

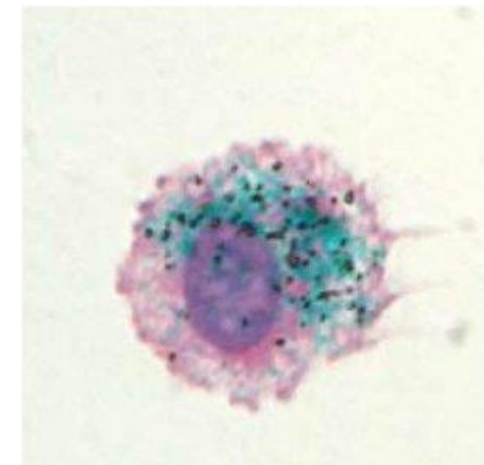
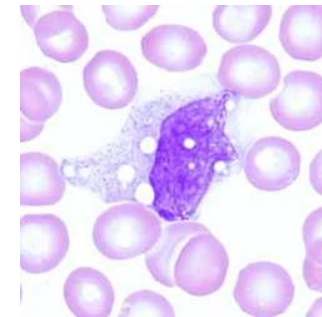
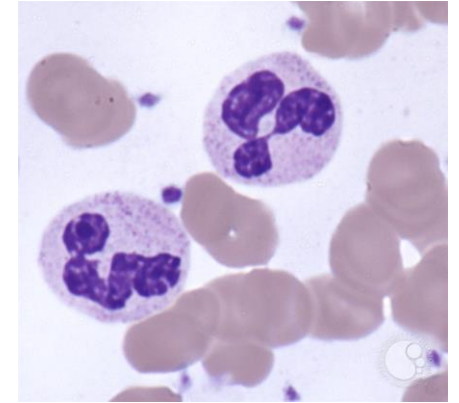
Vyšetření funkce fagocytů

Mgr. Julie Štichová

Výkonné buňky nespecifické imunity

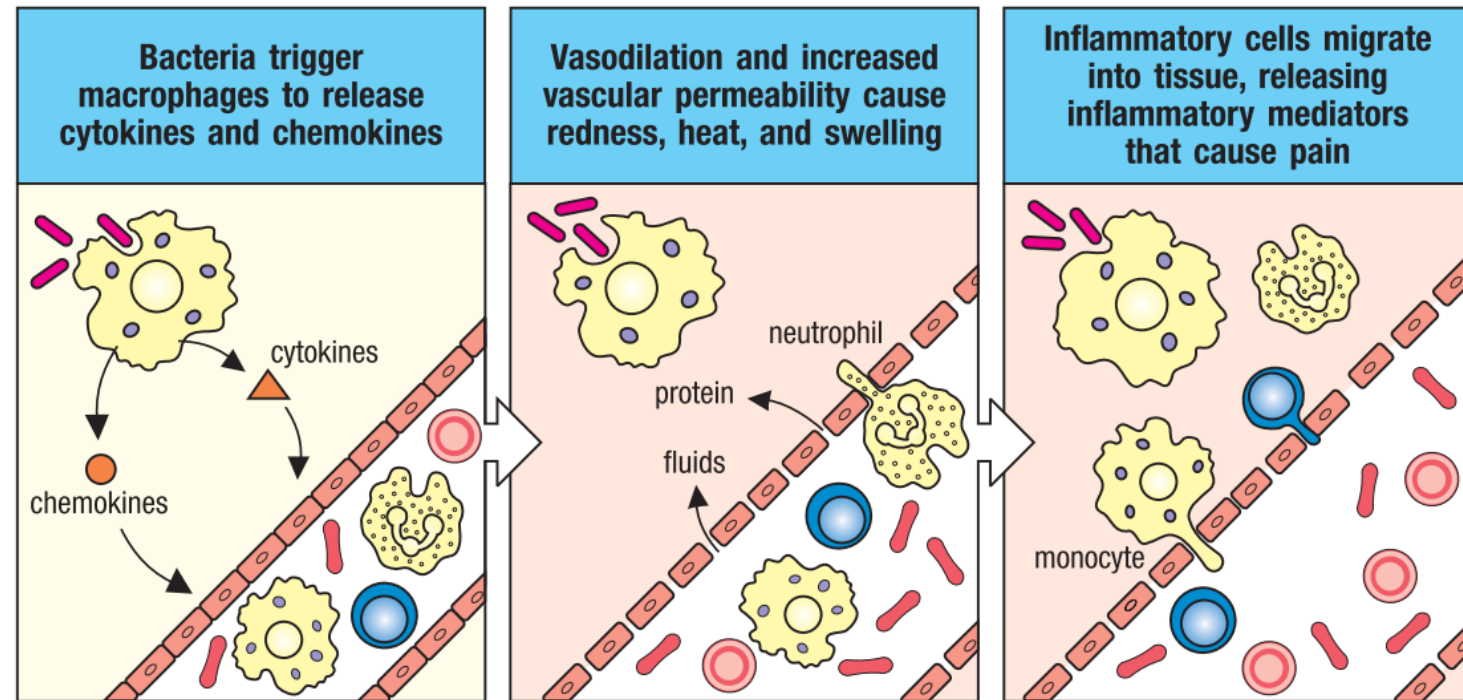
Profesionální fagocyty

- ▶ Neutrofilní granulocyty
 - ▶ Tvoří 50 – 70 % z WBC
 - ▶ Nízká fagocytární kapacita – „mikrofágy“
 - ▶ Krátká životnost
- ▶ Monocyty
 - ▶ 2-12 % z WBC
 - ▶ Z cirkulace přecházejí do tkání kde diferencují v makrofágy
 - ▶ Dlouhá životnost
 - ▶ Vyšší fagocytární kapacita



První obranná linie

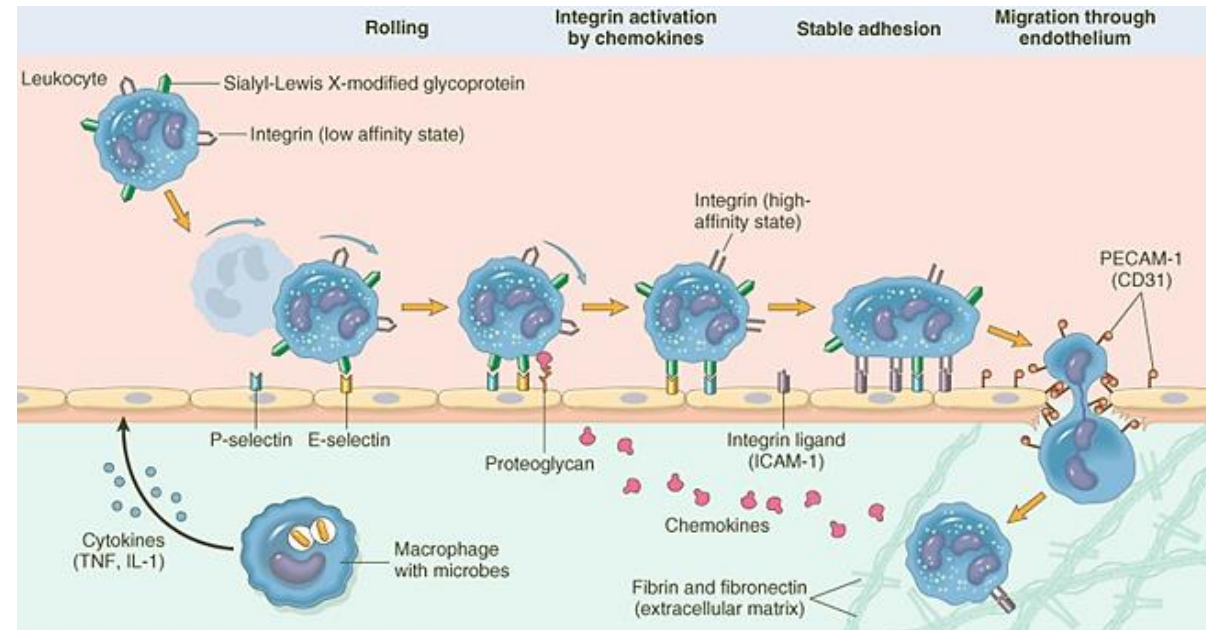
- Poranění tkání → aktivace makrofágů
- Produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů
- Rozvoj zánětu, lákání neutrofilů do místa infekce



Průnik do místa infekce

1. ADHEZE

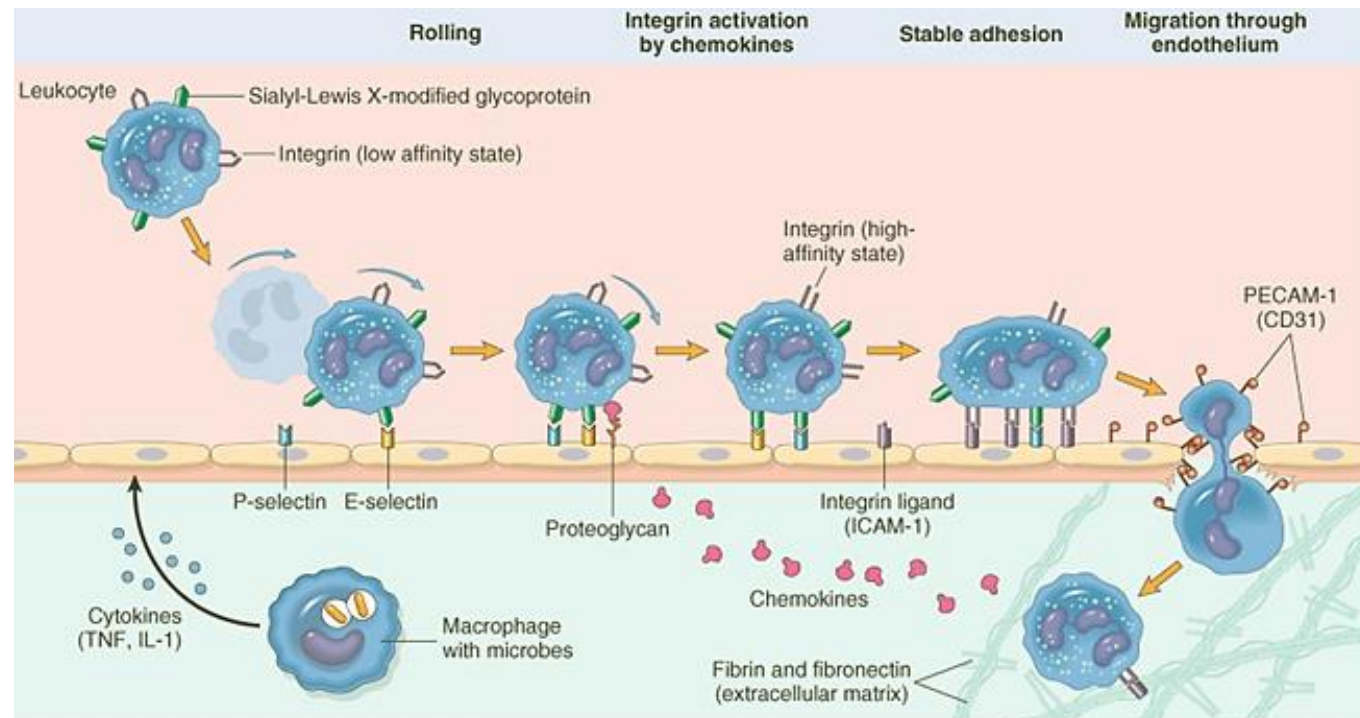
- Endotelie – vlivem prozánětlivých cytokinů exprese adhezivních molekul
- Průběh ve 2 fázích:
 - Fáze 1: E a P selektiny - reverzibilní vazba granulocytů – rolling
 - Fáze 2: Pokud během rollingu přetrvává zánětlivý signál, následuje ireverzibilní vazba na endoteliální stěnu – LFA na povrchu neutrofilu se váže na endoteliální integriny – VCAM, ICAM



