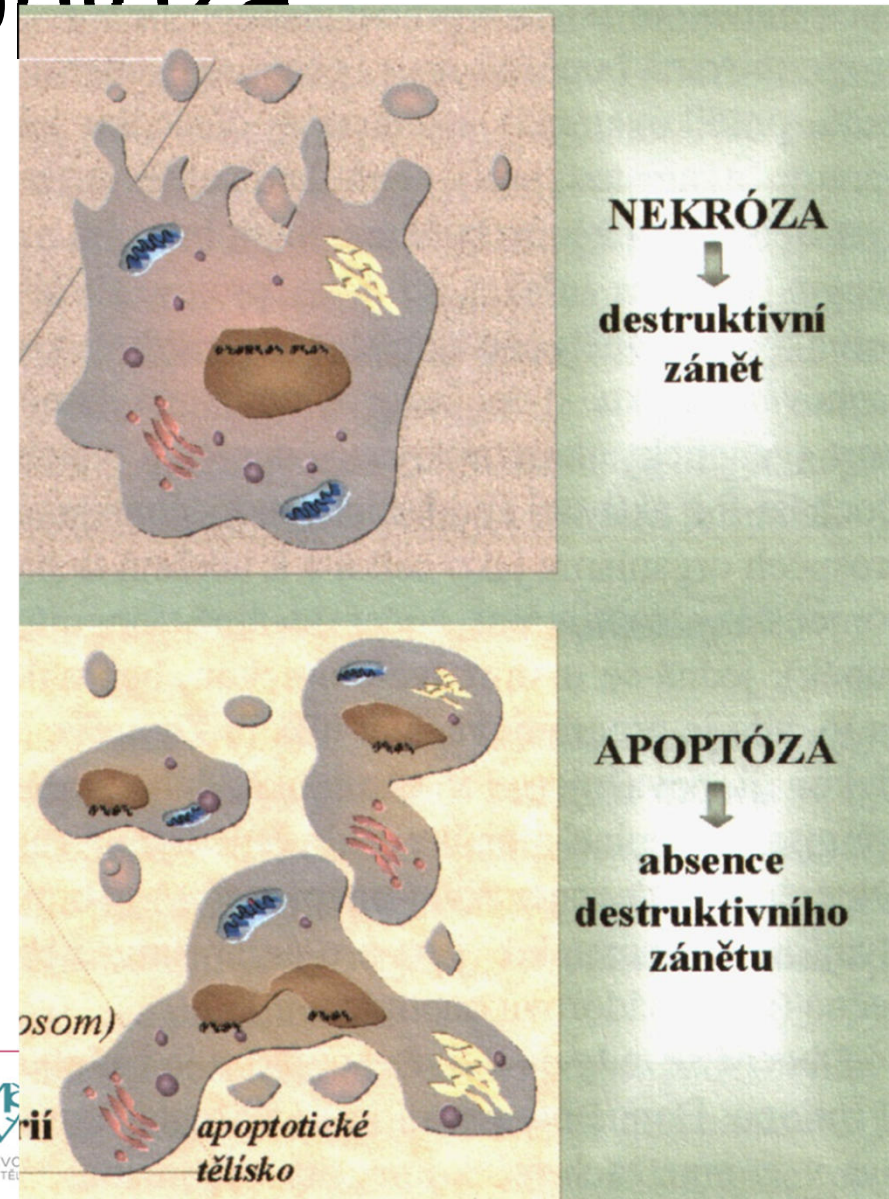
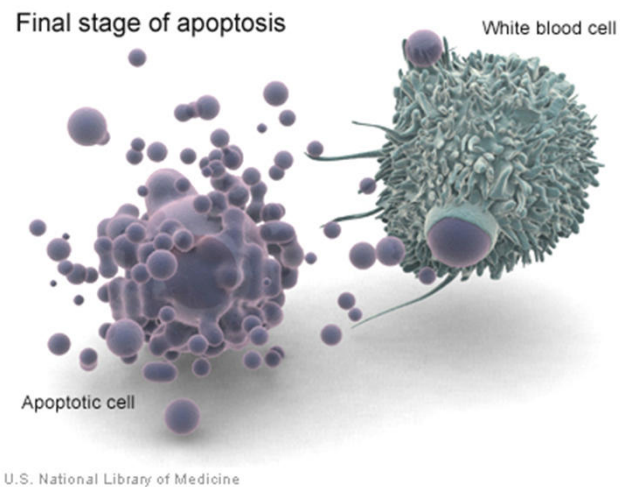
Úloha v organismu

Vznik bb v kostní dřeni

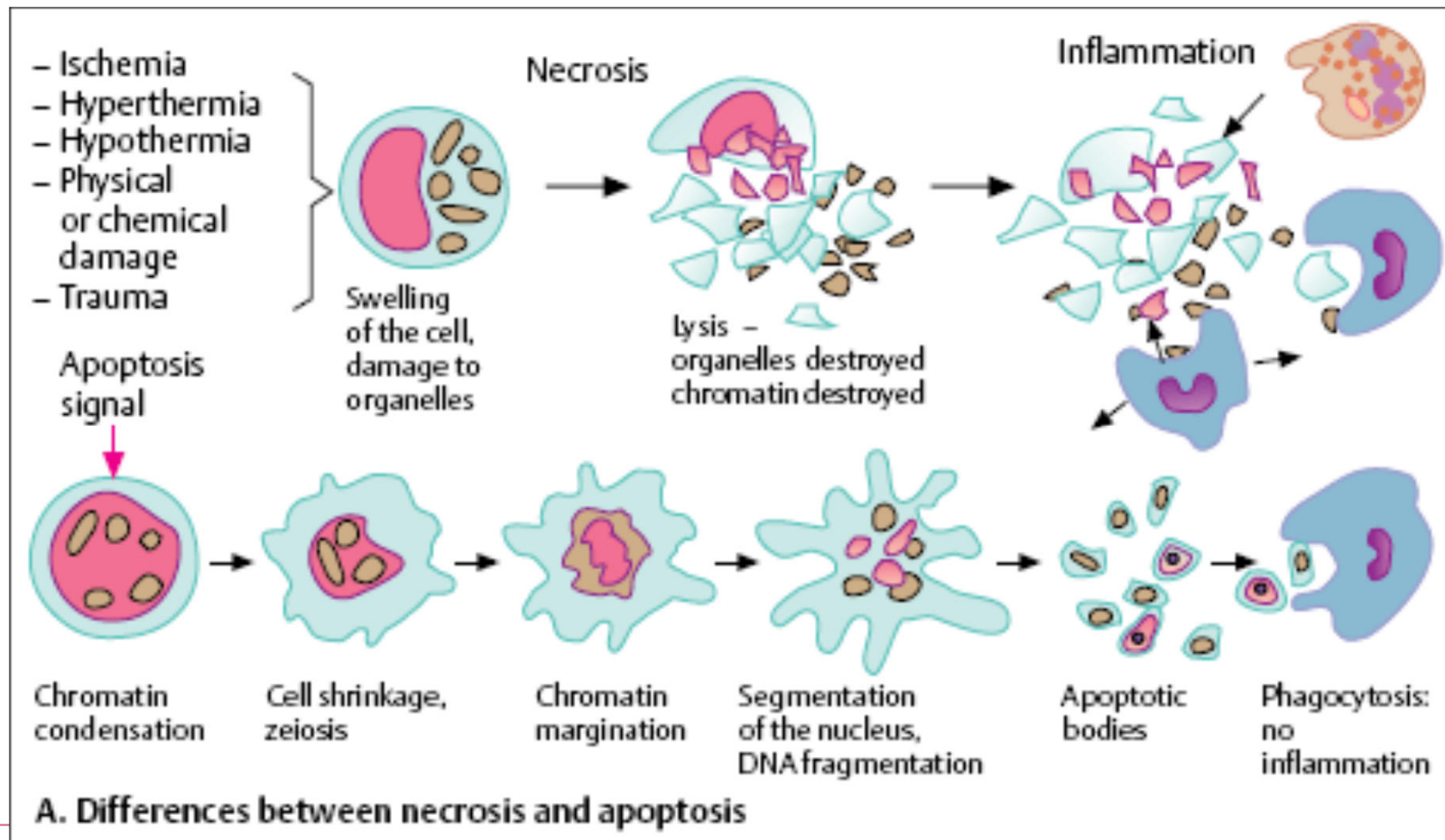
- bb mají na svém povrchu struktury, pomocí kterých se rozlišují:
 - **CD znaky**
- příklady:
 - kmenové bb KD **CD34, CD45**
 - Myeloidní progenitor **CD13**
 - Lymfoidní progenitor **CD38**
- Laboratorní metoda pro průkaz: průtoková cytometrie



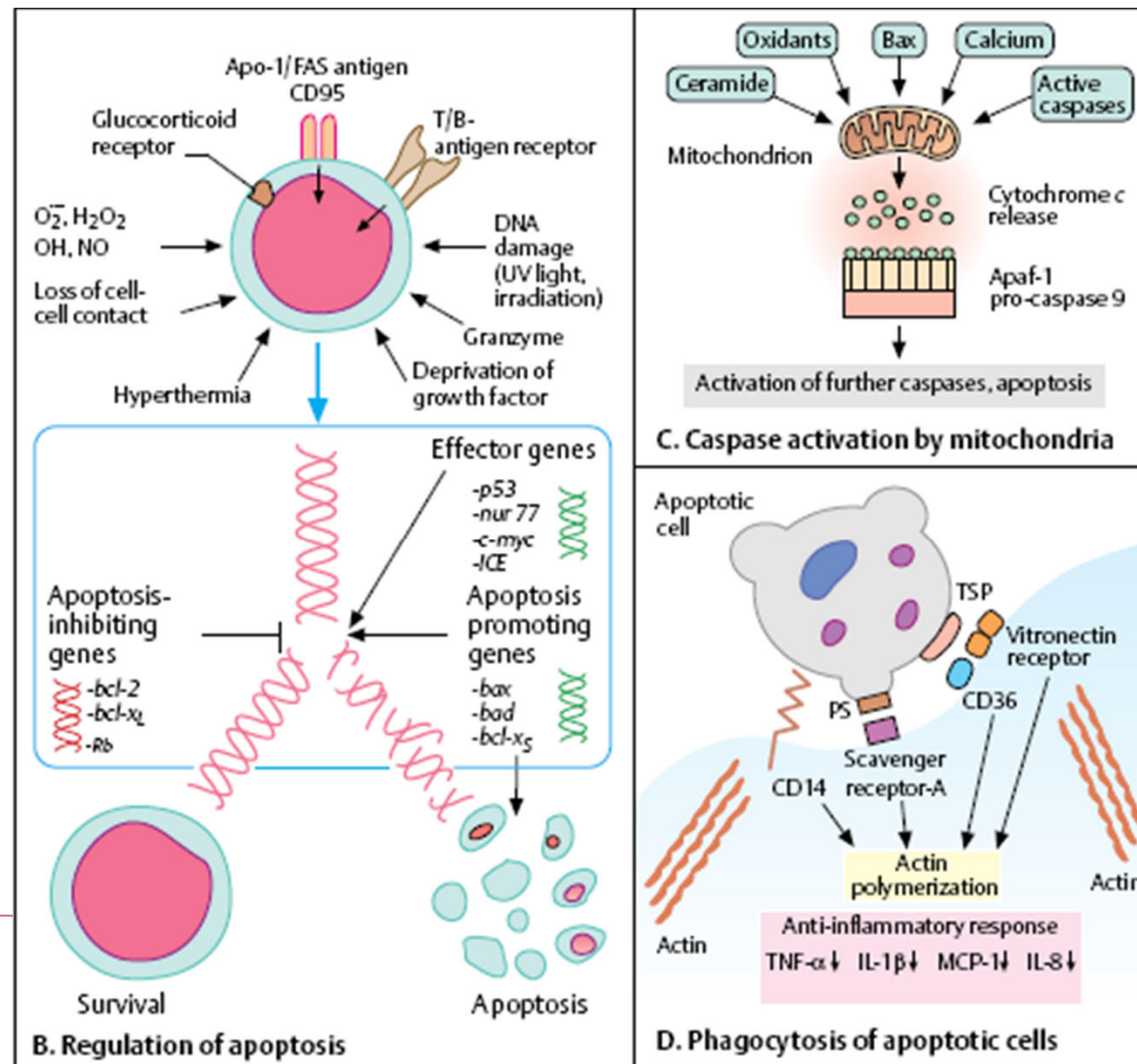
Apoptóza



Čím se liší nekróza od apoptózy?



