

Vyšetření funkce fagocytů

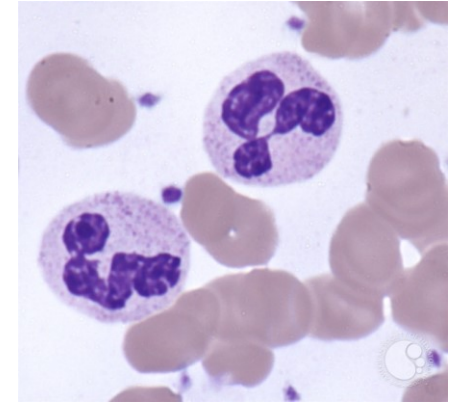
Mgr. Julie Štichová

Výkonné buňky nespecifické imunity

Profesionální fagocyty

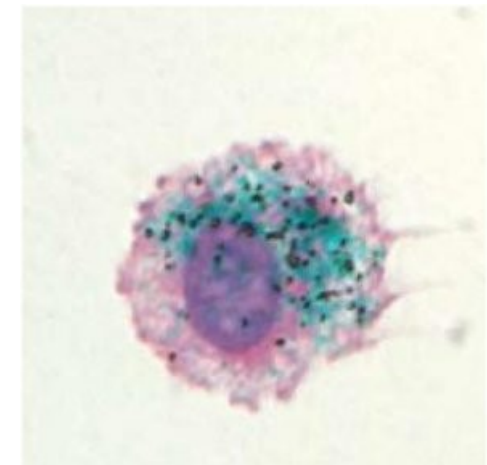
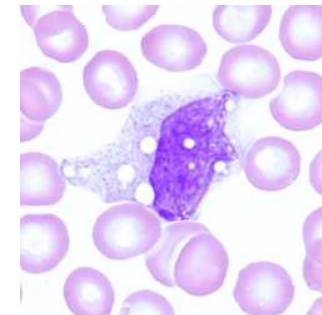
➤ Neutrofilní granulocyty

- Tvoří 50 – 70 % z WBC
- Nízká fagocytární kapacita – „mikrofágy“
- Krátká životnost