Průnik do místa infekce

2. Extravazace, diapedéza

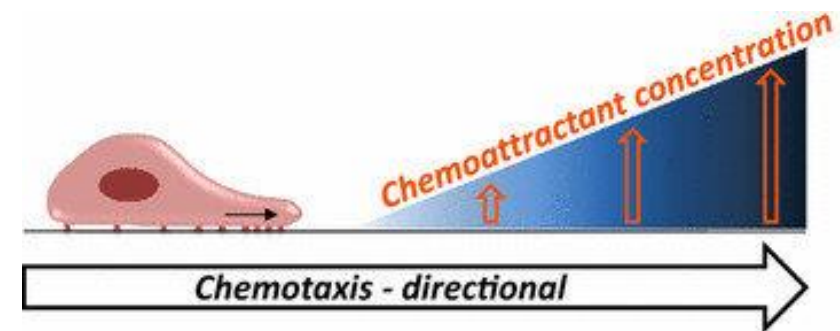
- Prostup skrze endotelie
- PECAM, JAM, CD99
- Paracelulární - hlavní
- Transcelulární



Průnik do místa infekce

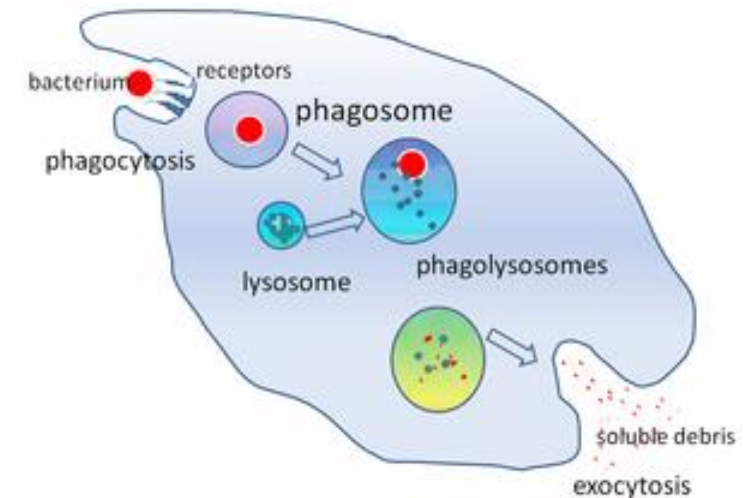
4. Chemotaxe

- ▶ V místě zánětu tvořeny látky s chemotaktickými účinky
 - ▶ Exogenní – fMLP
 - ▶ Endogenní – C3a, C5a, IL-8, CXCL8, CXCL-7
- ▶ Vazba na chemokinové receptory neutrofilního granulocytu
- ▶ Receptory řízený pohyb ve směru koncentračního gradientu
- ▶ Produkce hydrolytických enzymů → narušení mezibuněčné hmoty → vstup do místa zánětu pomocí reverzibilních interakcí adhezivních molekul



Rozpoznání patogenní částice

- ▶ Pattern recognition receptors (PRR)- rozpoznávají PAMPs (10^3 struktur)
 - ▶ TLR, NOD-like, NLR, RIG-like receptory
- ▶ Vazba patogenní částice na receptory zahájí vlastní proces fagocytózy:
 - ▶ Tvorba pseudopodií → Ingesce → fagosom
 - ▶ **Digestce -splynutí fagosomu s lysozomy – konečná degradace**
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku nezávislé
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku závislé





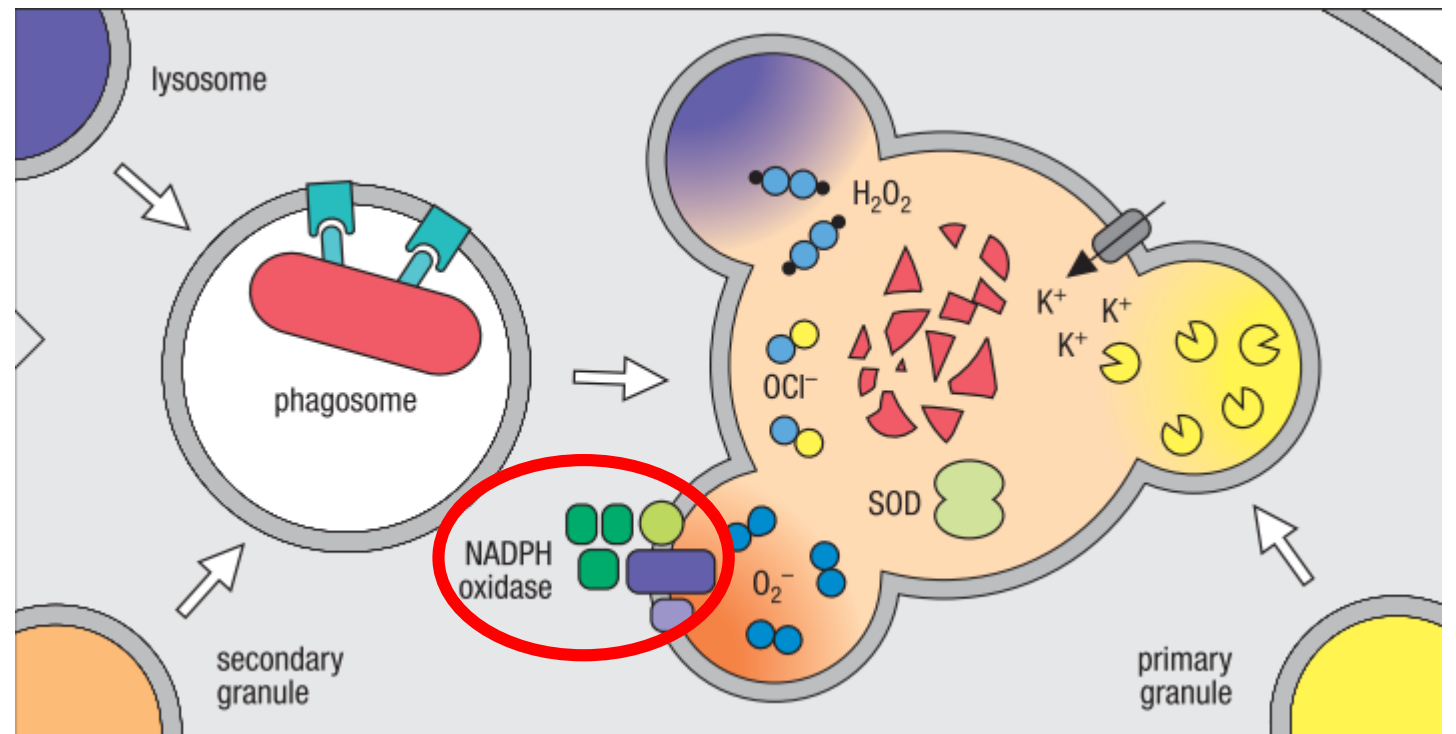
Mechanismy zabíjení na O₂ nezávislé

- ▶ Antimikrobiální peptidy a enzymy
 - ▶ Kathepsiny
 - ▶ Lysozym
 - ▶ Defenziny
 - ▶ Kyselé pH

- ▶ Proteiny omezující dostupnost stopových prvků a vitaminů
 - ▶ Laktoferin – vyvazuje železo
 - ▶ Vitamin B12 binding protein