Apoptóza - regulace



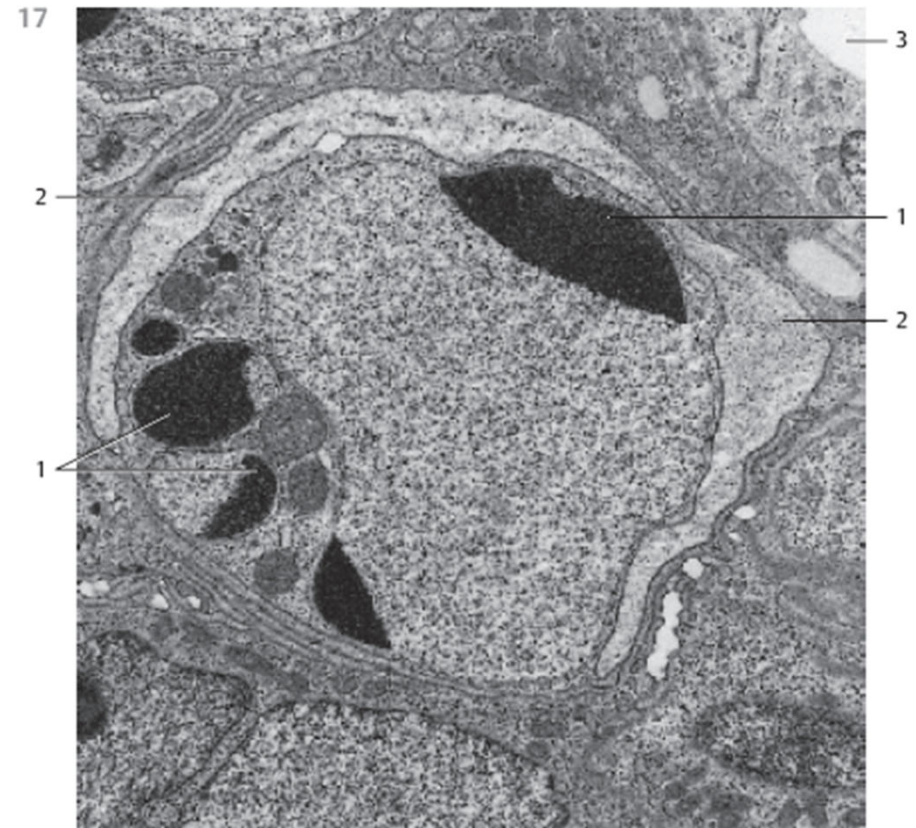
Rozpad apoptotické buňky

Apoptosis is a necrotic cell process. The cell triggers the process by activating the endogenous destruction program that leads to cell death ("suicide program of the cell"). Apoptosis plays an important part in the development of organs as well as the control and regulation of physiological regeneration. During apoptosis, the deoxyribonucleic acid of the cell nucleus is destroyed. In the process, the cell nucleus not only becomes small and condensed (*nuclear pyknosis*), but it also breaks into fragments (*extra nuclei, karyorrhexis*), which will finally completely dissolve (*karyolysis*).

Apoptosis in the cavum epithelium of the rabbit endometrium with chromatin bodies [1]. Cytoplasmic processes of a macrophage envelop part of the apoptotic cell like a horseshoe [2]. Uterine clearance [3].

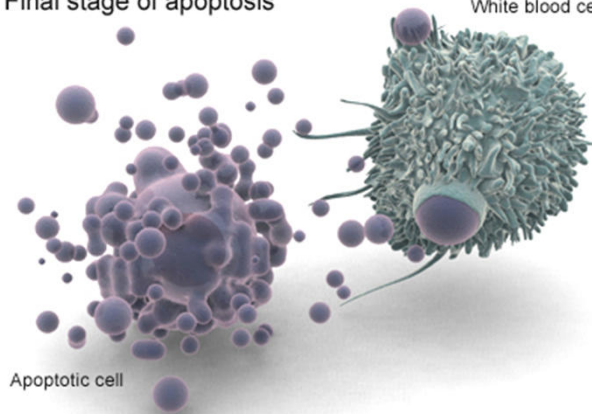
- 1 Chromatin bodies
- 2 Macrophage processes
- 3 Uterine clearance

Electron microscopy; magnification: $\times 10\,500$



Final stage of apoptosis

White blood cell



U.S. National Library of Medicine

Společnosti Speciální chemicko-biologické obory na Univerzitě Pardubice CZ.1.07/2.2.00/07.0139

Vyšetřování apoptózy

Metody detekce podle dějů v buňce

1. vystavení fosfatidylserinu – Annexin V

- Annexin V značený fluorochromem: váže specificky fosfatidylserin
- detekce: průtokový cytometr, fluorescence
- označení nekrotických buněk propidium iodidem (PI)

2. štěpení DNA – TUNEL

- detekce krátkých DNA pomocí terminální deoxyribonukleotidyltransferázy (TdT) a fluorescenčně značeného dUTP
- průtoková cytometrie

Vyšetřování apoptózy

3. Test hypodiploidie

Princip: velmi malé úseky DNA unikají z apoptotických tělísek

- detekce apoptotických buněk pomocí fluorescenčně značené DNA (PI)

Indikace k vyšetření

- není rutinním vyšetřením
- pouze vědecká pracoviště



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

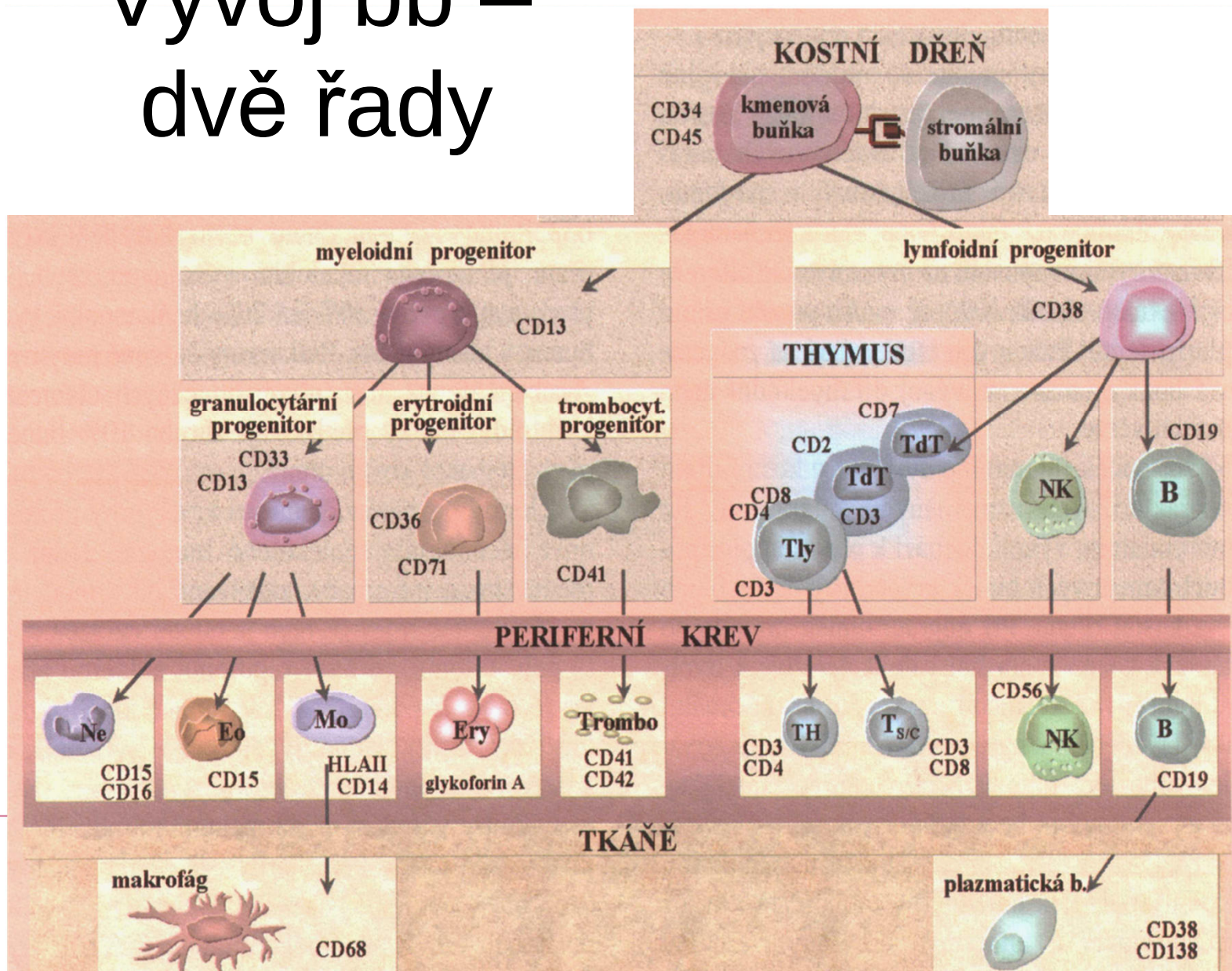


Univerzita
Pardubice

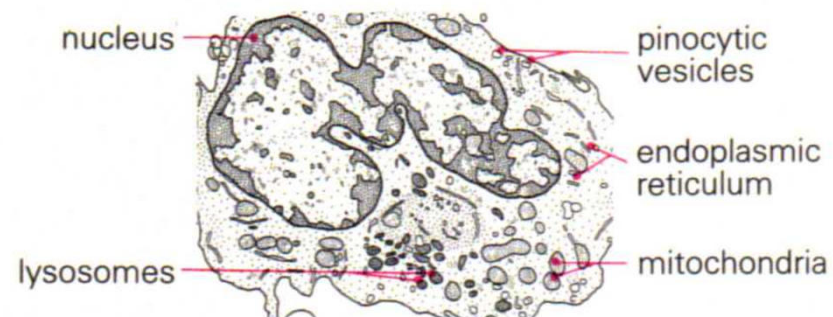
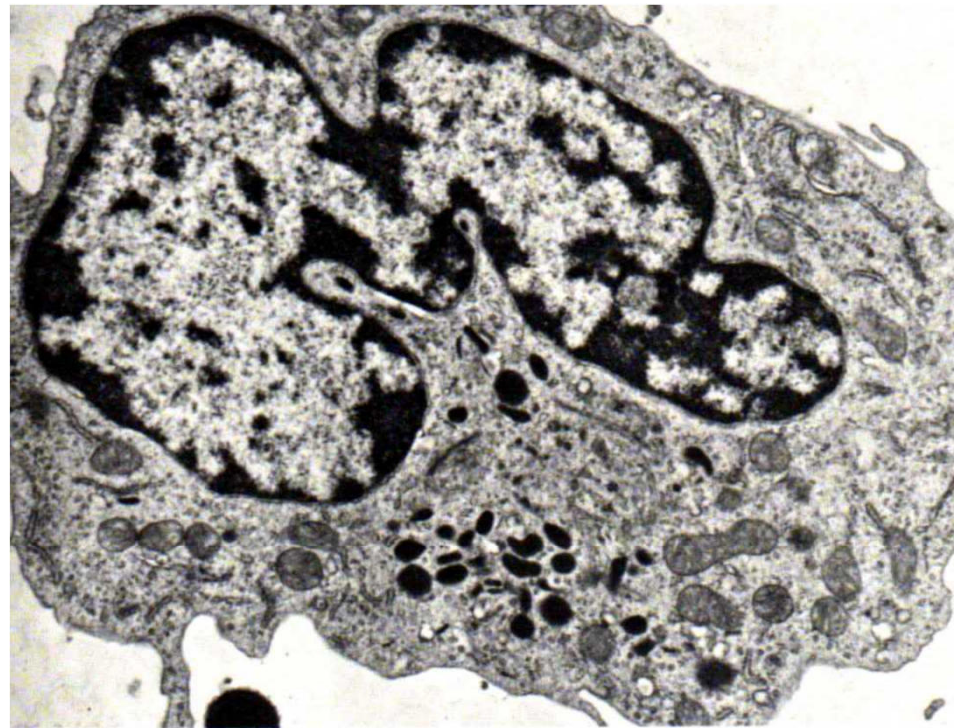
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Vývoj bb – dvě řady