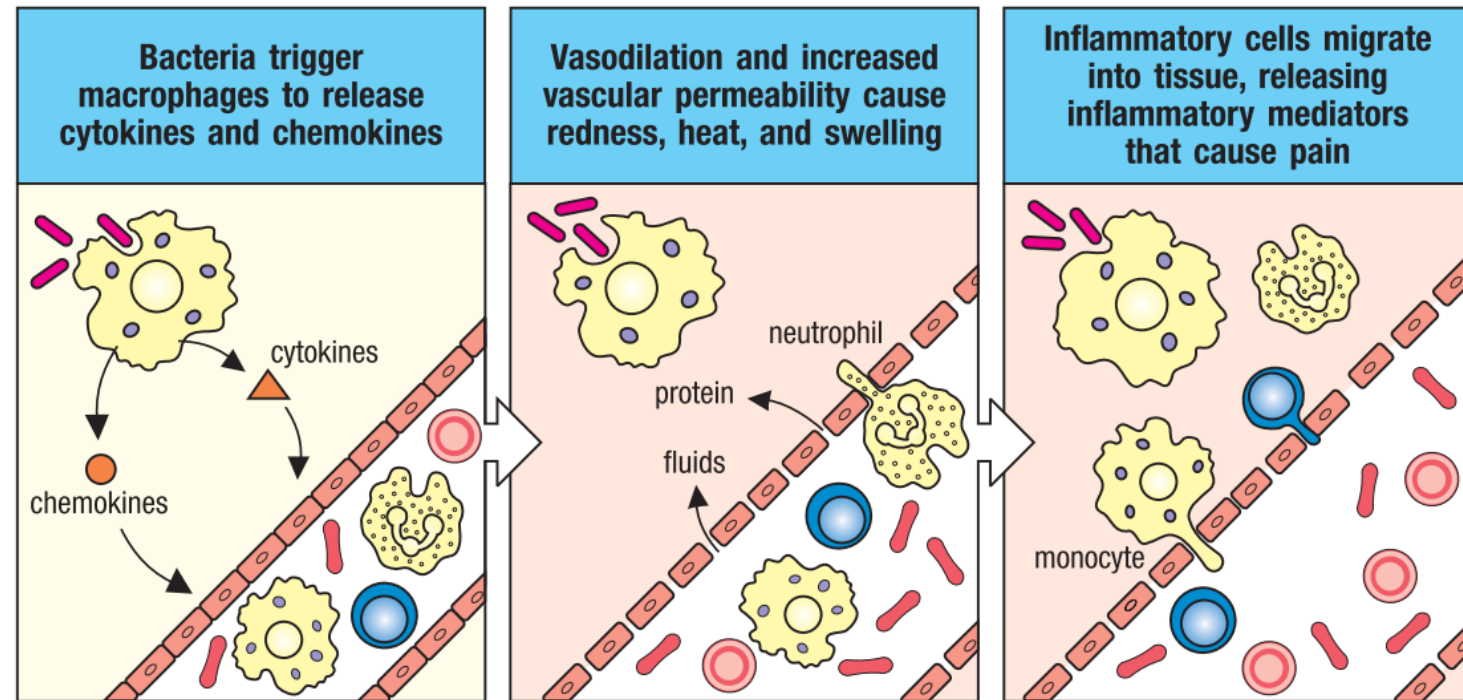
➤ Monocyty

- 2-12 % z WBC
- Z cirkulace přecházejí do tkání kde diferencují v makrofágy
- Dlouhá životnost
- Vyšší fagocytární kapacita



První obranná linie

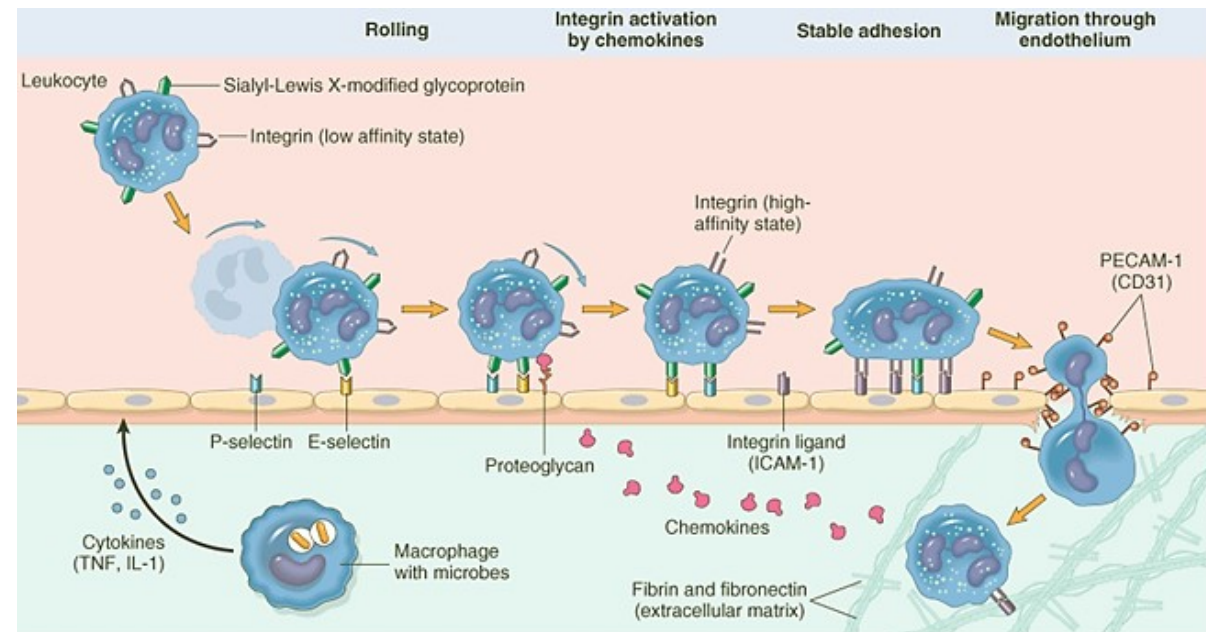
- Poranění tkání → aktivace tkáňových makrofágů
- Produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů
- Rozvoj zánětu, lákání neutrofilů do místa infekce, indukce syntézy proteinů akutní fáze v játrech, vzrůst teploty (hypothalamus)