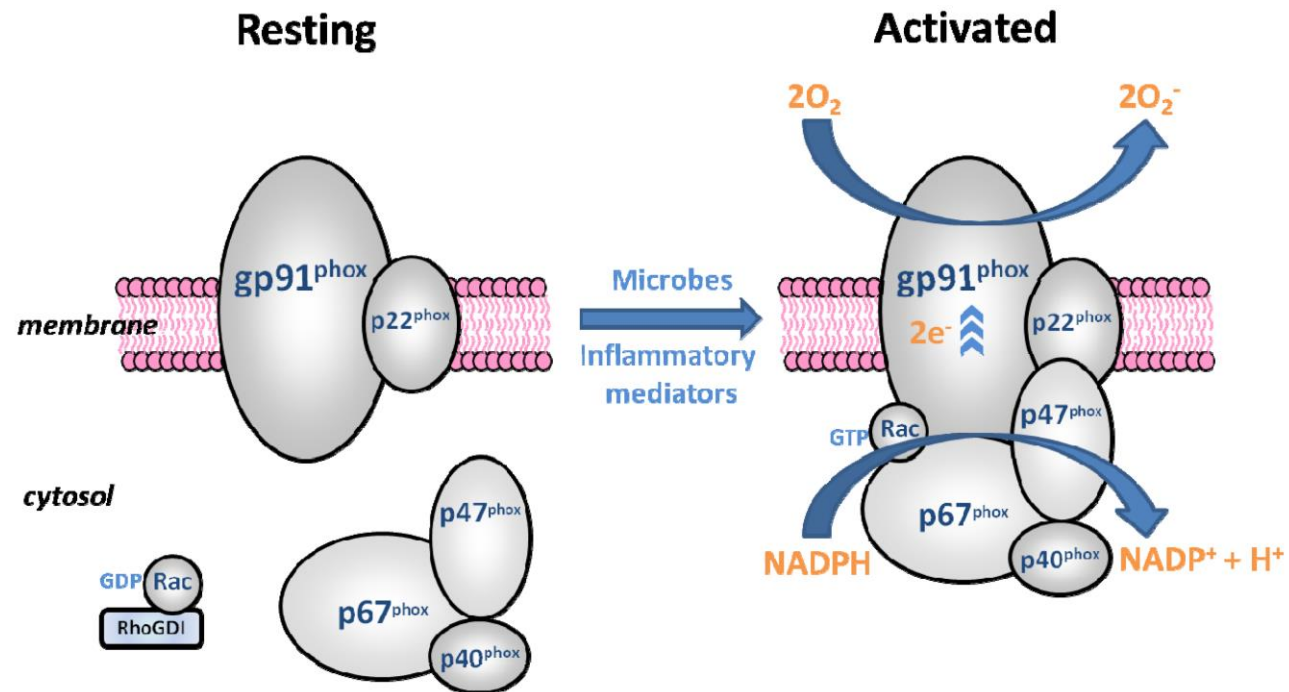
Mechanismy zabíjení na O₂ závislé

- ▶ Enzymatická tvorba reaktivních kyslíkových mediátorů
- ▶ Doprovázená výraznou spotřebou kyslíku – oxidační vzplanutí
- ▶ Ústřední role – NADP oxidáza

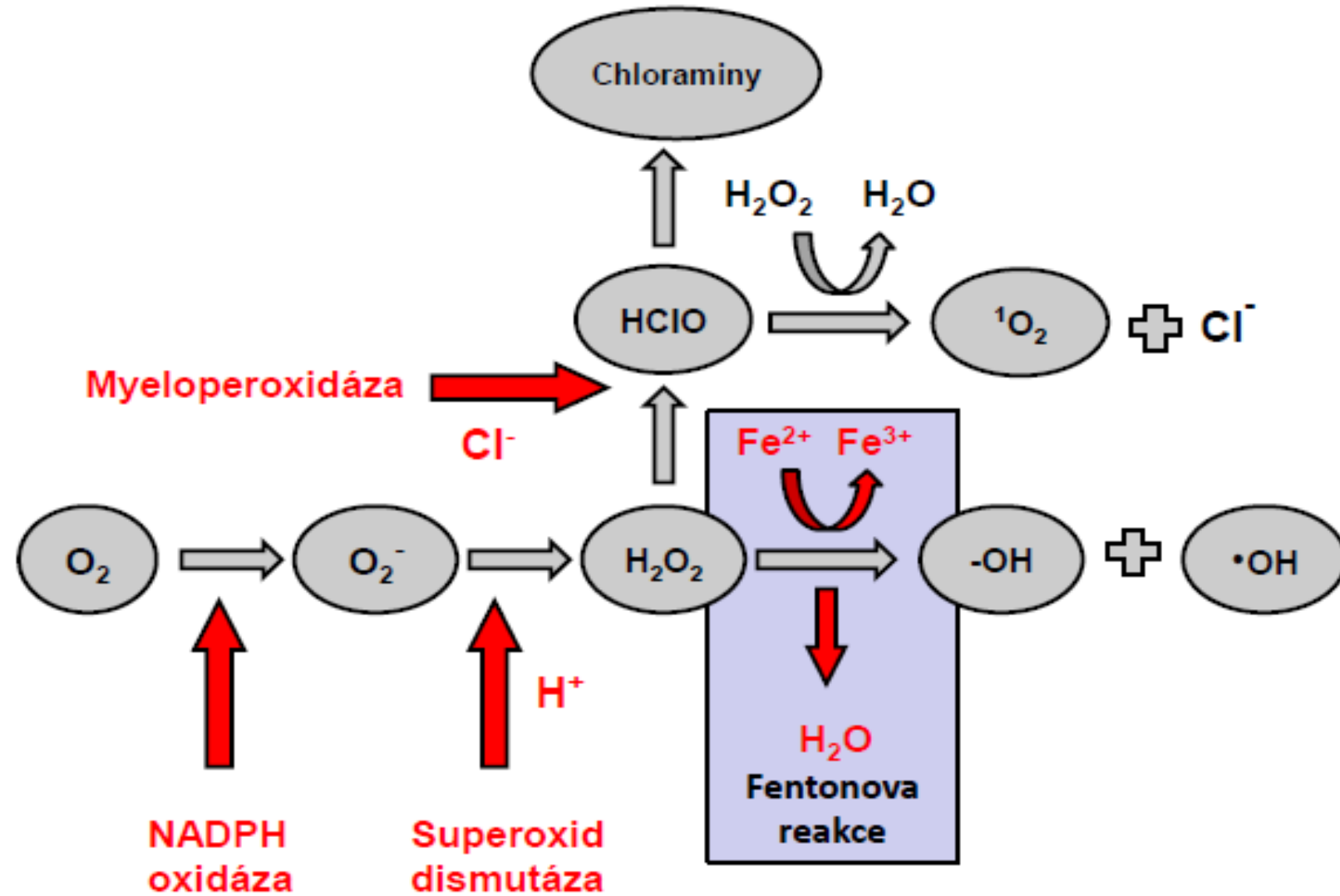


NADPH oxidáza

- ▶ Intracelulární lokalizace - membrány
- ▶ 6 podjednotek (2 v membráně fagolysosomů, 4 v cytosolu)
- ▶ Aktivace – signální kaskáda spuštěná receptory – fosforylace podjednotek

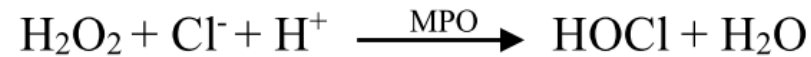


NADPH oxidáza

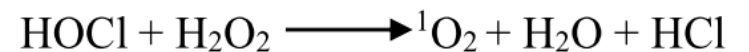


Myeloperoxidáza

- Oxidoreduktáza
- Obsahuje hemovou skupinu – nazelenalé zbarvení
- Přeměna peroxidu vodíku na kyselinu chlornou, která je až 50 krát účinnější



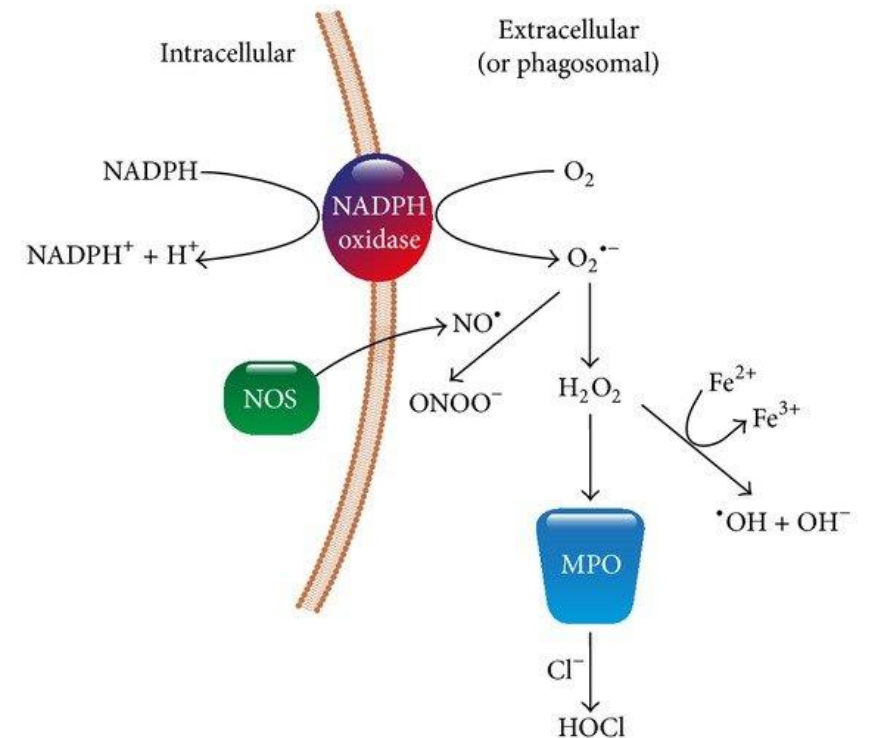
- Kyselina chlorná může být substrátem dalších reakcí, při kterých vzniká hydroxylový radikál a singletový kyslík – lipoperoxidace membrán → smrt fagocytující buňky



iNOS

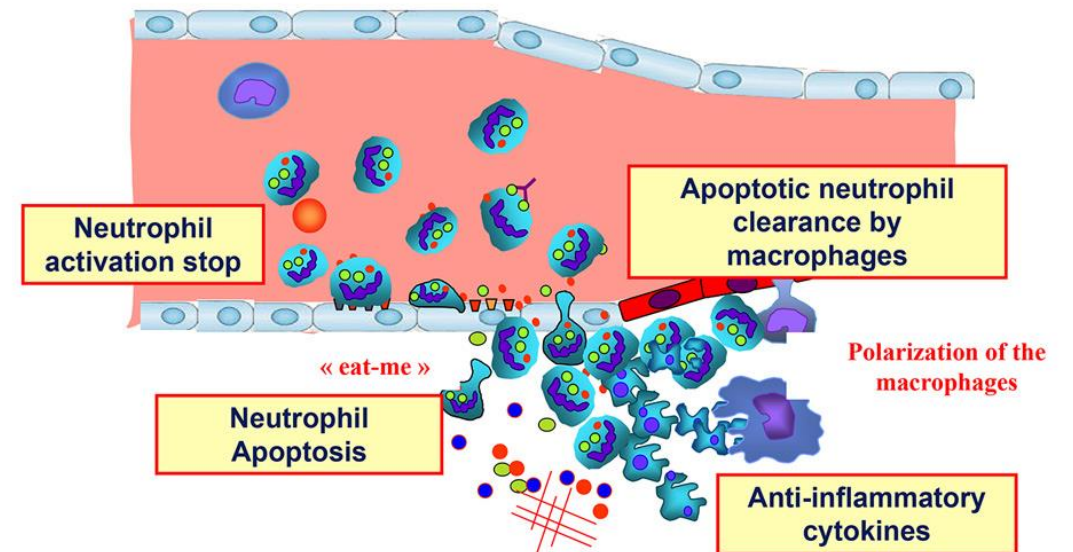
inducibilní syntáza oxidu dusnatého

- ▶ Azurofilní granula neutrofilů, monocytů
- ▶ Tvorba NO z aminokyseliny argininu – podíl na degradaci patogenů
- ▶ Regulace MPO – Tvorba NO redukuje aktivitu MPO