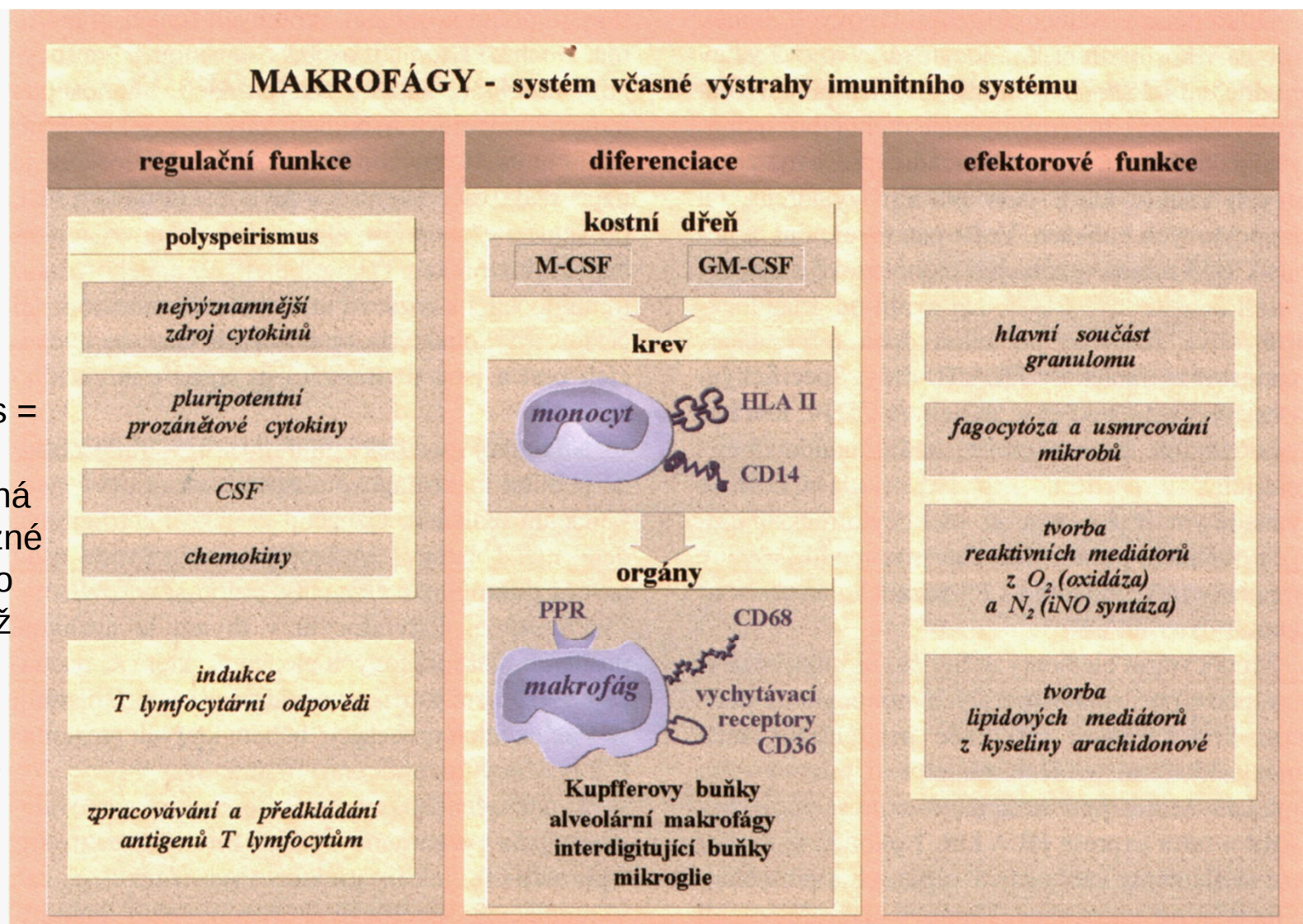


Monocyt

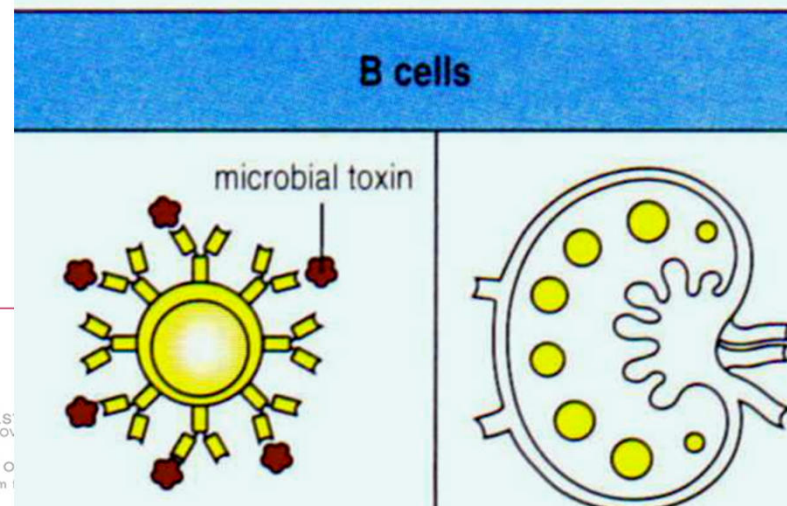
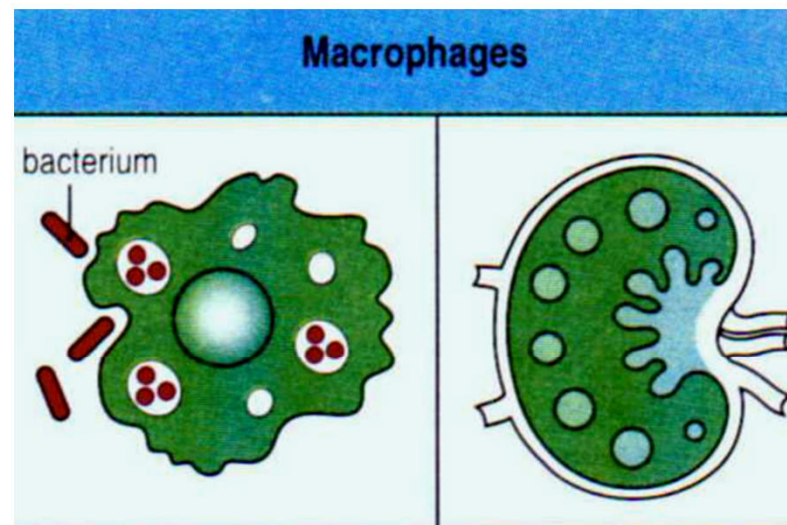
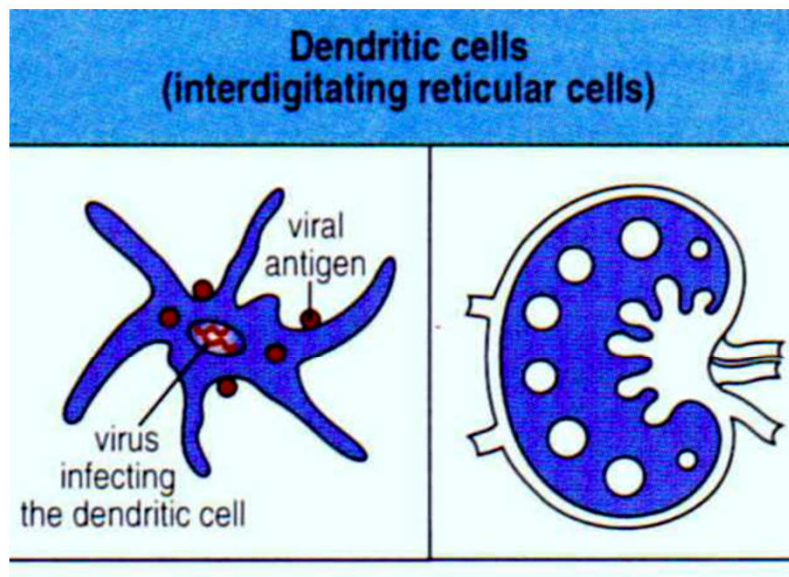


Monocyt a makrofág

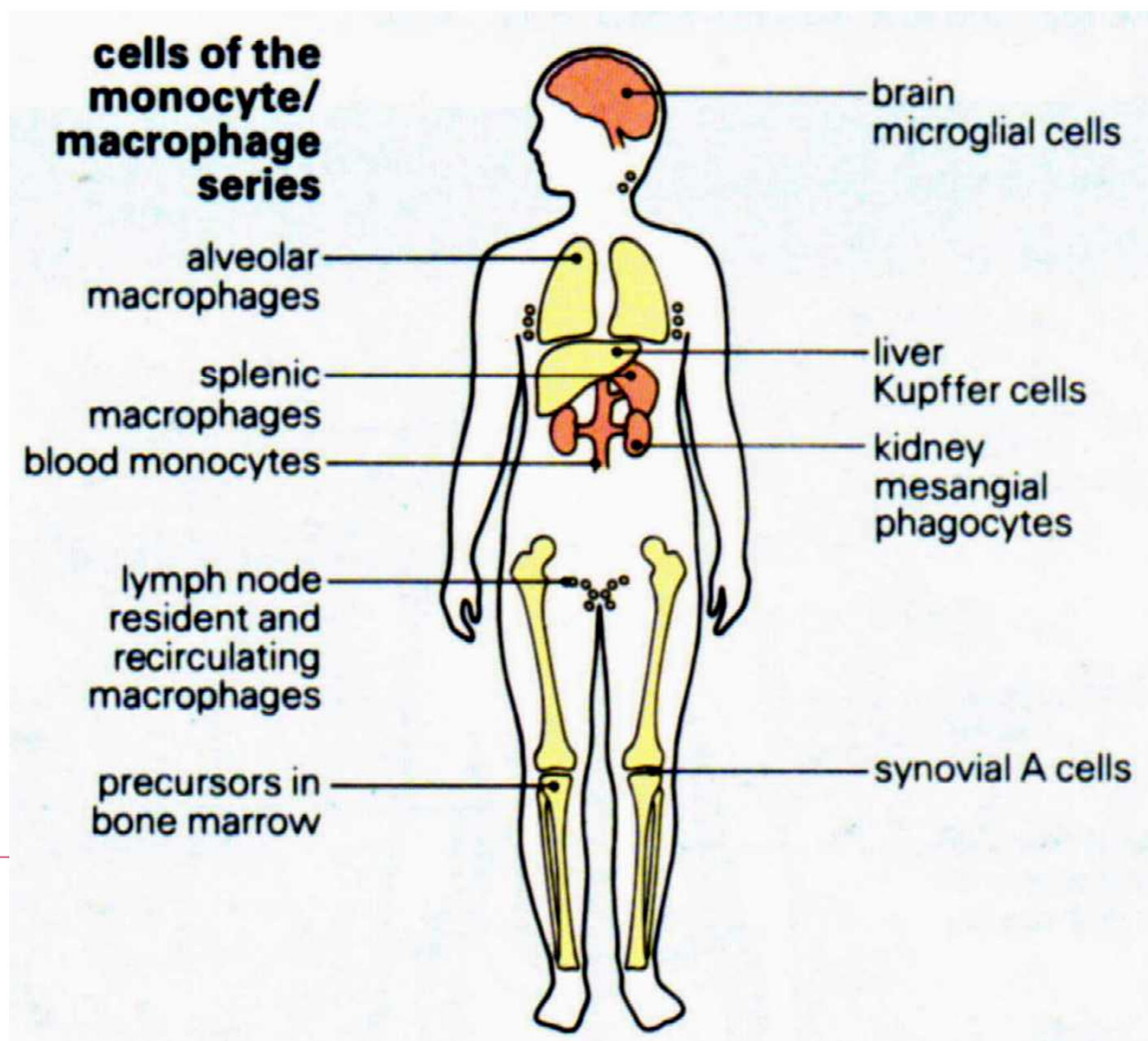
Polyspeirismus = jedna buňka je po aktivaci schopná produkovat různé chemokiny jako odpověď na týž podnět