Průnik do místa infekce

1. ADHEZE

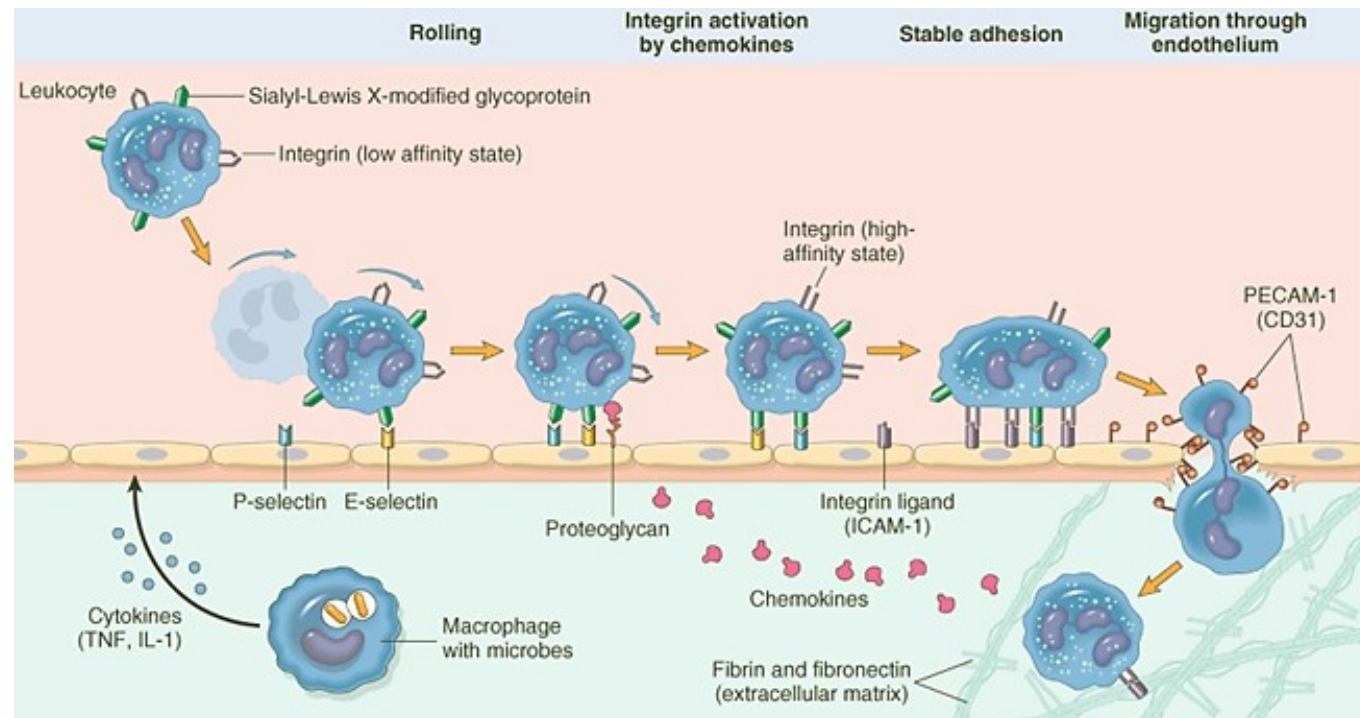
- Endotelie – vlivem prozánětlivých cytokinů exprese adhezivních molekul
- Průběh ve 2 fázích:
 - Fáze 1: E a P selektiny - reverzibilní vazba granulocytů – rolling
 - Fáze 2: Pokud během rollingu přetrvává zánětlivý signál, následuje ireverzibilní vazba na endoteliální stěnu – LFA na povrchu neutrofilu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