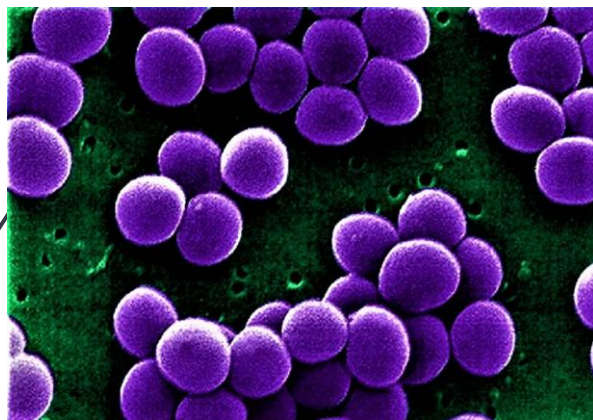
Závěrečná fáze fagocytózy

- Vyloučení degradovaných částí patogenů exocytózou
- Neutrofily brzy podléhají poškození a umírají
- Ve tkáních jsou fagocytovány makrofágy
- Nahromadění zbytků mikroorganismů a fagocytů – hnis (nazelenalé zbarvení způsobuje MPO)

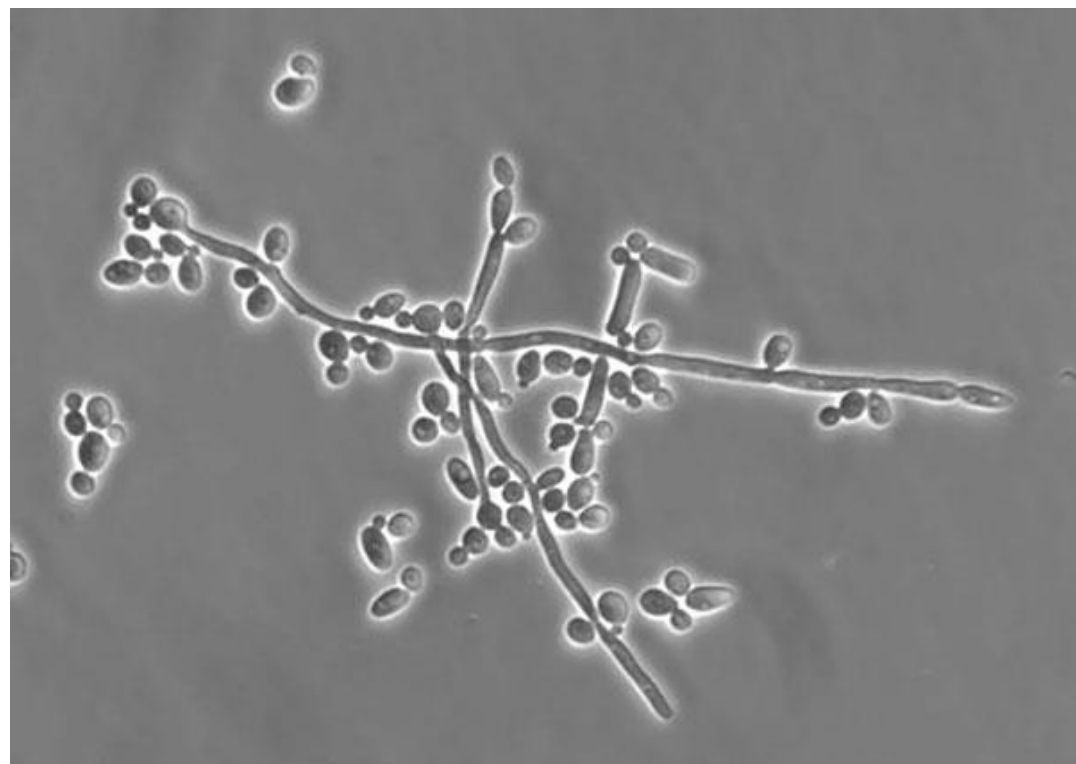


Fagocytózou to někdy nekončí

- ▶ Jak se fagocyty podílejí na eliminaci patogenů, které nemohou být díky své velikosti nebo agresivitě zfagocytovány?