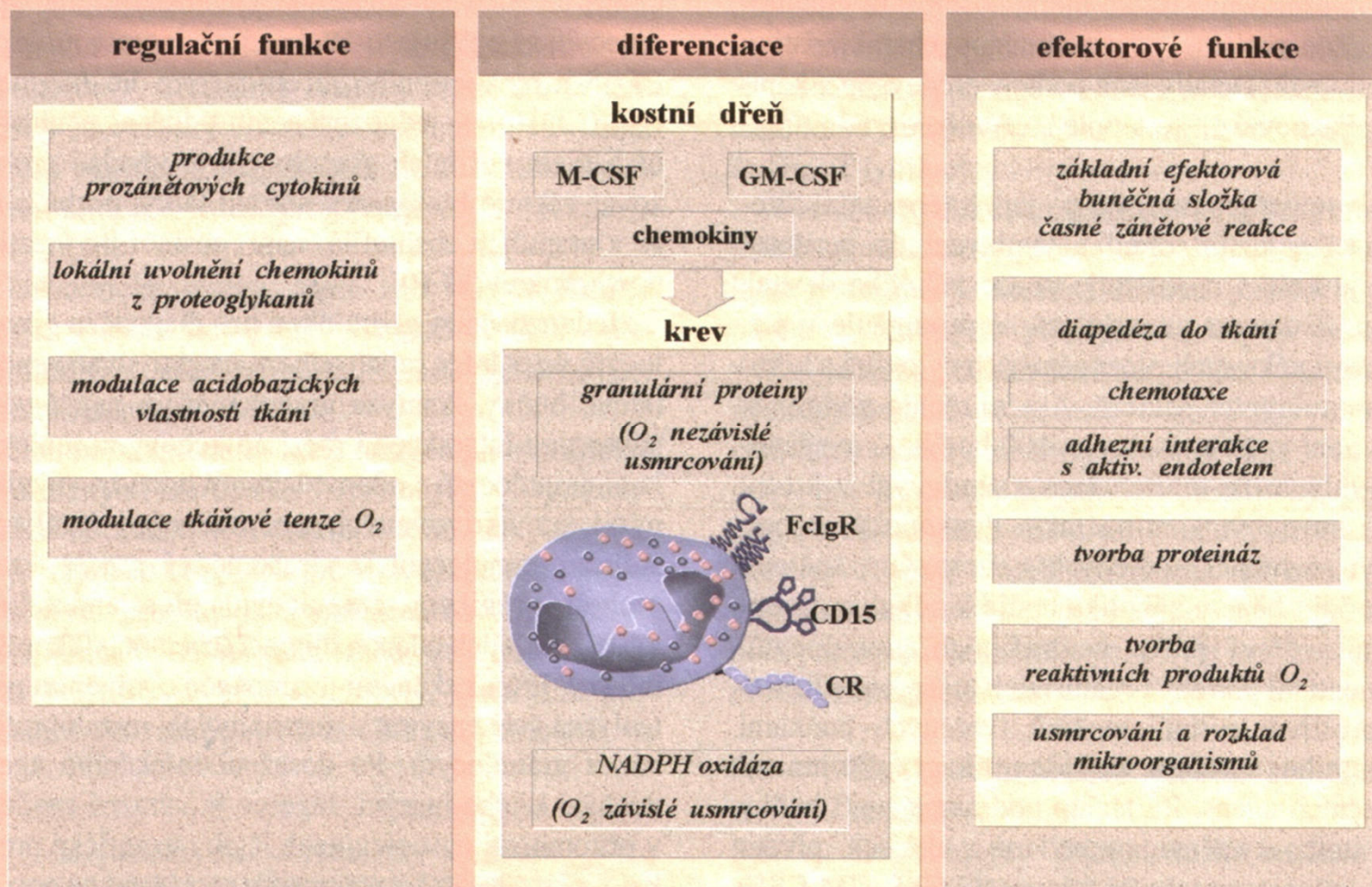
Osídlení lymfatických orgánů APC bb



Strategický rozptyl po celém organismu

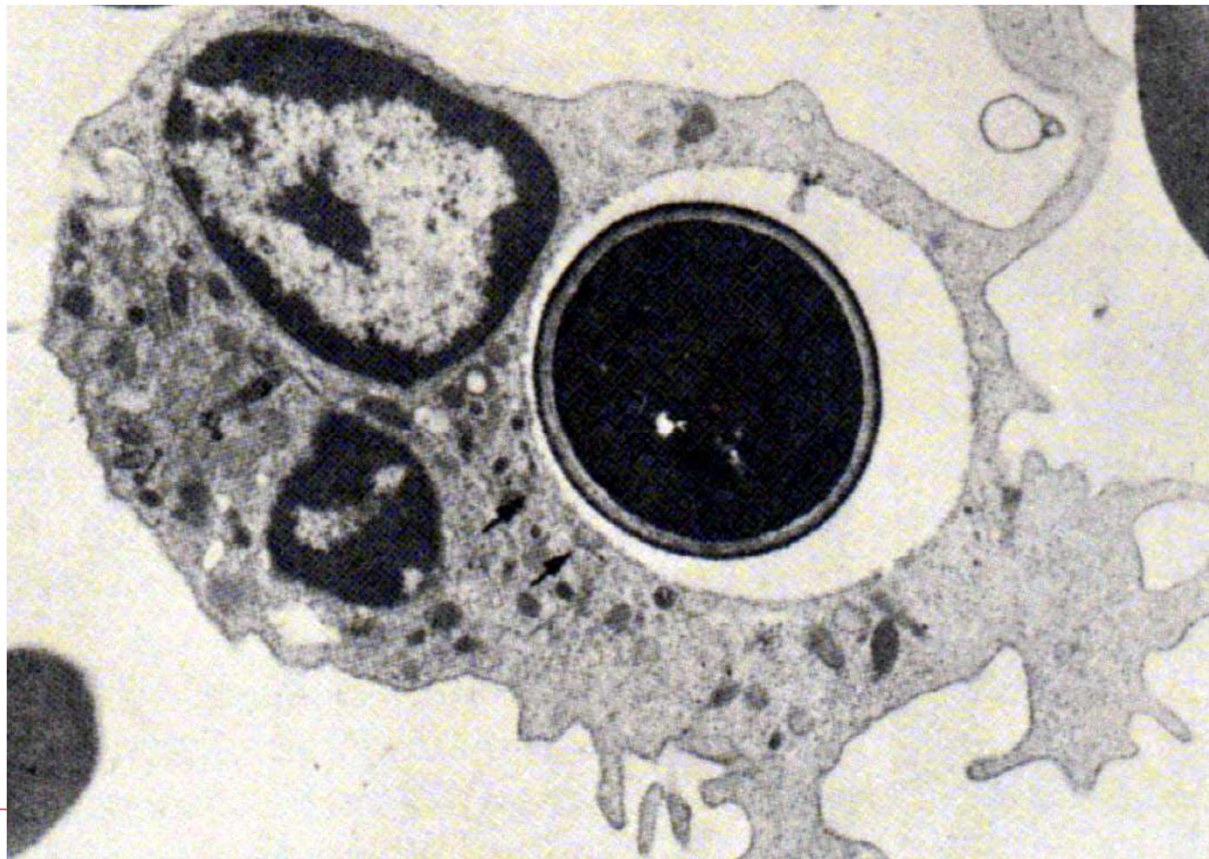


NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY – efektorová složka přirozené imunity

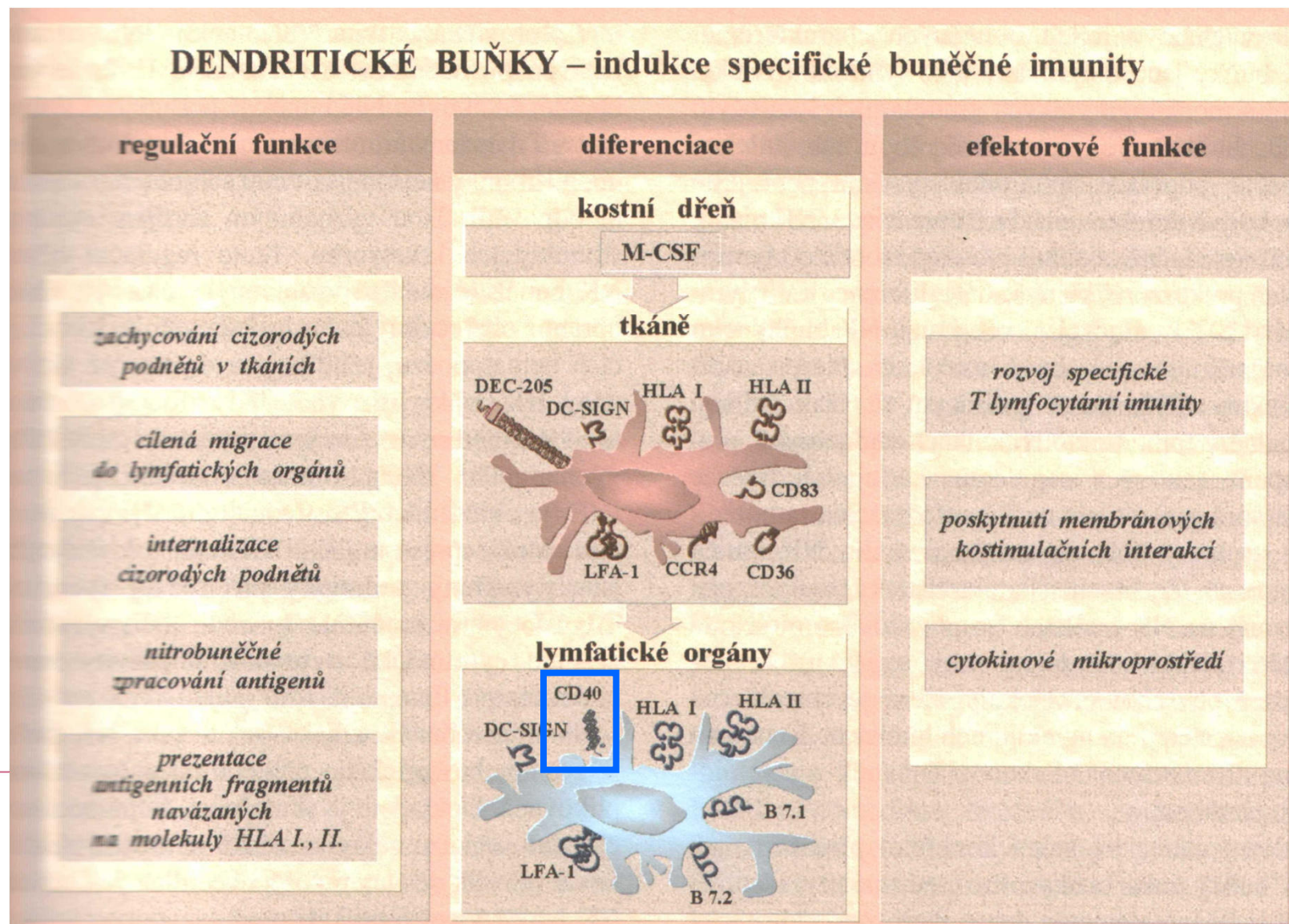


Obr. 5.14: Neutrofilní granulocyty - základní charakteristika

Granulocyt pohltil *Candida albicans*



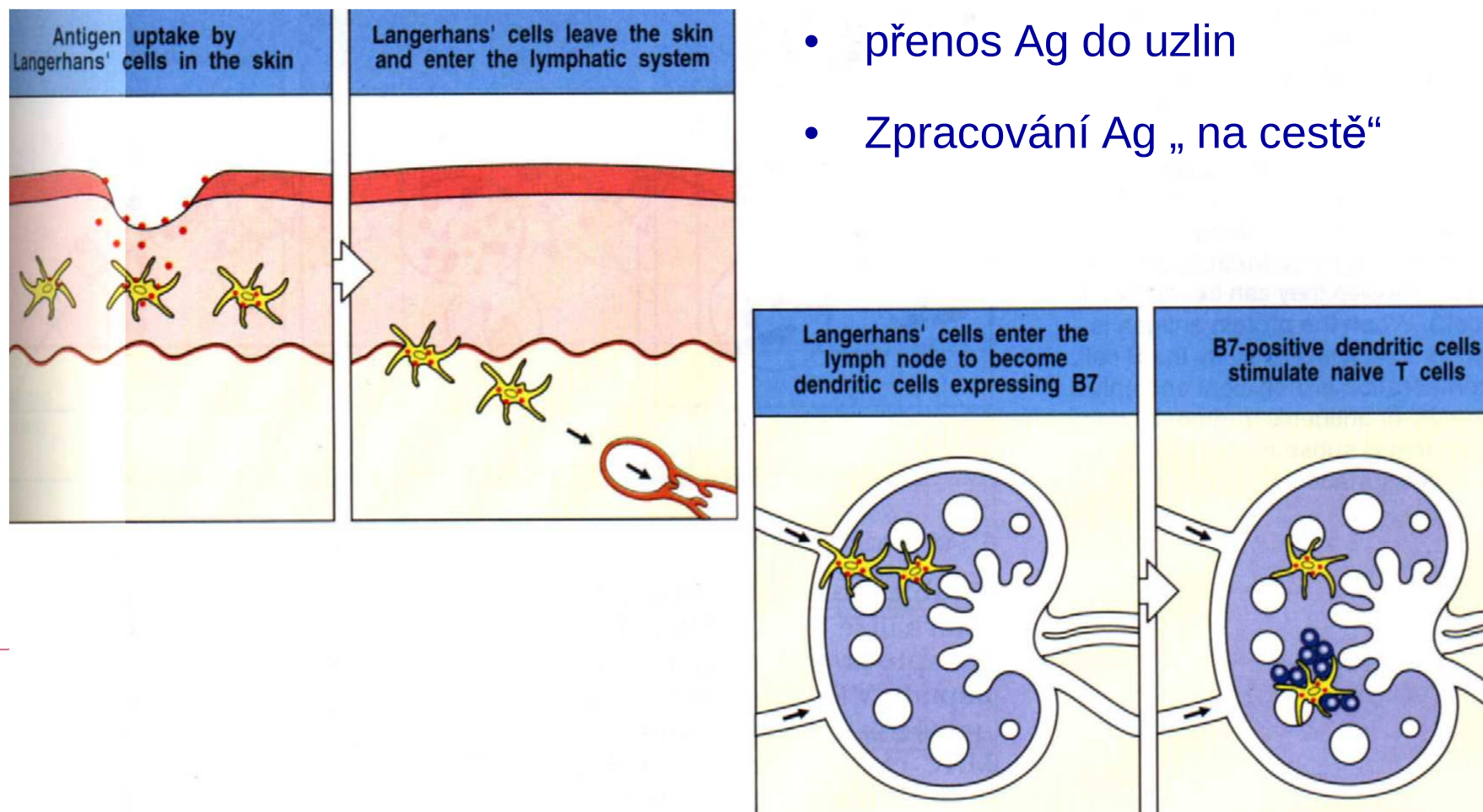
Znaky dendritických bb



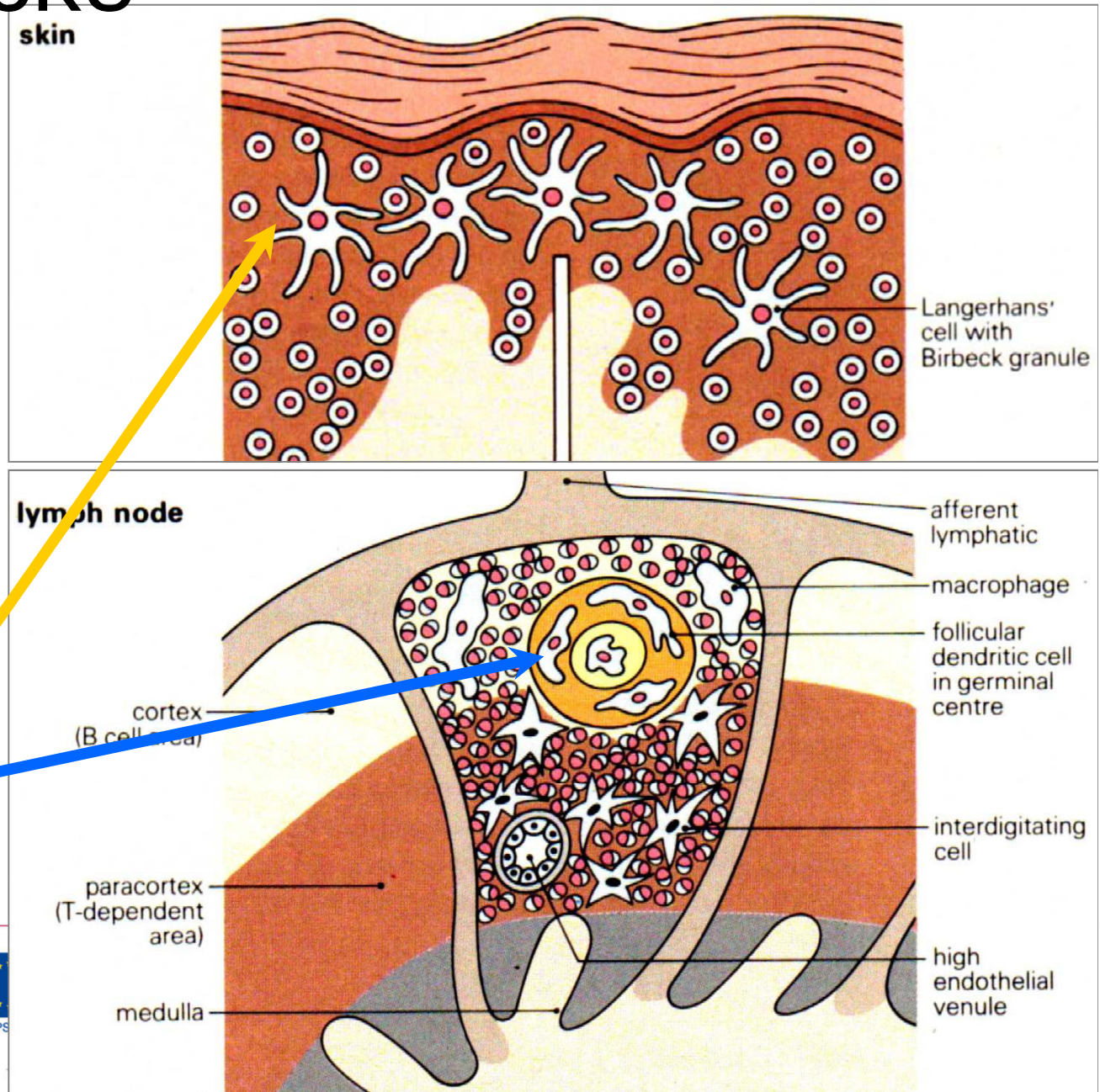
Dendritické bb v kůži: Langerhansovy bb

Úloha:

- přenos Ag do uzlin
- Zpracování Ag „na cestě“

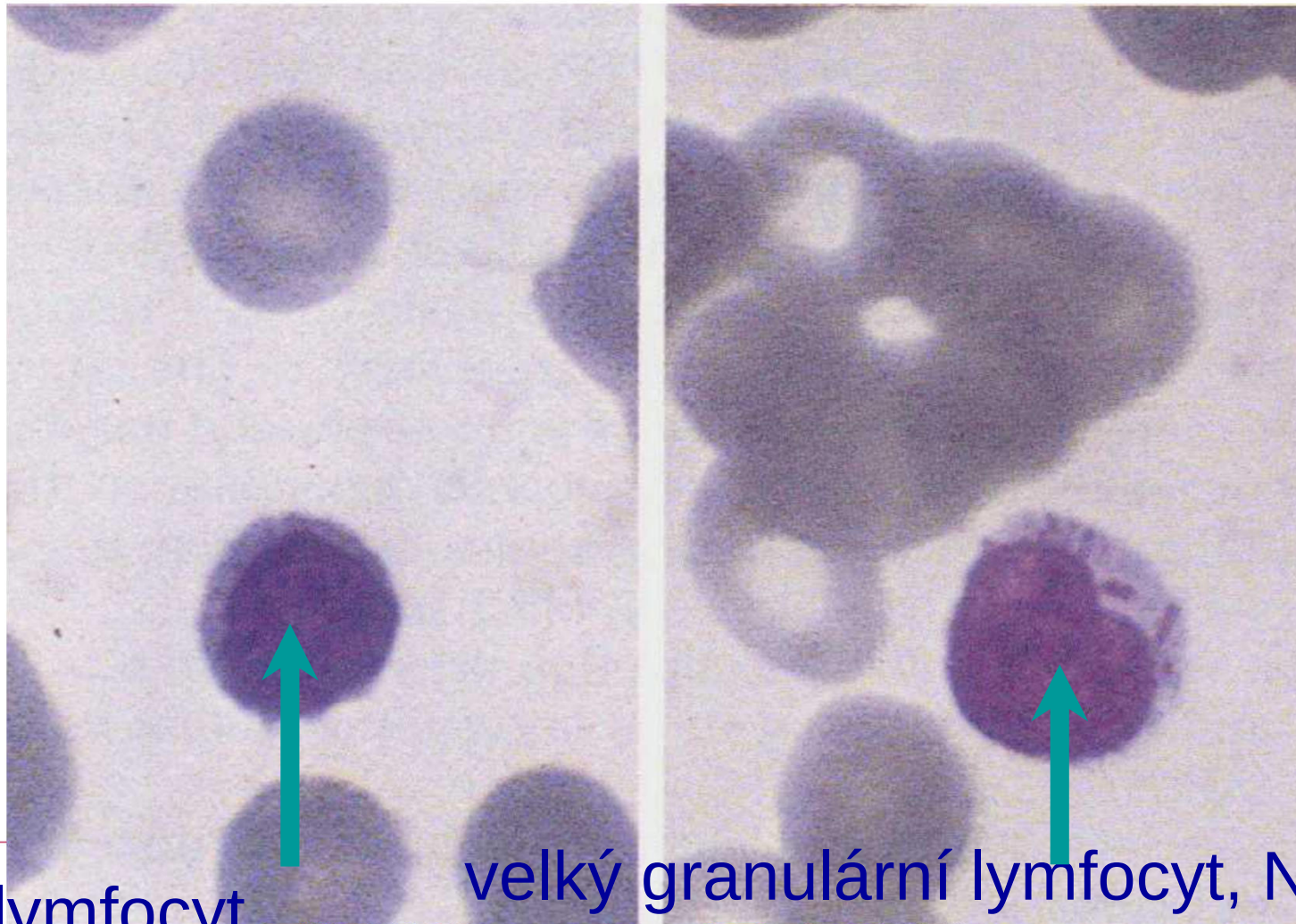


Dendritické bb



Langerhansovy bb.
Folikulární
dendritické bb.

lymfoidní řada



lymfocyt

velký granulární lymfocyt, NK bb

EVROPSKÁ UNIE

ESI

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

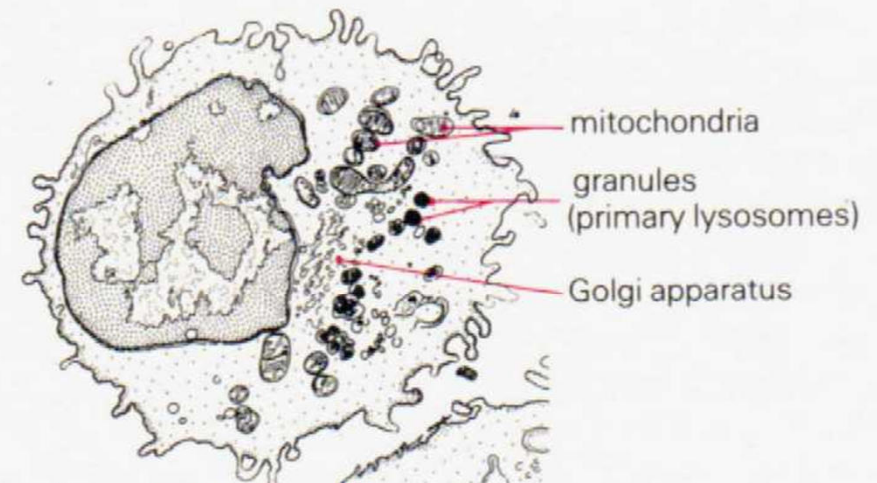


Pardubice

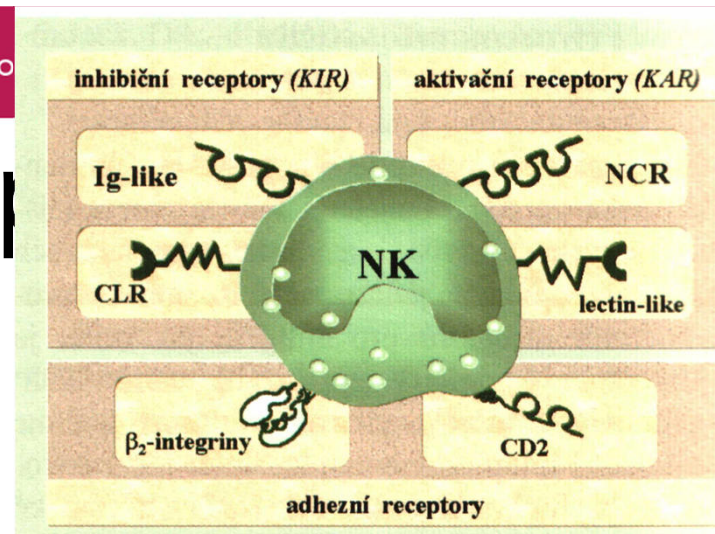
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