Průnik do místa infekce

2. Extravazace, diapedéza

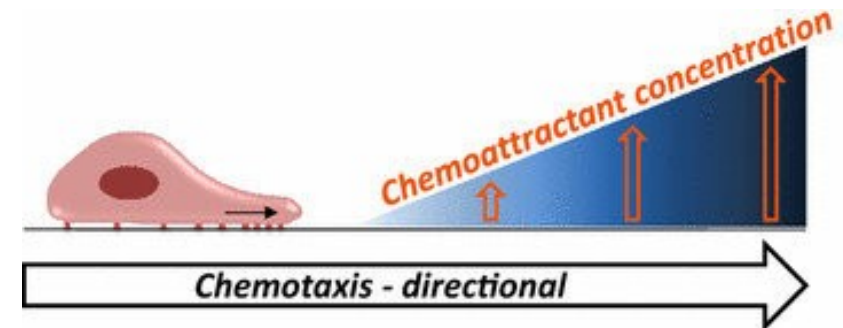
- Prostup skrze endotelie
- PECAM, JAM, CD99
- Paracelulární - hlavní
- Transcelulární



Průnik do místa infekce

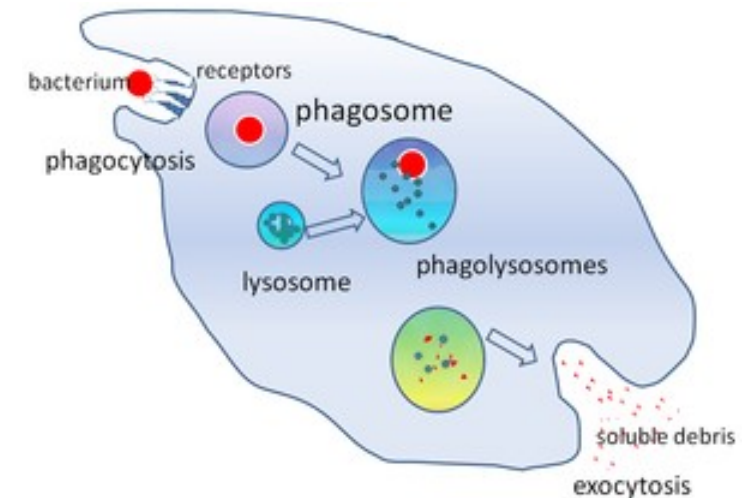
3. Chemotaxe

- ▶ 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 → přístup 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
 - ▶ **Digesce -splynutí fagosomu s lysozomy – konečná degradace**
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku nezávislé
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku závislé