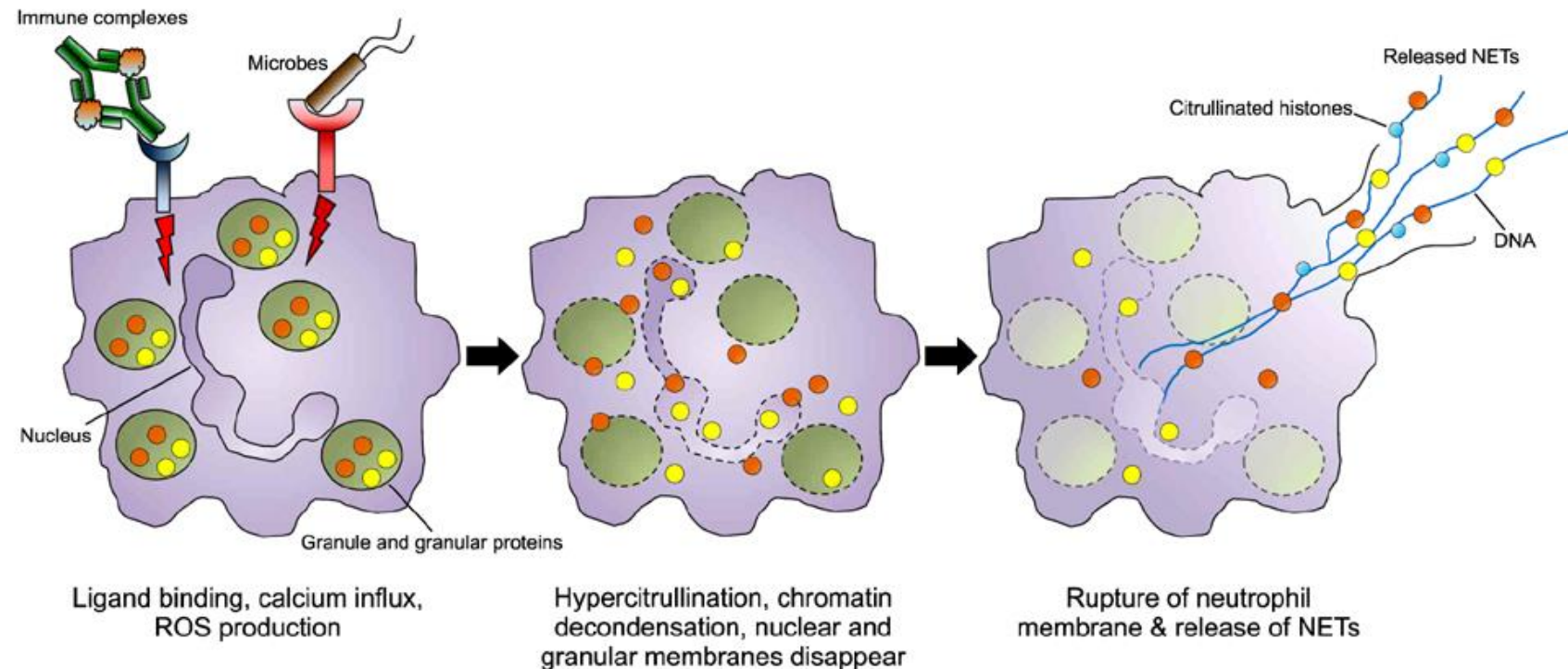
Staphylococcus aureus



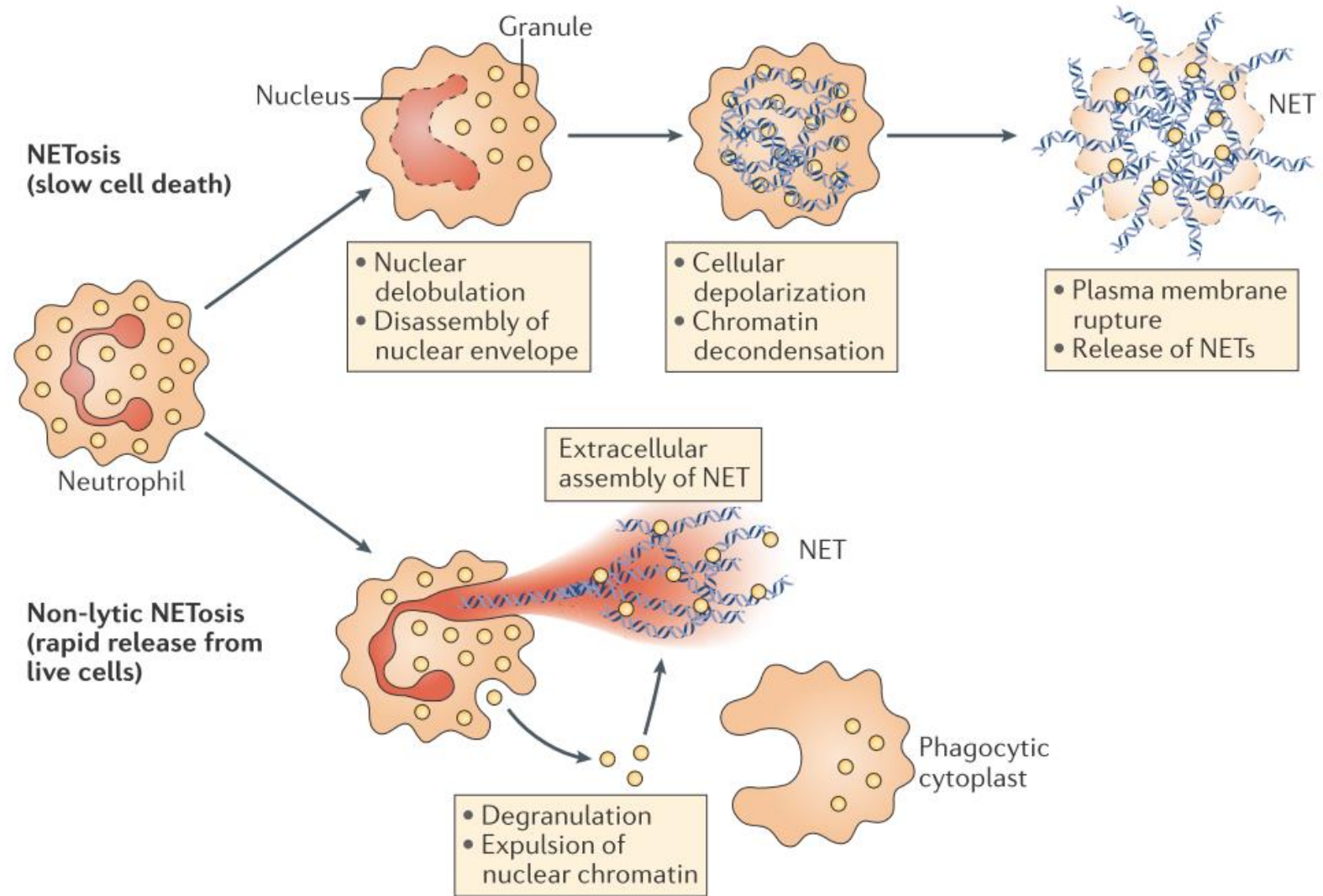
Pseudomycelia *Candida albicans*

NETóza

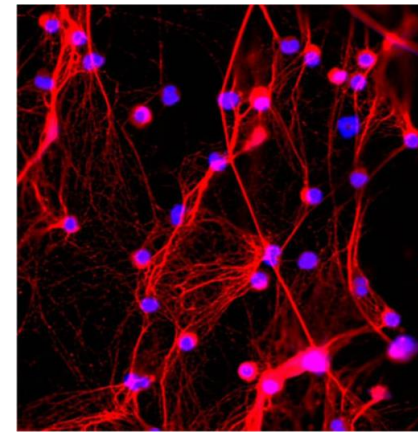
- Nový typ buněčné smrti
- Reaktivní kyslíkové mediátory tvořené NADPH oxidázou jsou druhými posly
- Dochází k citrulinaci histonů, rozvolnění jaderného chromatinu a jeho vypuzení do extracelulárního prostoru



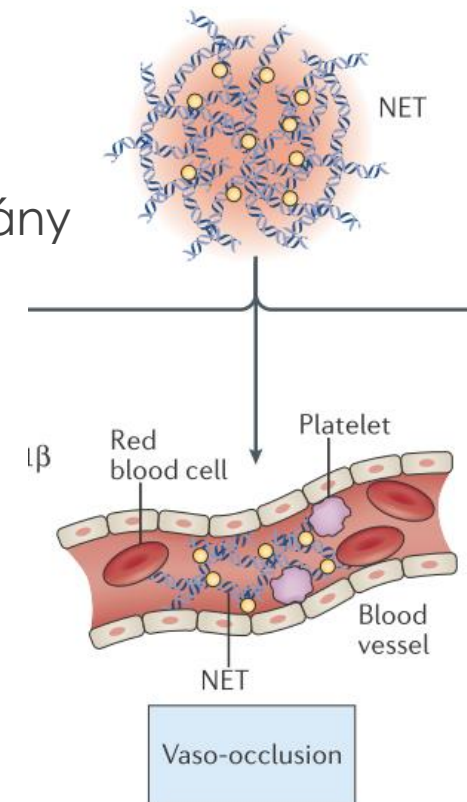
NETóza – 2 typy



NETóza



- Vzniká síť tvořená jaderným materiálem, obsahující MPO a některé další antibakteriální peptidy z granulí neutrofilů
- Do procesu NETózy vstupuje pouze malá část aktivovaných neutrofilů
- Účel – většinou boj s velkými patogeny, které nemohou být zfagocytovány
 - MPO, cadheliciny, defenziny – mikrobicidie
 - Síť – omezení šíření patogenů v prostoru
- Možné nežádoucí důsledky
 - Uvolnění intracelulárních komponent – možná tvorba autoprotilátek proti intracelulárním strukturám neutrofilů
 - Podezření z účasti na imunitně podmíněné trombóze



Vyšetření fagocytózy

► Adheze

- Cytometrická detekce CD11b/CD18 – deficit – LAD syndrom

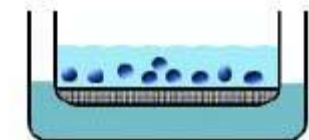
► Chemotaxe

► Boydenova komůrka

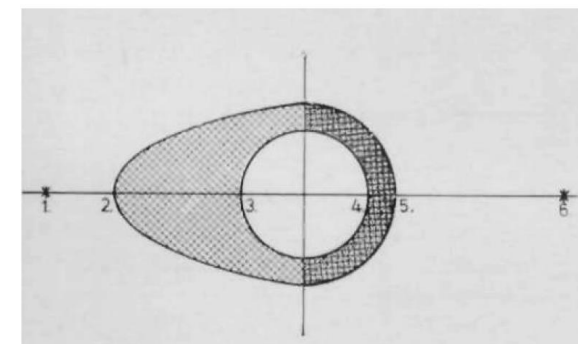
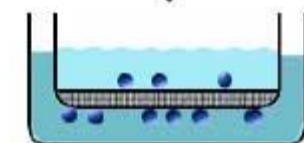
- migrace fagocytů v nádobce skrze membránu s velmi malými pózy ve směru chemotaktického gradientu
- Počítání buněk které pronikly na druhou stranu membrány

► Migrace pod agarózou

- Do agarózového gelu se vyříznou jamky – do jedné se pipetuje suspenze vyšetřovaných buněk, do druhé chemoatraktant
- Buňky migrují směrem k jamce s chemoatraktantem
- Po inkubaci 4 h se gel usuší a obarví
- Odečítá se vzdálenost, kterou buňky urazily od středu jamky



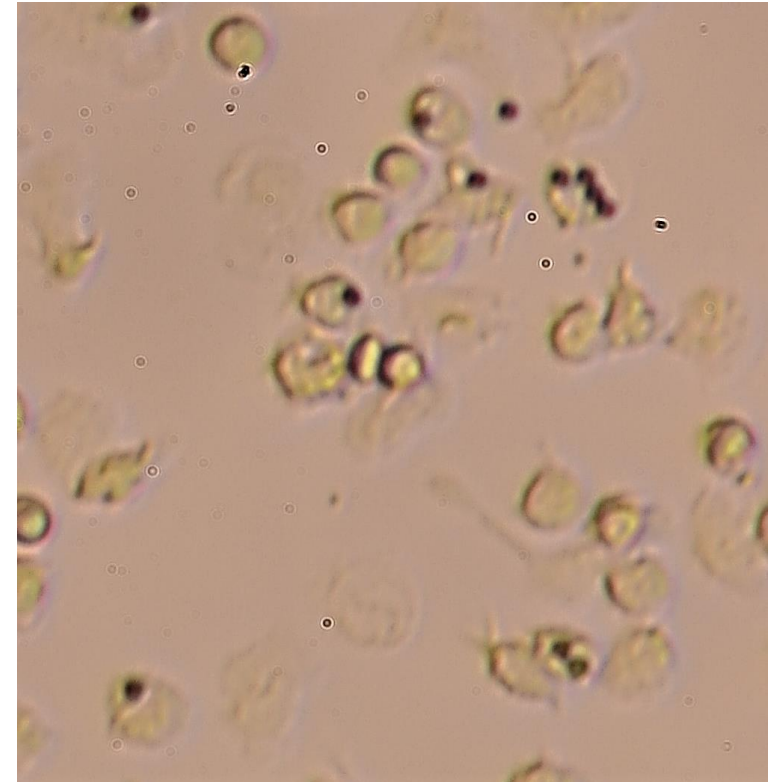
24-72 hours



Vyšetření fagocytózy

► Test ingesce

- Testuje se schopnost buněk pohltnout mikrosferické hydrofilní partikule (MSHP)
- Krev se inkubuje s MSHP částicemi
- Poté se zhotoví nátěr krve a obarví se
- Počítají se 100 buněk, pozitivní jsou ty, co obsahují v cytoplazmě 3 a více MSHP částic
- Význam má snížení – sepse, nádory, nezralé formy granulocytů





Vyšetření oxidačního vzplanutí

► INT/NBT test

- Inkubace krve s bezbarvým nitroblue tetrazolium chloridem (NBT) nebo jod nitroblue tetrazolium chloridem (INT) a látkou stimulující oxidační vzplanutí
- Při oxidačním vzplanutí dochází k redukci NBT nebo INT na nerozpustný barevný formazan
- Hodnocení počtu pozitivních buněk (obsahují barevná granula)

► Chemiluminiscence

- Stimulace buněk (PMA, fMLP, bakterie, zymosan)
- Přídavek chemiluminiscenční látky – vlivem oxidačního vzplanutí dochází k oxidaci chemiluminiscenční sondy* → emise fotonů → přístroj luminometr → počítání záblesků
- *Luminol, isoluminol

Burst test (BTT)

- ▶ Detekce oxidačního vzplanutí v **granulocytech** a monocytech pomocí průtokové cytometrie
- ▶ Princip – Produkty oxidačního vzplanutí oxidují fluorescenční barvivo
- ▶ Funkční test
- ▶ Odběr krve do heparinu
- ▶ Nejsou stanoveny konkrétní referenční meze
- ▶ **Nutno se vzorkem pacienta vždy zpracovat i vzorek zdravé kontroly!**
- ▶ Hodnocení – porovnání pacienta s kontrolní osobou – % pozitivních granulocytů a monocytů