LGL – large granular lymphocyte



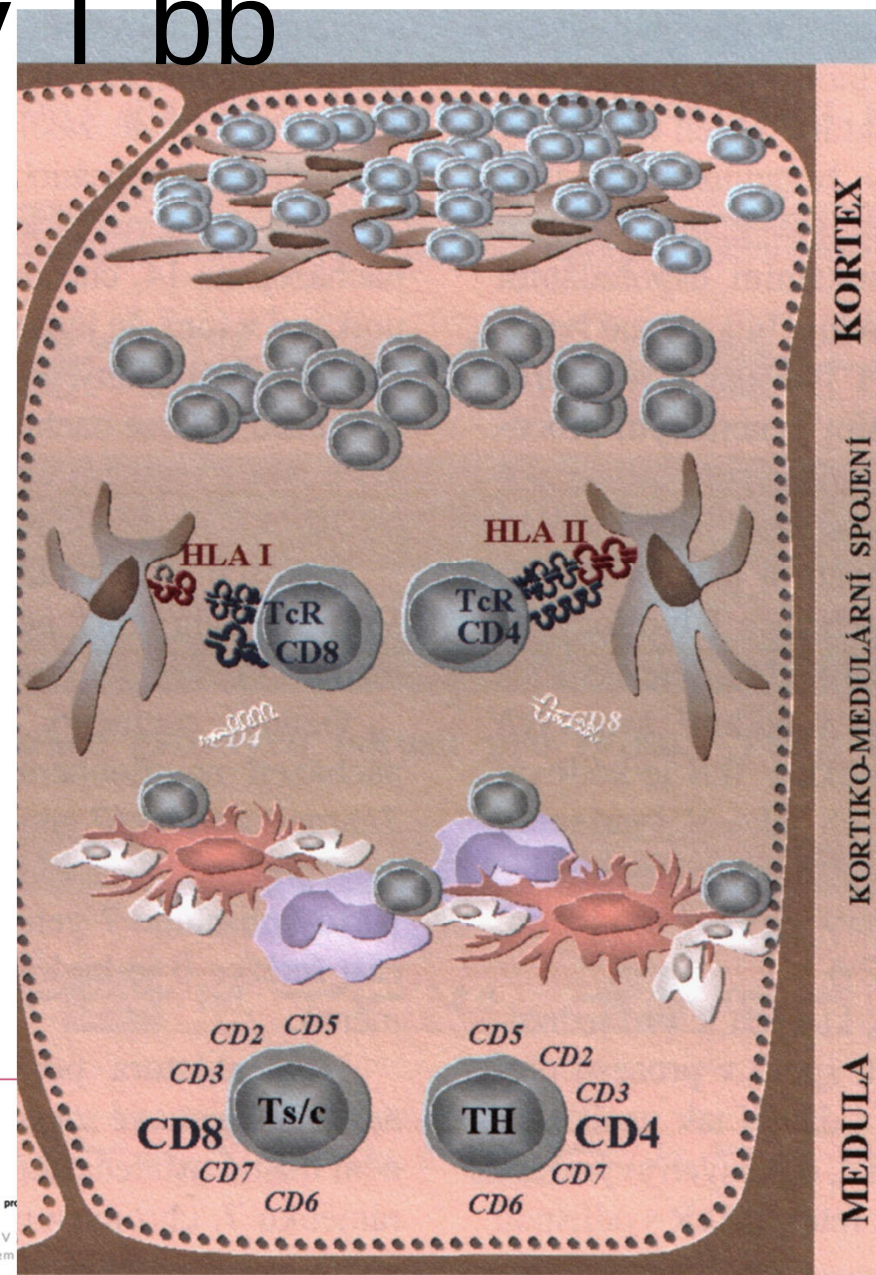
Adhezní recept



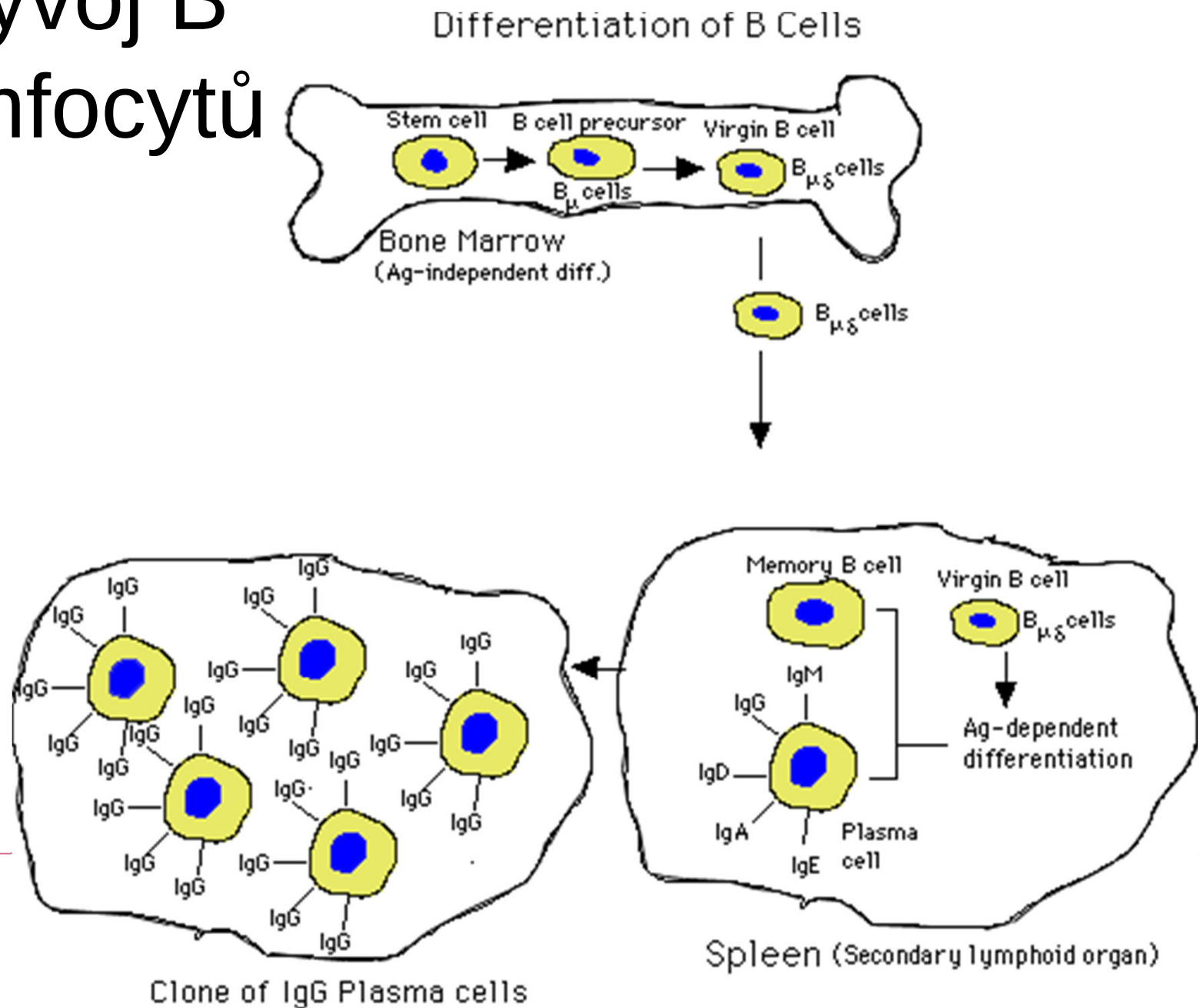
Označení receptoru	Signál na NK	Rodiny molekul	Vazba s	Akce
Inhibiční KIR Killer inhibition receptor	Inhibice	- C-lektiny (CLR): CD94/NKG2 - Ig (Ig-like)	MHC gp I	inhibice NK
Stimulační KAR Killer activation receptor	Aktivace	- NCR (Ig): CD16 (FcR) - Lektiny: NKR-P1 (CD161)	- ITAM: (CD3, Fcε) - Ig	Degranulace NK, ADCC

Subsedy T bb

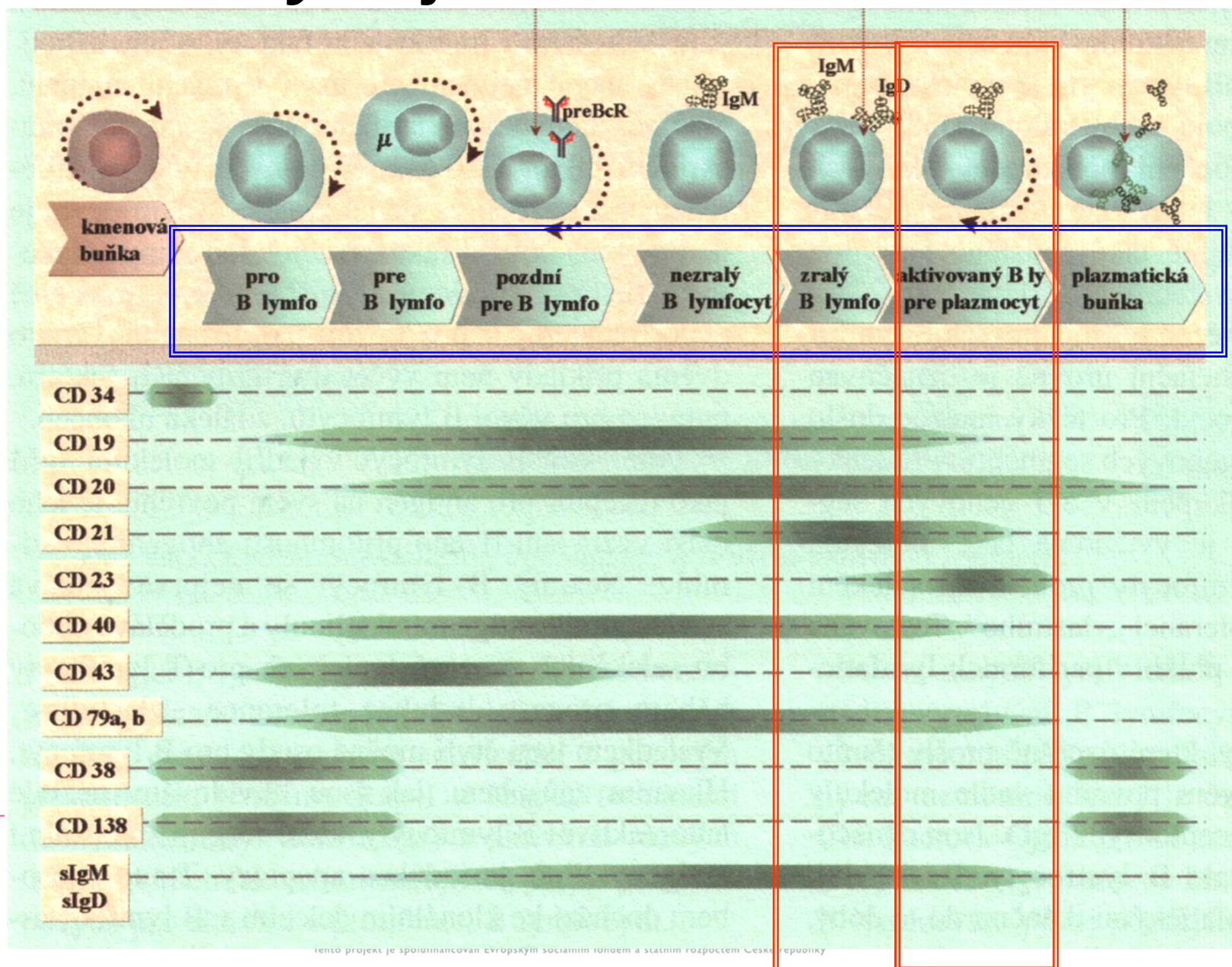
- Pomocné T_H
 - CD3, CD4
 - 30-55%
- Induktorové T_{S/c}
 - CD3, CD8
 - 15-35%
- Regulační T_{reg}
- liší se i ve funkci
 - T_H: pomocná
 - T_{S/c}: cytotoxická (T_S supresorová)
 - T_{reg}: regulační