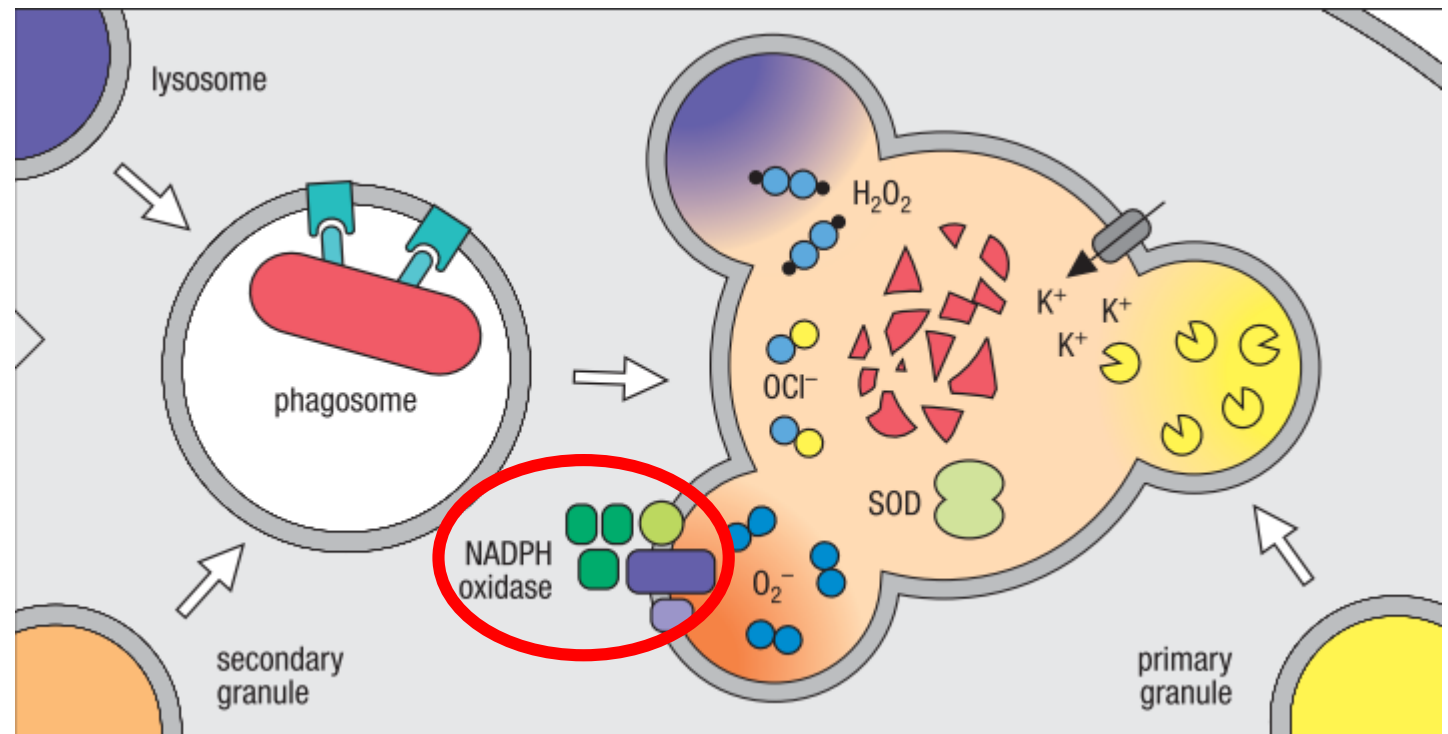
Mechanismy zabíjení na O₂ nezávislé

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

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

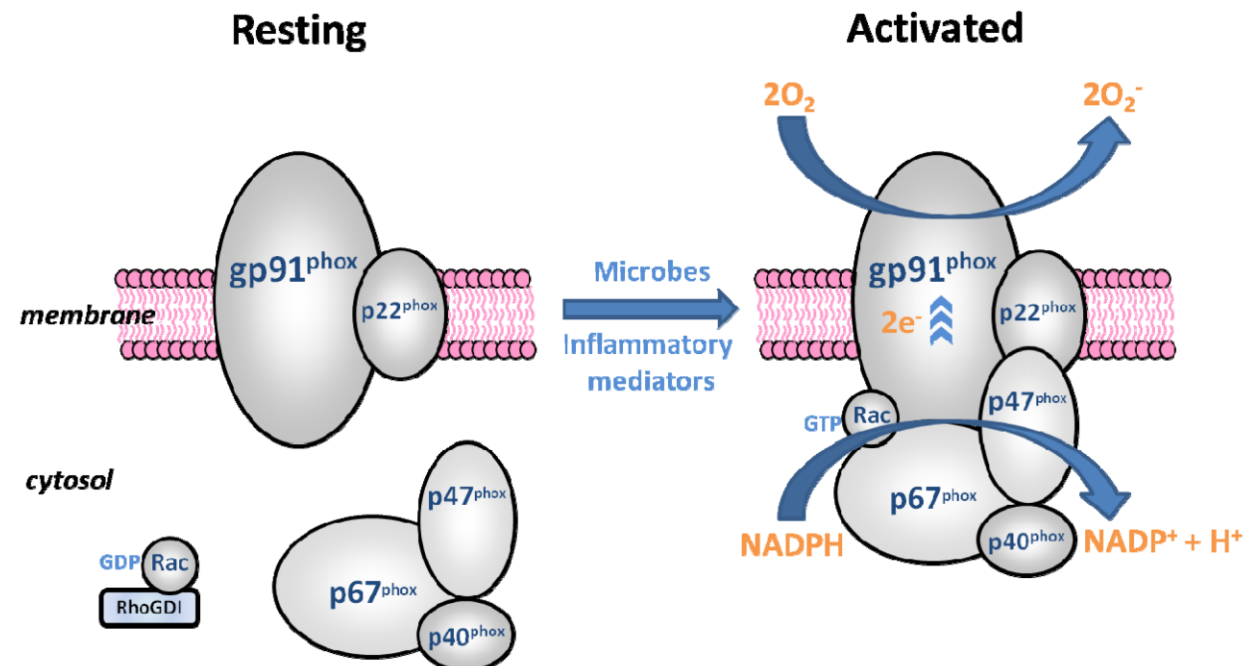
Mechanismy zabíjení na O₂ závislé

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