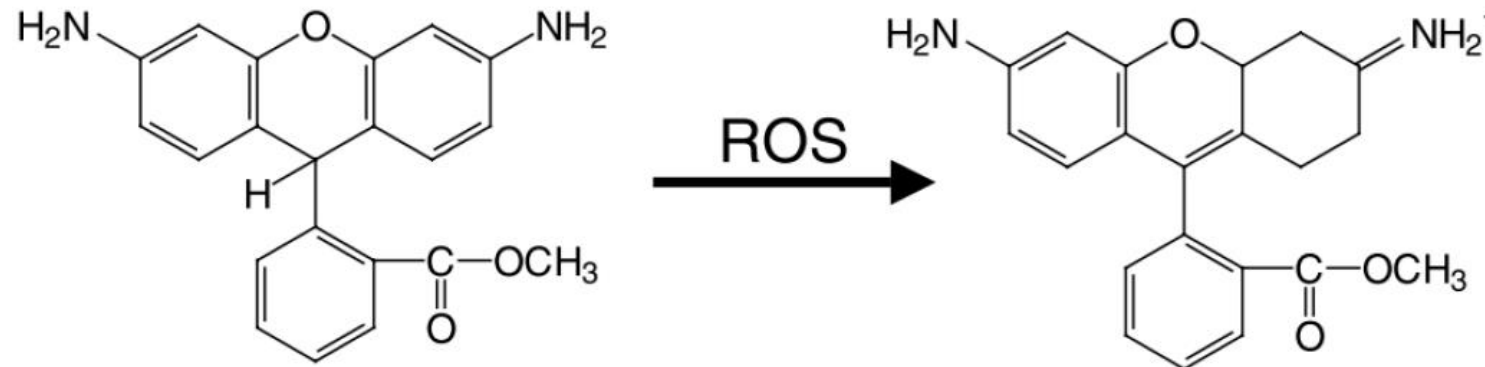
Burst test (BTT)

- **Krok 1: Stimulace fagocytů** (1 pacient = 4 zkumavky)
 - **PBS** – negativní kontrola
 - ***E. Coli*** – vazba na PRR receptory – aktivace fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K)
 - **fMLP** – chemoakraktant - vazba na formyl peptidový receptor spřažený s malými G proteiny – aktivace fosfolipázy A2 (PLA2)
 - **PMA** – malá molekula – rychlý průnik skrze membránu do cytoplazmy – přímá vazba na proteinkinázu C (PKC) – rychlá a masivní aktivace, která po krátké době může vést i ke smrti buňky
- Proč 3 stimulancia? → široké spektrum patogenů, různé cesty aktivace
- Snaha postihnout několik signálních drah, které vedou k fosforylaci NADPH oxidázy

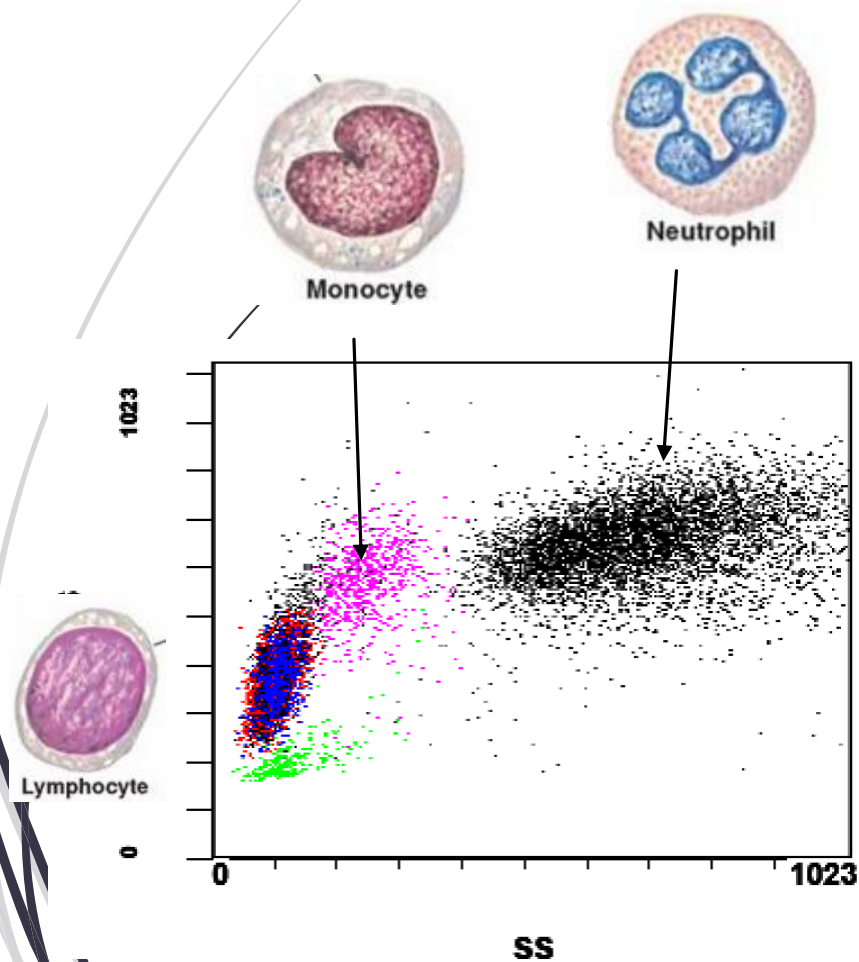
Burst test (BTT)

➤ Krok 2: Zviditelnění produkce ROS pro průtokový cytometr

- Fluorescenční barvivo Dihydrorhodamin 123 (DRH 123) → vlivem ROS dochází k oxidaci na Rhodamin 123
- Fluorescence při 536 nm (zelená)
- Světelná emise zaznamenána detektory cytometru
- Intenzita fluorescence úměrná aktivitě oxidačního vzplanutí

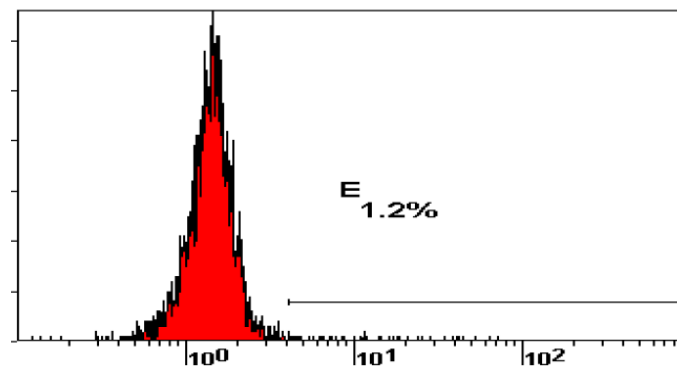


Burst test (BTT) – hodnocení



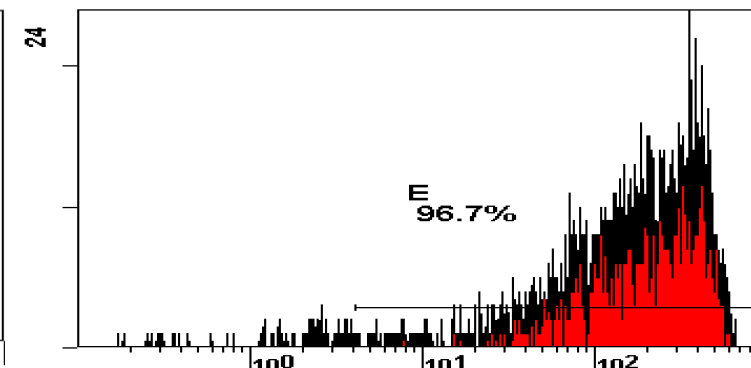
BEZ STIMULACE

(1):Z0021459.LMD FL1 LOG A



STIMULACE PMA

(4):Z0211867.LMD FL1 LOG A



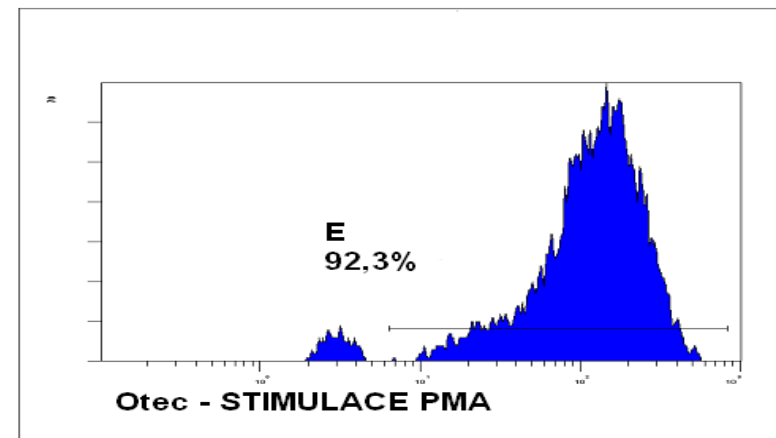
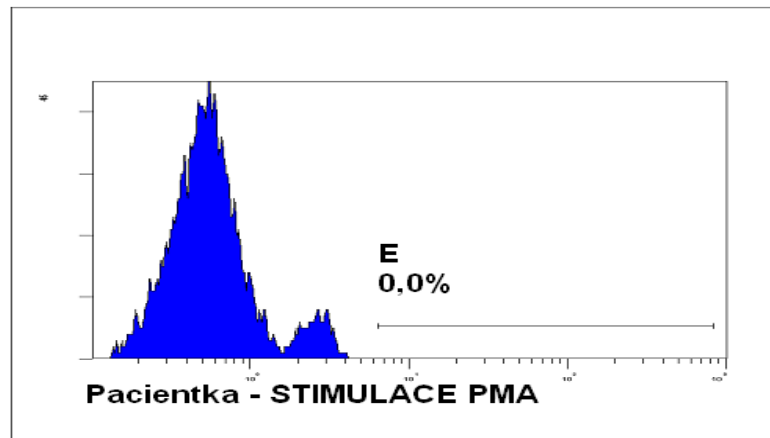
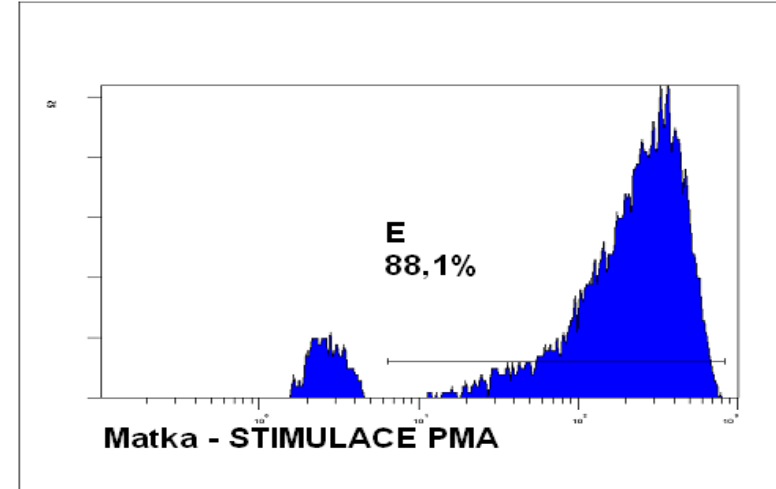
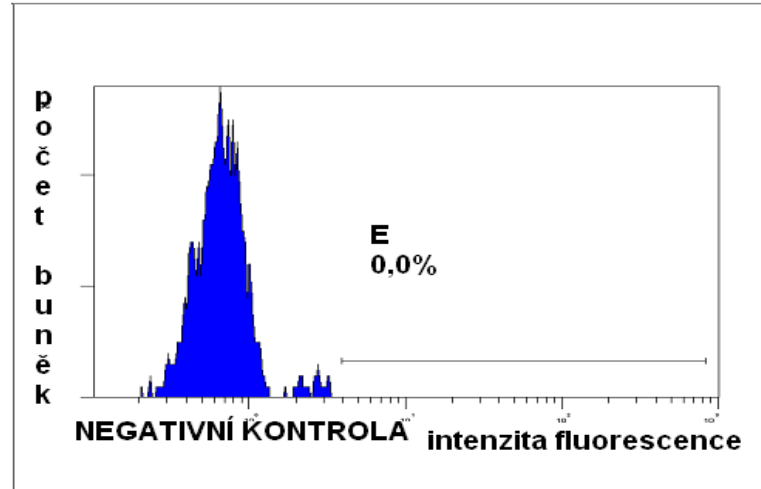
Chronická granulomatózní choroba (GCD)