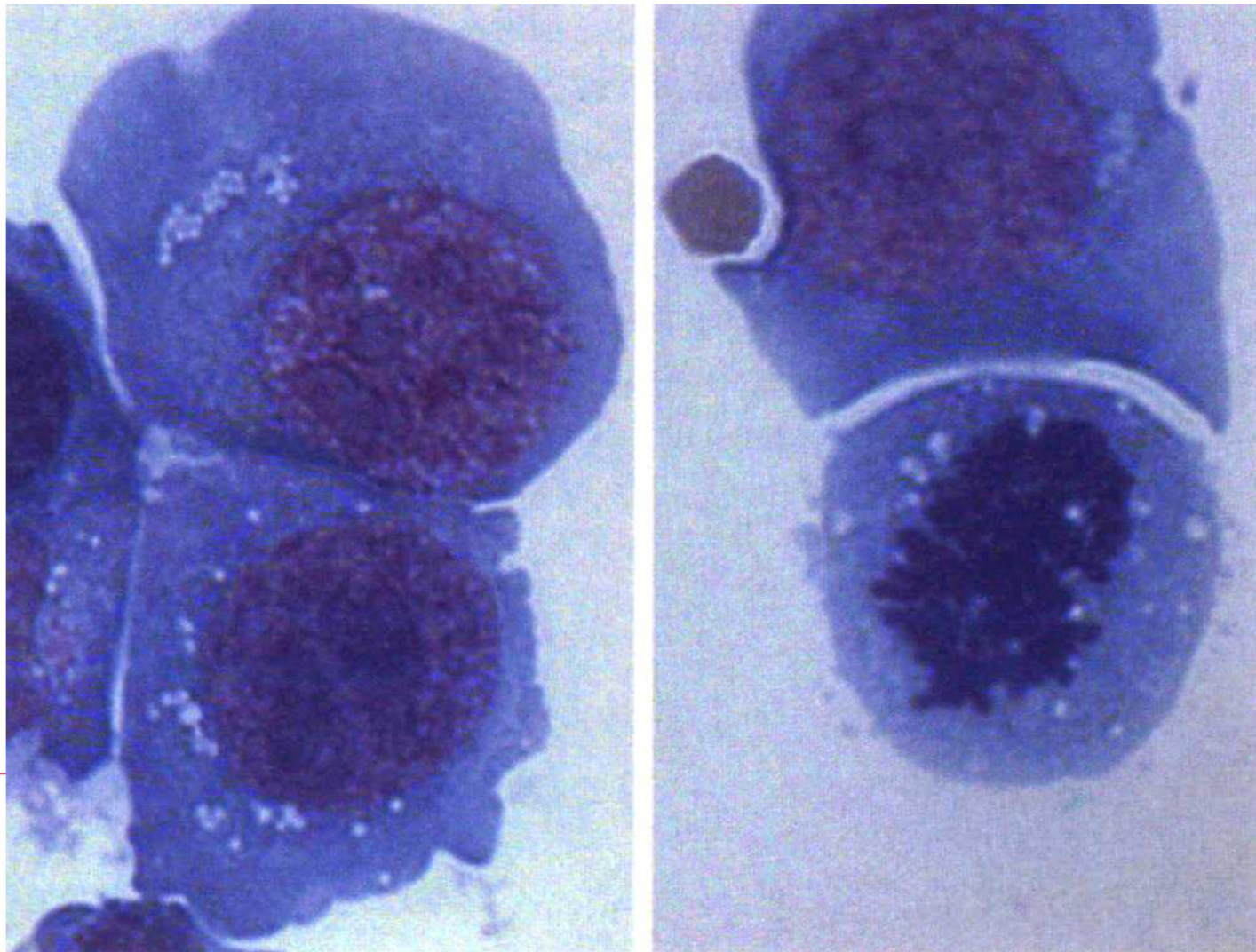
Vývoj B lymfocytů



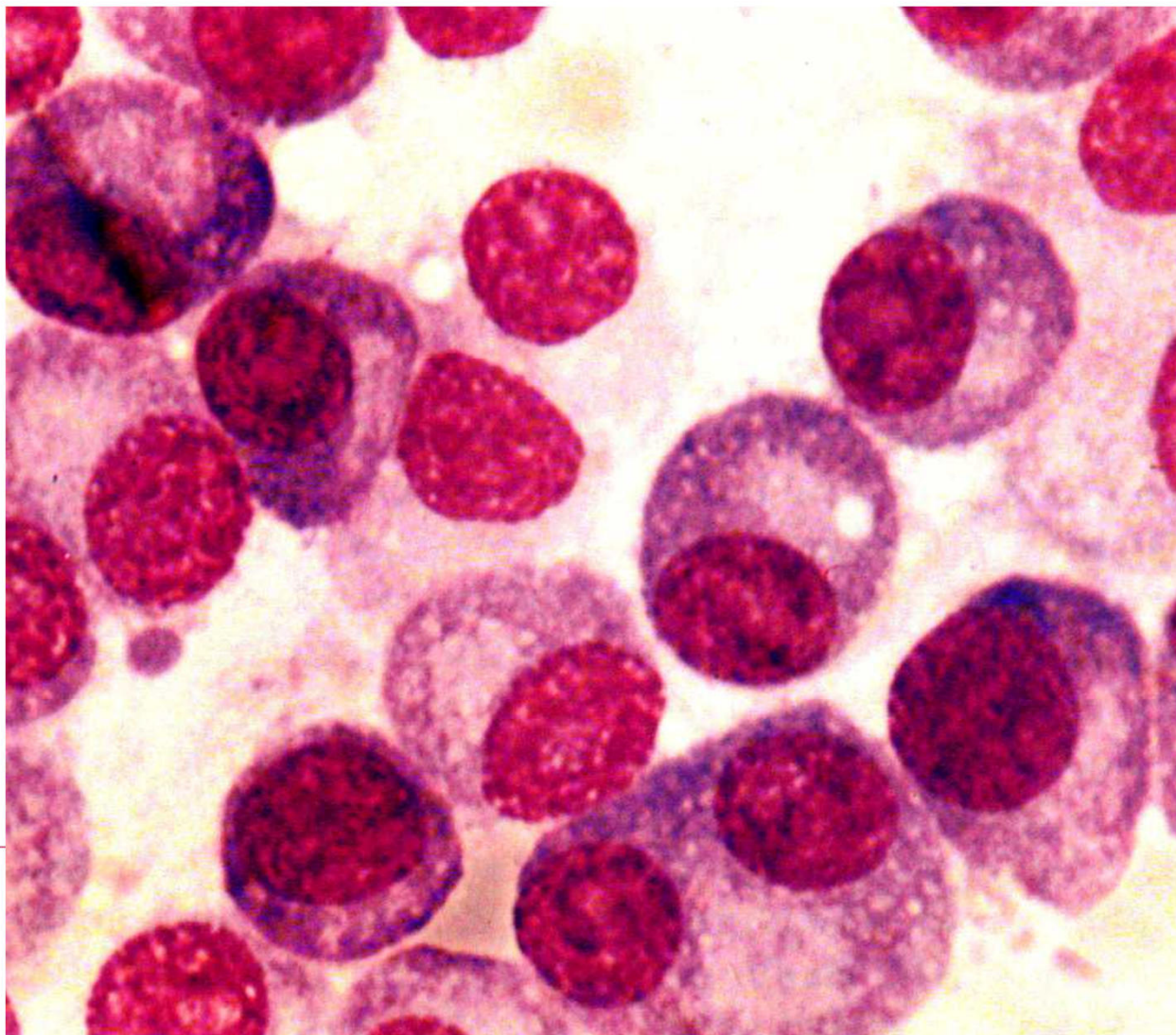
Vývojová stadia B b



blastická transformace lymfocytů – přeměna z klidové bb a její zmnožení



Plazmatické bb



Techniky separace buněk

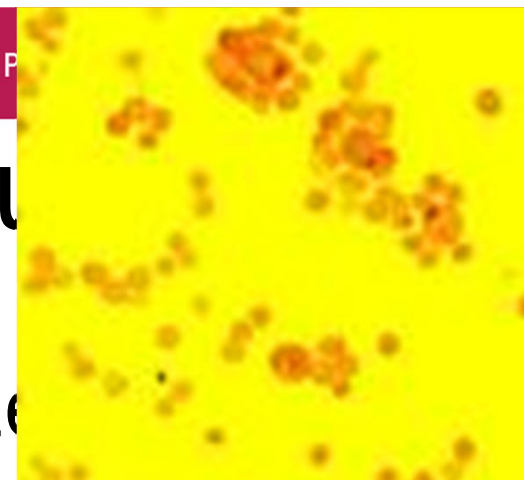
Kvantifikace
Funkční testy buněk



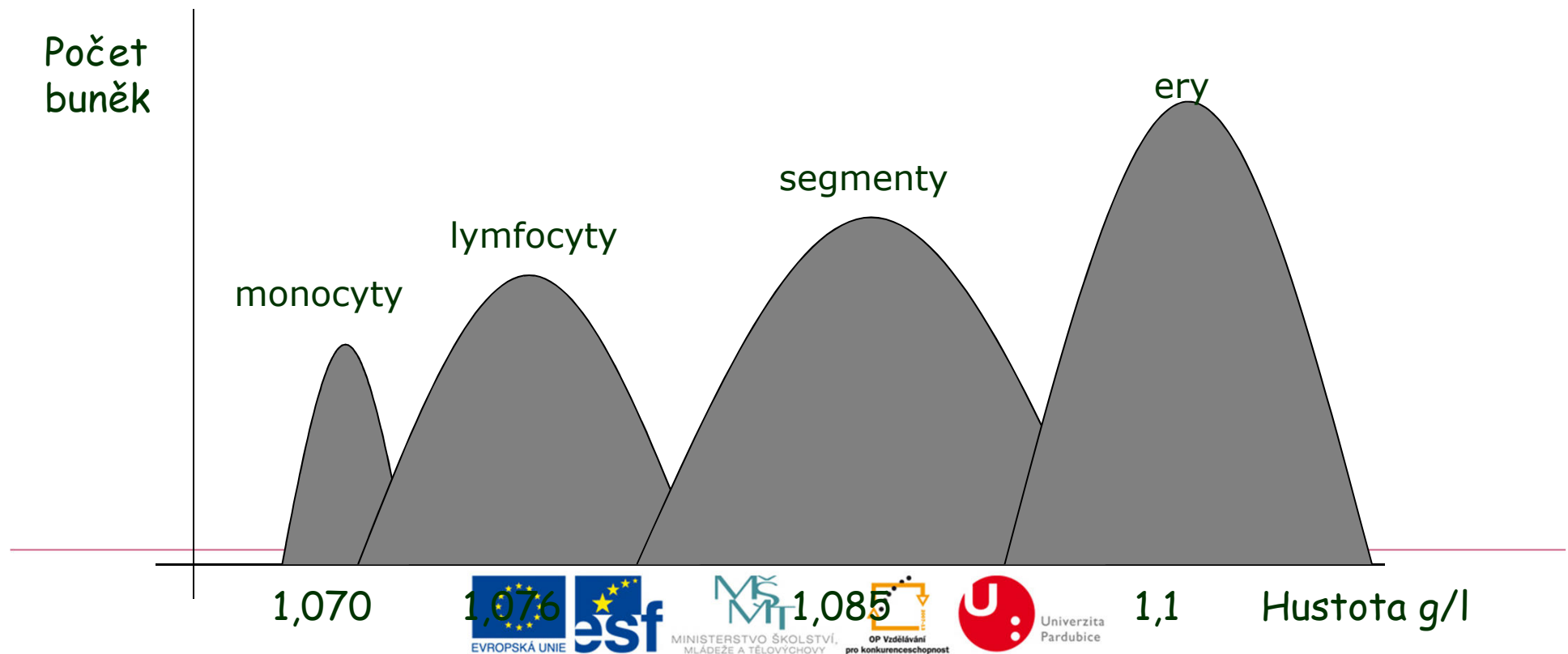
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Techniky separace bu

- (izolace T lymfocytů pomocí roze
– CD2+ bb, beraní erytrocyty
- gradientová centrifugace
– pomocí chlazené centrifugy
- imunomagnetická selekce
- selekce pomocí průtokové cytometrii



Hustotní gradient buněk



Imunomagnetická selekce leukocytů

- separace je založená na expresi povrchových Ag
- použití magnetických částic s navázanou specifickou protilátkou
- pozitivní selekce: jsou vybírány buňky s určitým Ag
- negativní selekce: nežádoucí populace je vybrána a odstraněna
- trvání selekce 2 h
- čistota frakcí přes 90%
- 4°C zajistí specifickou vazbu protilátky



PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- vrchol současných možností analýzy buněčných suspenzí
- Slouží k identifikaci buněčných populací průkazem membránových molekul (CD)
- částice jsou v laminárním proudění usměrněny do řady
- cytometrie určuje:
 - počet
 - velikost (FS)
 - „morfologii“ buněk (SS)
 - přítomnost fluorescenčního signálu (FL)
- údaje získané pro jednotlivé buňky jsou vyhodnoceny počítačem



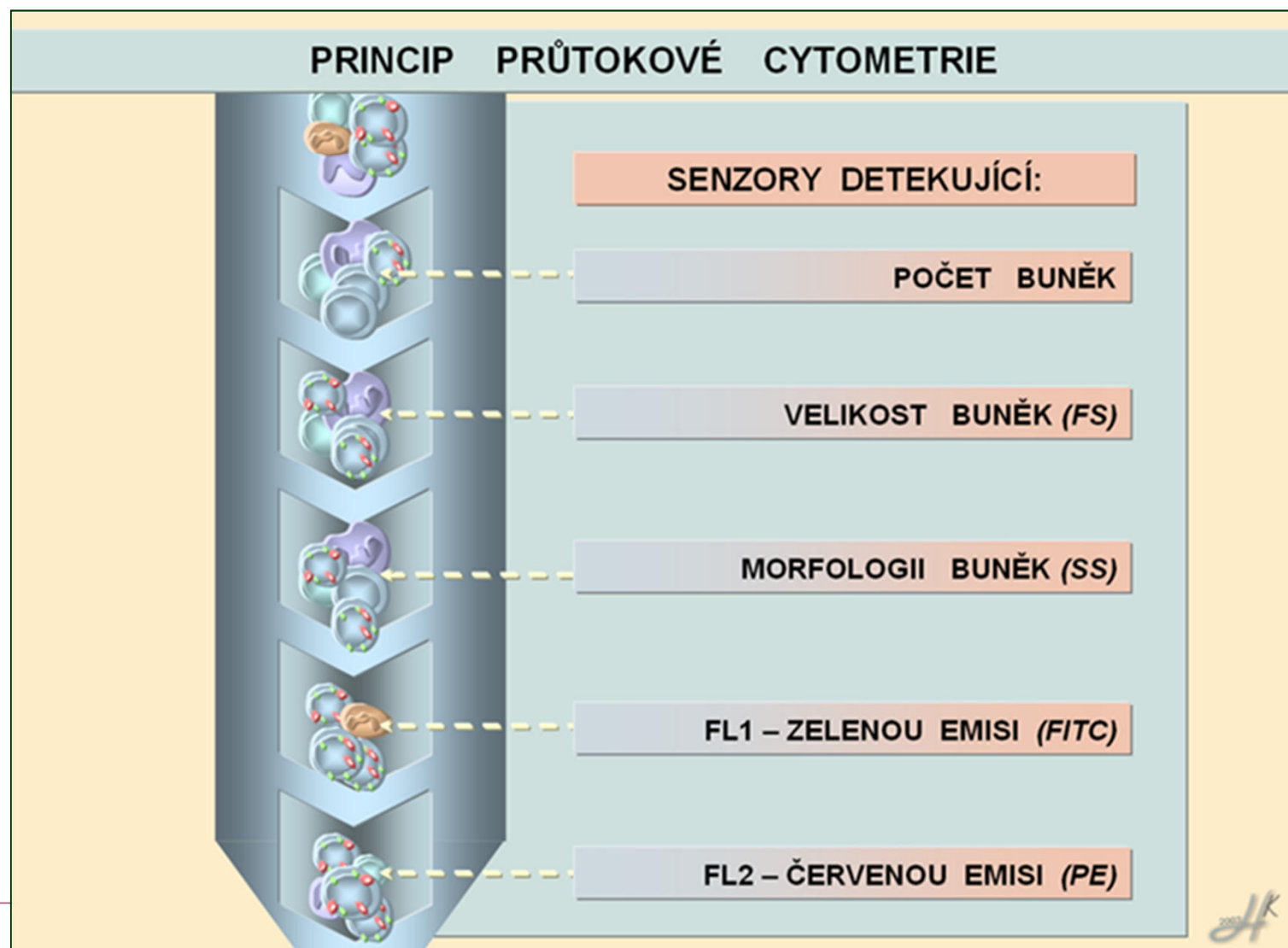
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