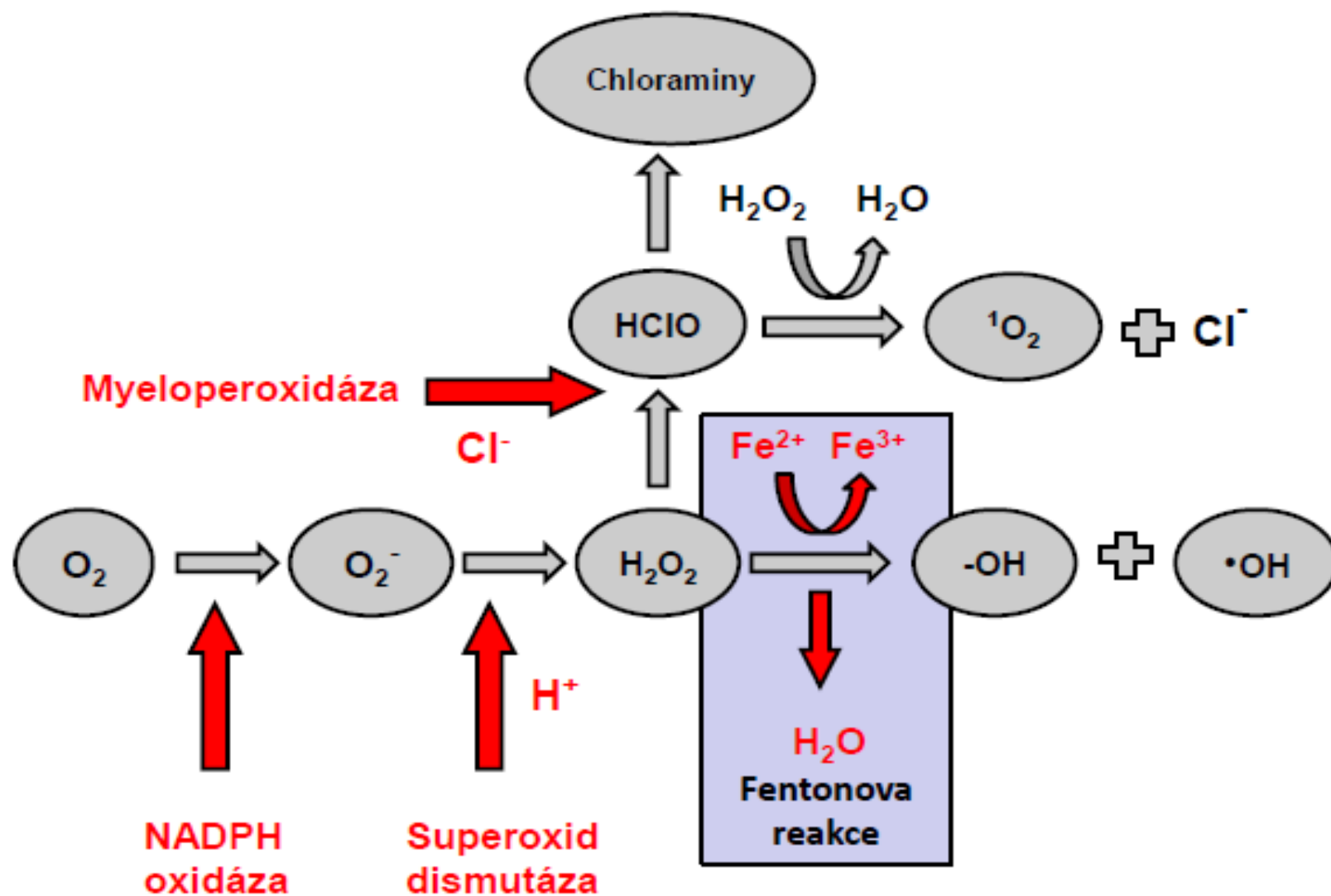


NADPH oxidáza

- ▶ Intracelulární lokalizace - membrány
- ▶ 6 podjednotek (2 v membráně fagolysosomů, 4 v cytosolu (klidový stav))
- ▶ Aktivace – signální kaskáda spuštěná receptory – fosforylace → propojení membránových a cytoplazmatických podjednotek