- ▶ Defekt NADPH oxidázy – porucha tvorby ROS
- ▶ Dědičnost X- vázaná (závažnější) nebo autosomálně recesivní (mírnější)
- ▶ 1:250 000
- ▶ Náchylnost k infekcím kataláza pozitivními patogeny a mikromycetami (plísně)
- ▶ Neschopnost fagocytů degradovat patogenní materiál
- ▶ Tvorba hlubokých abscesů (mohou působit útlak okolních tkání)
- ▶ Časný nástup choroby

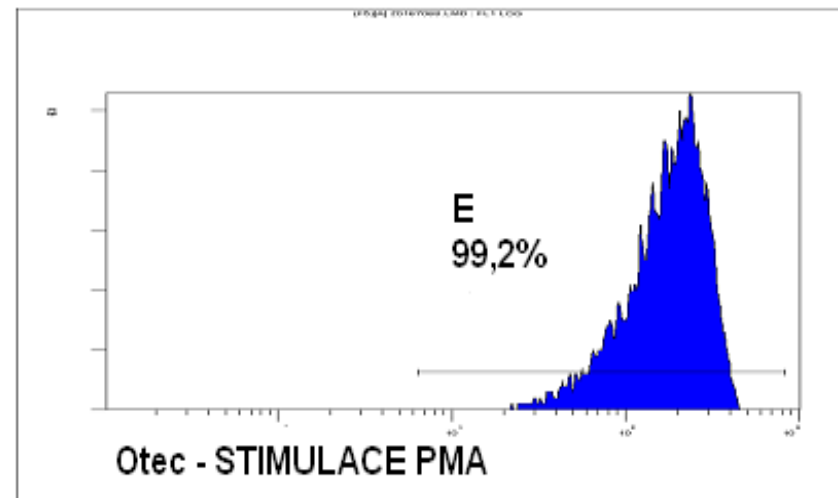
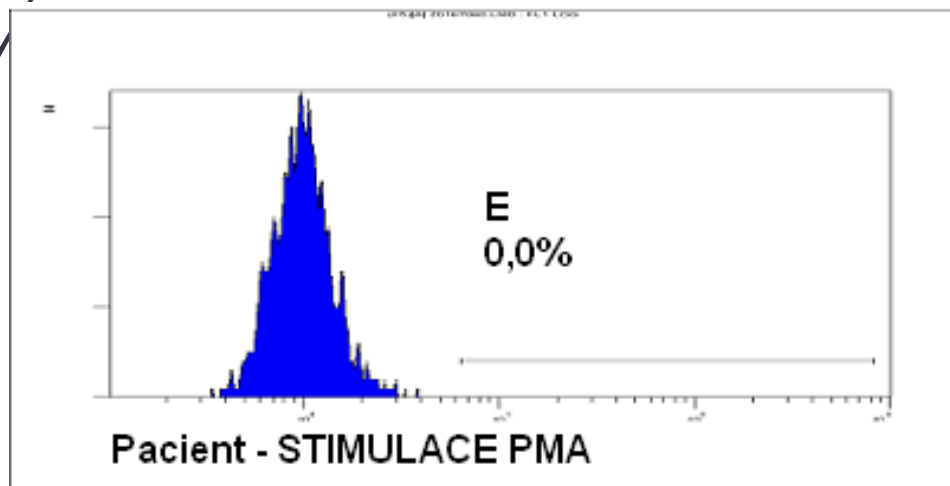
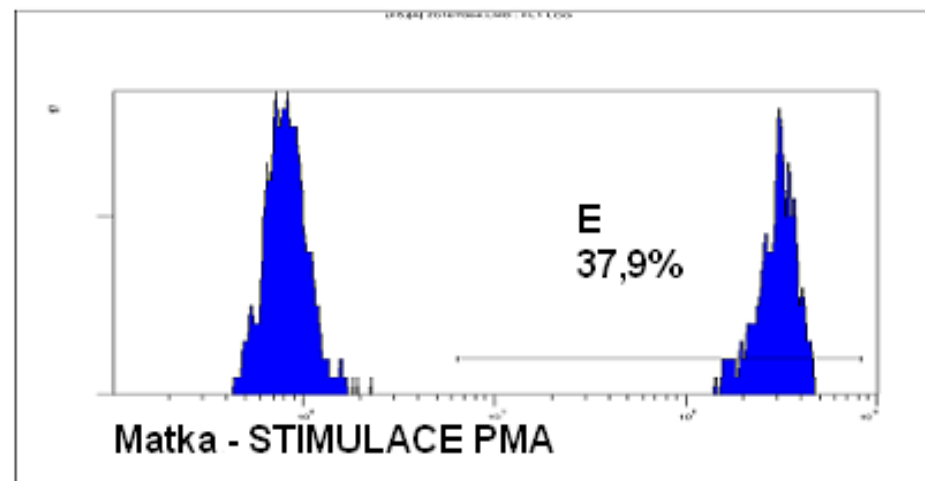
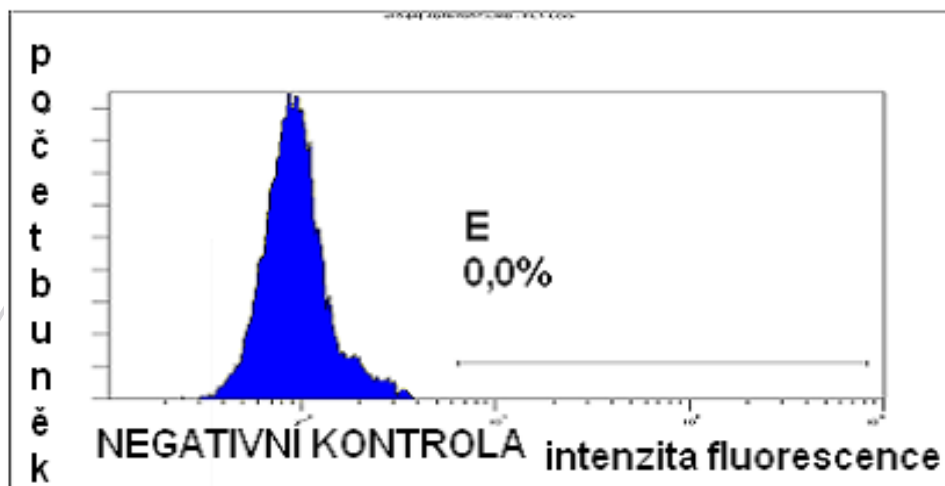


GCD

De-novo mutace (autosomálně recesivní)



GCD X-vázaná





Myeloperoxidáza (MPO, MXX)

- Oxidoreduktáza
- Obsažena v granulích neutrofilů a monocytů
- Přeměňuje peroxid vodíku na kyselinu chlornou (až 50 krát toxičtější)
- NETóza - MPO obsažena v síti tvořené jaderným materiálem
- Negativní regulace pomocí syntézy NO – tvorba nitrosylových komplexů

Deficience myeloperoxidázy

► Deficience vrozená:

1. částečná - výskyt cca 1:2000
2. úplná - výskyt cca 1:4000

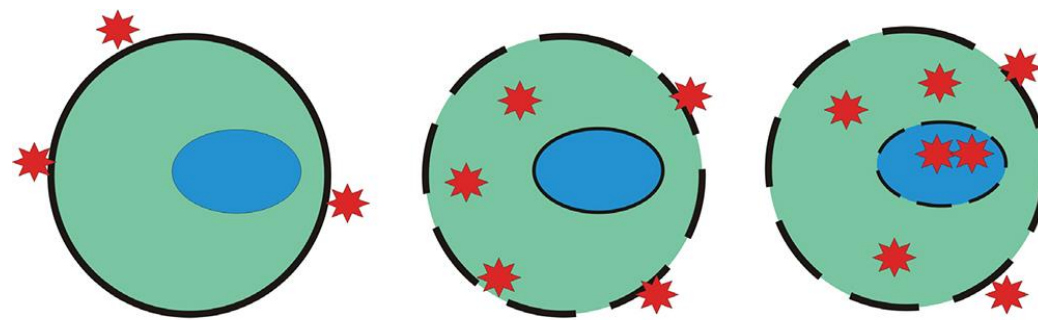
- Dědičnost - autosomálně recesivní
- Až 50% pacientů klinicky asymptomatických
- Závažný průběh nemoci – 5-10% postižených (časté infekce, zejména plísně)

► Deficience získaná:

- diabetes mellitus, těžké infekce, nedostatek železa, intoxikace olovem, diseminované tumory, některé leukemie

MPO – příprava vzorku

- 1 pacient – 2 zkumavky
- Značení buněk pomocí anti-CD14 (vyčlenění granulocyty, monocyty)
- Promytí
- **Fixace a permeabilizace membrán (MPO je intracelulární)**
- Pouze jedna zkumavka -značení protilátkou anti-MPO
- Druhá zkumavka se neznačí – slouží jako izotypová kontrola
- Hodnocení - % MPO pozitivních granulocytů a monocytů
- Norma 75 -100%