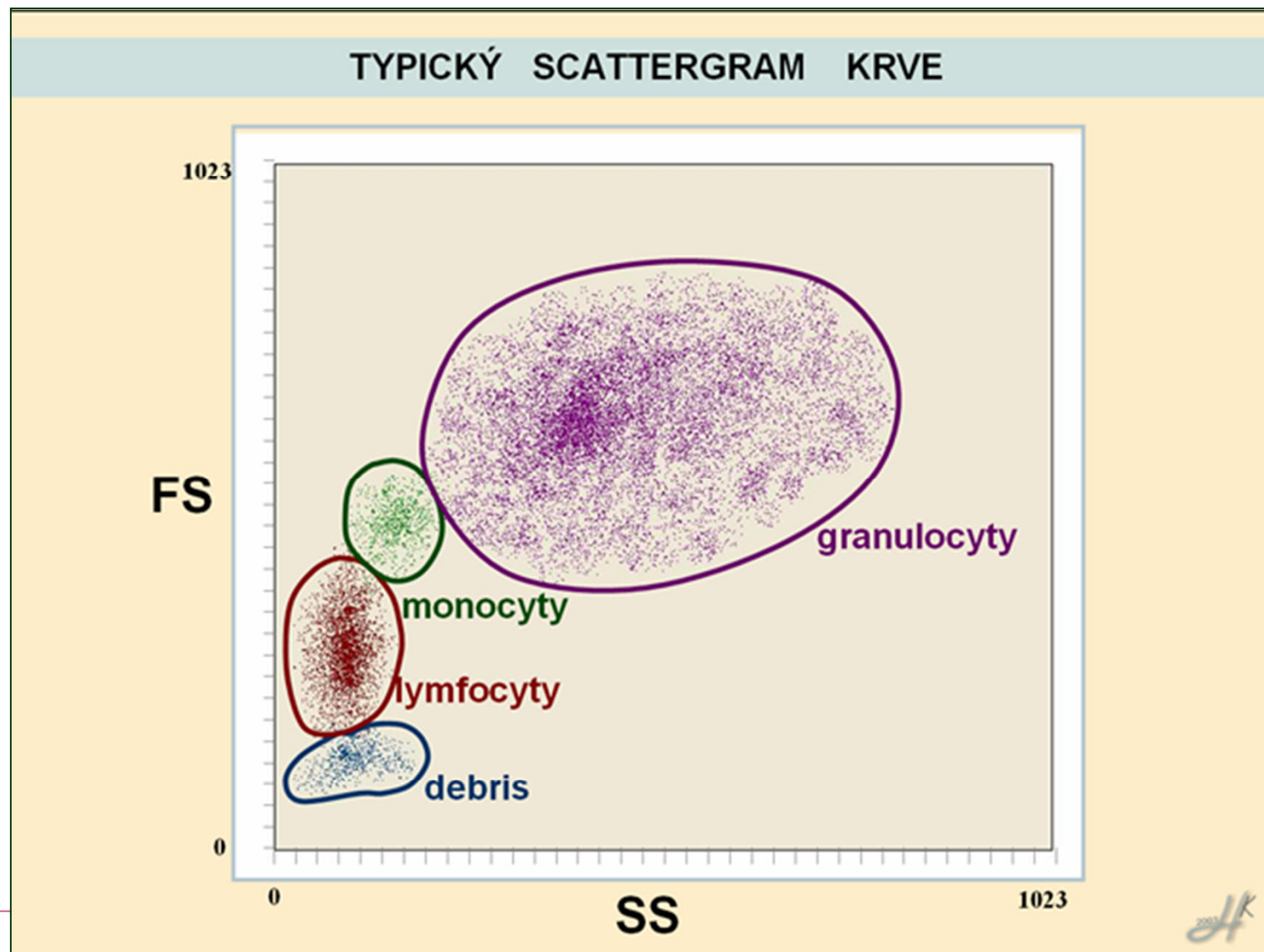


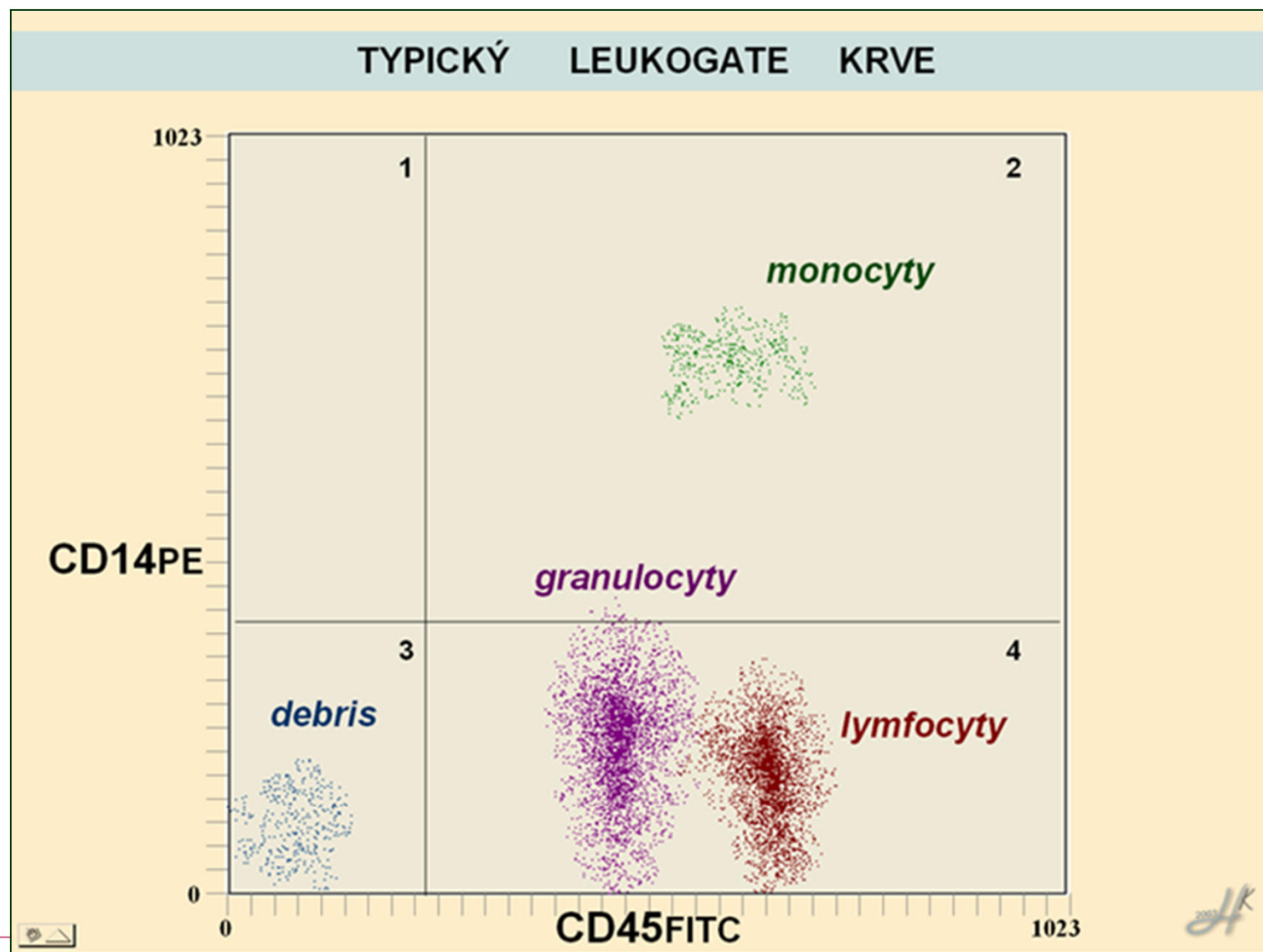
Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky







PŘÍMÁ DVOJITÁ IMUNOFLUORESCENCE V PLNÉ KRVÍ

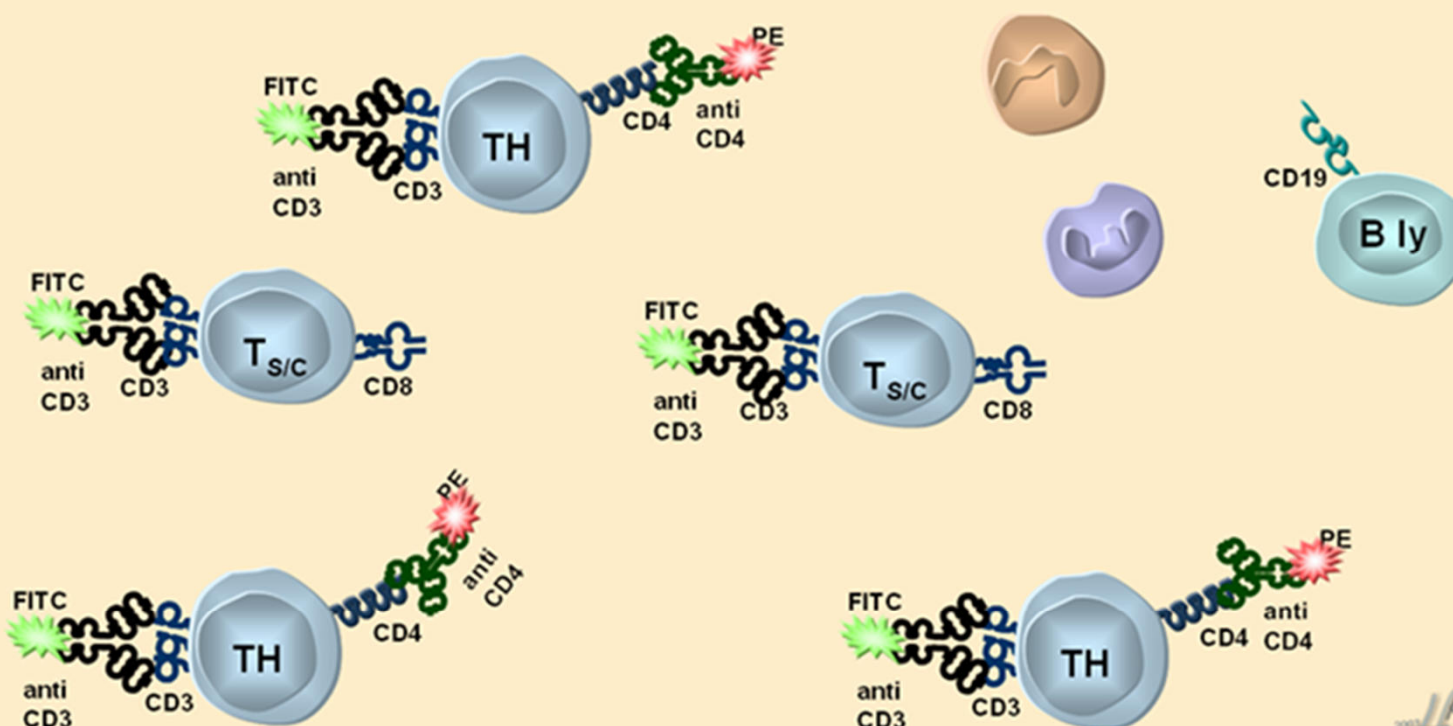
1. + monoklonální protilátky anti CD3 FITC

anti CD3 FITC

2. + monoklonální protilátky anti CD4 PE

anti CD4 PE

3. + lyzační roztok - hemolýza erytrocytů



MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY JSOU OZNAČENY FLUOROCHROMY

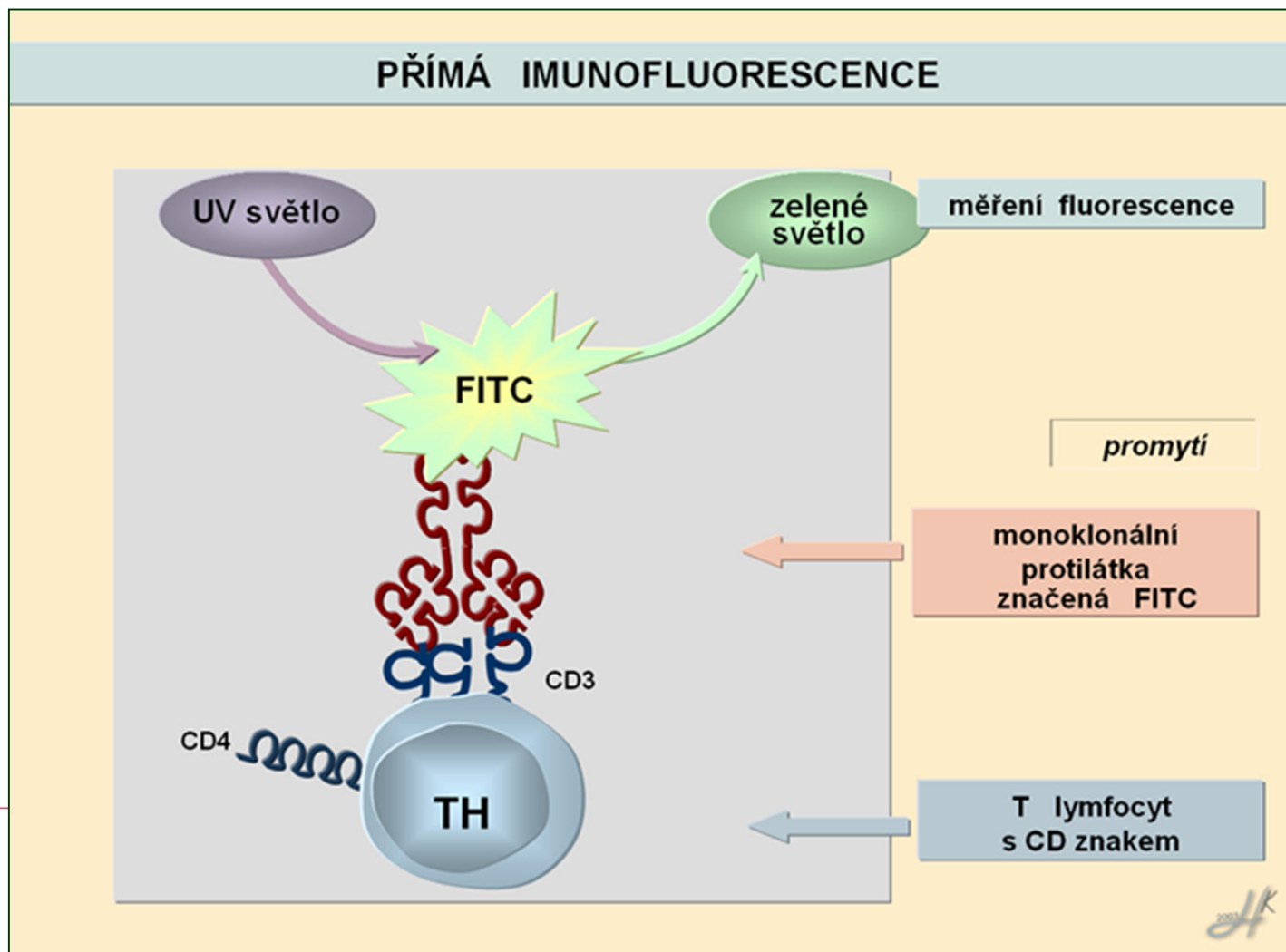
energie potřebná k excitaci fluorochromů je získávána z UV světla nebo laserového paprsku

je vyzařováno světlo, jehož barva závisí na vlnové délce emise

fluorochrom	absorbance (nm)	emise
FITC	470 - 510	510 - 540
PHYCOERYTHRIN (PE)	490 - 580	570 - 590
ALOPHYKOCYANIN (APC)	630 - 635	660 - 680

fluorochrom je konjugován s primární protilátkou

- analýza plné krve
- **průtoková cytometrie**



primární protilátka je neznačená

⇒- označena je sekundární protilátka

- izolované buňky, **imunohistochemie**
- UV mikroskopie