Unpermeabilized

Digitonin

Triton X-100

Deficit MPO

Exprese MPO - monocyty

ZDRAVÁ
KONTROLA

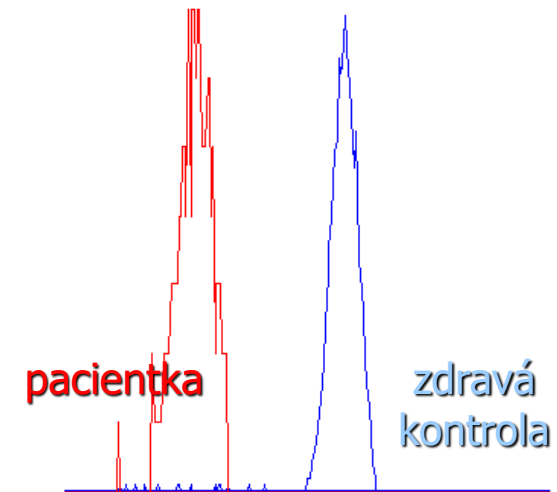
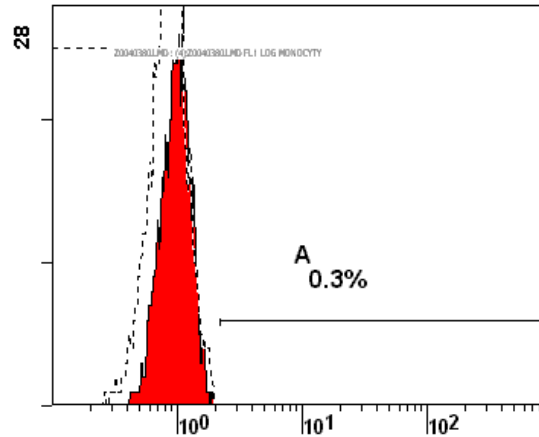
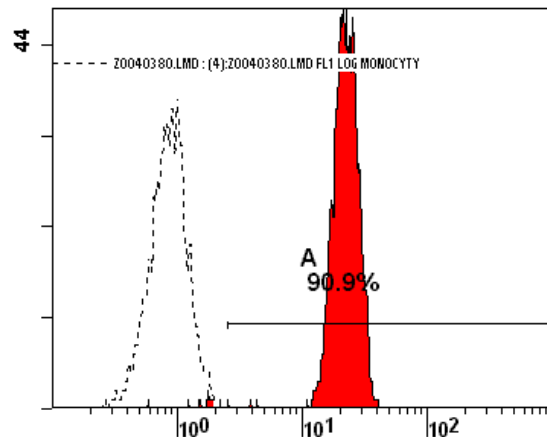
PACIENTKA

SROVNÁNÍ

(6):Z0021369.LMD FL1 LOG MONOCYTY

(5):Z0040381.LMD FL1 LOG MONOCYTY

■ MPO FITC
■ MPO FITC



MPO FITC

MPO FITC

Deficit MPO

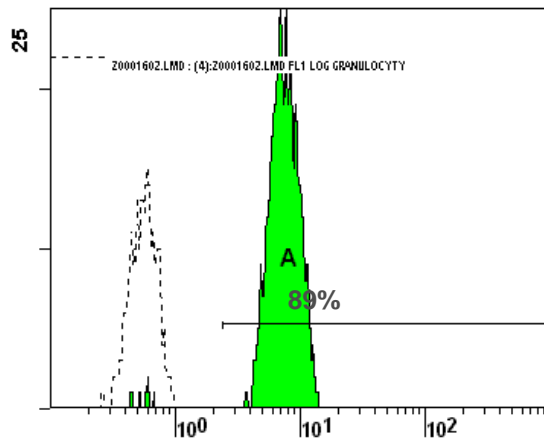
Exprese MPO - granulocyty

ZDRAVÁ
KONTROLA

PACIENTKA

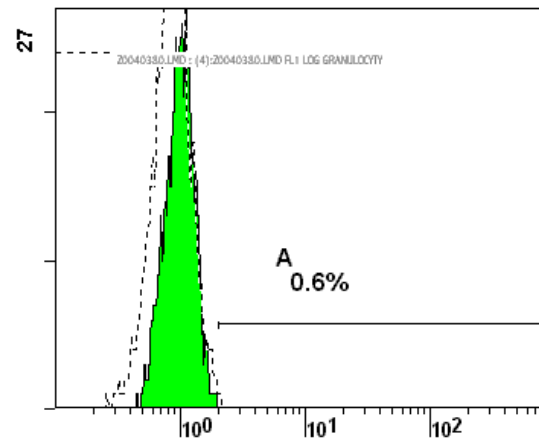
SROVNÁNÍ

(2):Z0019678.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



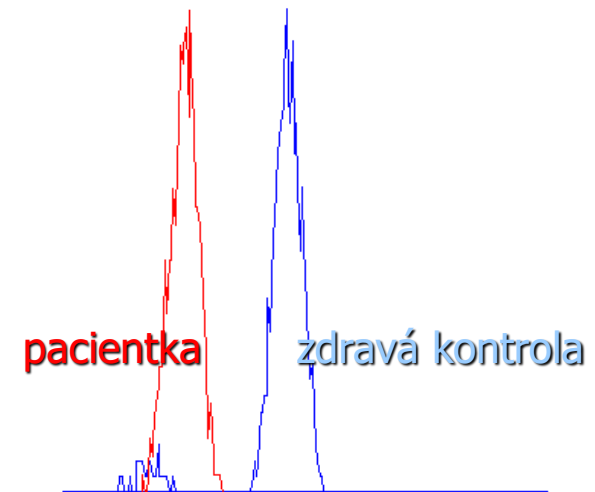
MPO FITC

(6):Z0040381.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



MPO FITC

■ MPO FITC
■ MPO FITC



Deficit MPO

Burst test - stimulace E. coli

ZDRAVÁ
KONTROLA

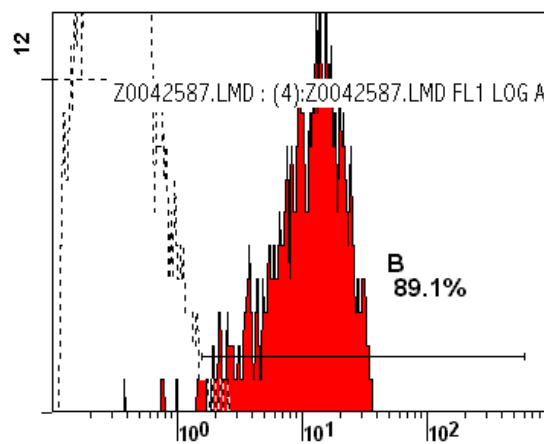
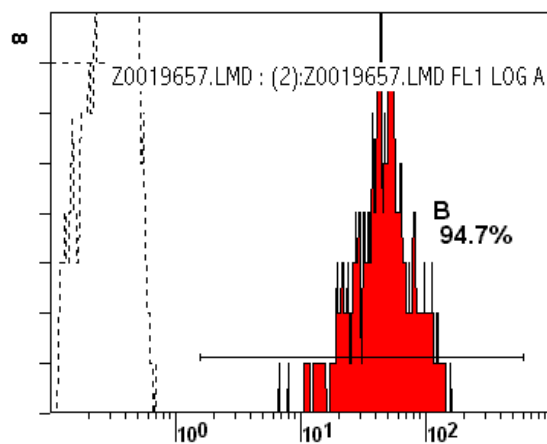
PACIENTKA

SROVNÁNÍ

(3):Z0019658.LMD FL1 LOG A

(1):Z0040296.LMD FL1 LOG A

■ STIMULACE E.C.
■ STIMULACE E.C.



STIMULACE E.C.

STIMULACE E.C.

Počet aktivovaných
buněk: 95%

Počet aktivovaných
buněk: 89%

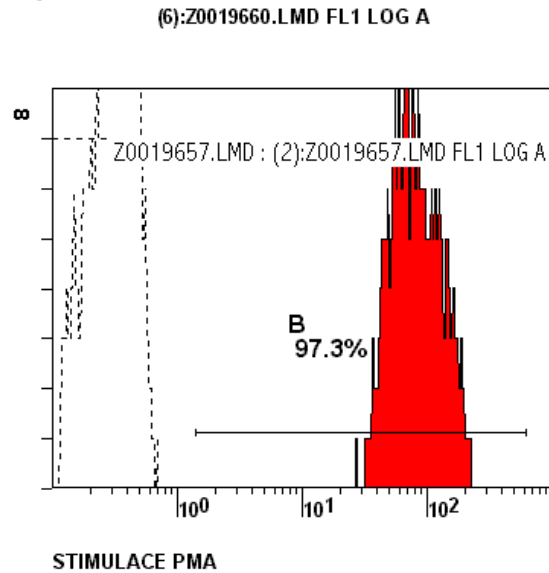
Stimulační index: 163

Stimulační index: 22

Deficit MPO

Burst test - stimulace PMA

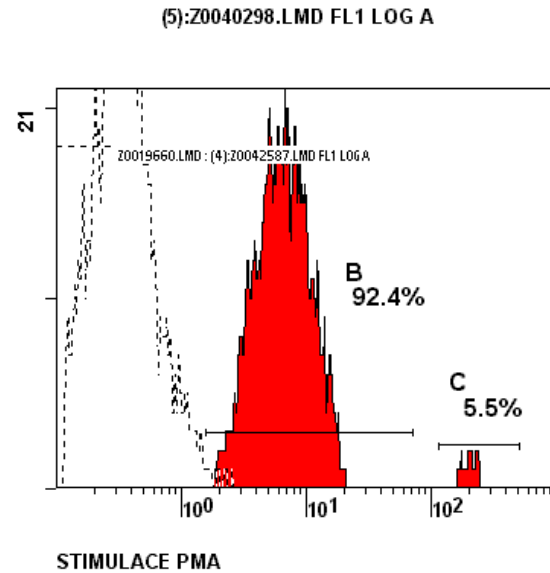
ZDRAVÁ KONTROLA



Počet aktivovaných
buněk: 97%

Stimulační index: 281

PACIENTKA



Počet aktivovaných buněk:
92% a 6%

Stimulační index: 23 a 201

SROVNÁNÍ

■ STIMULACE PMA
■ STIMULACE PMA