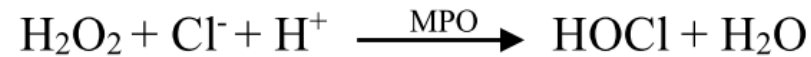


NADPH oxidáza a tvorba reaktivních kyslíkových mediátorů (ROS)

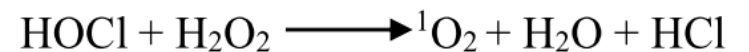


Myeloperoxidáza

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

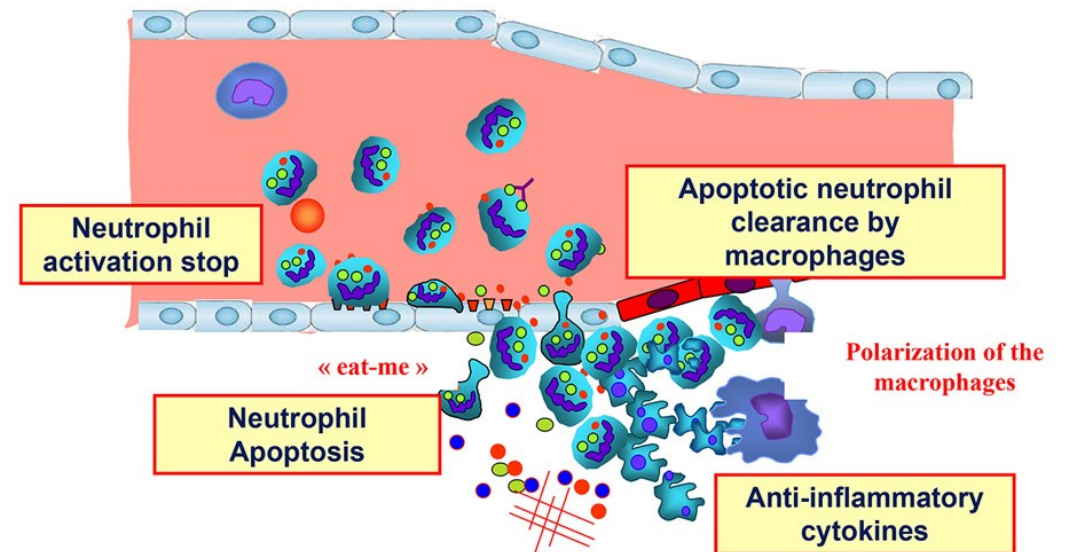


- Kyselina chlorná může být substrátem dalších reakcí, při kterých vzniká hydroxylový radikál a signletový kyslík – lipoperoxidace membrán → smrt fagocytující buňky



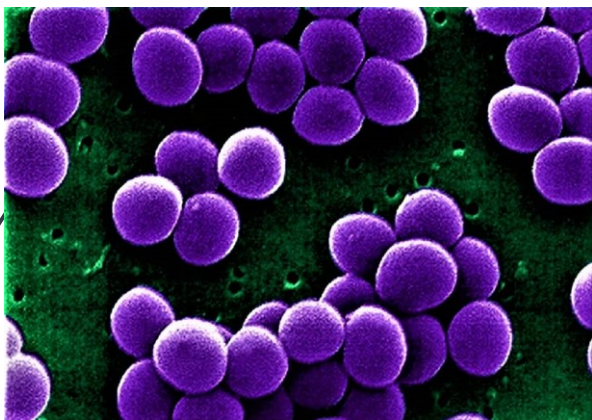
Závěrečná fáze fagocytózy

- 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)

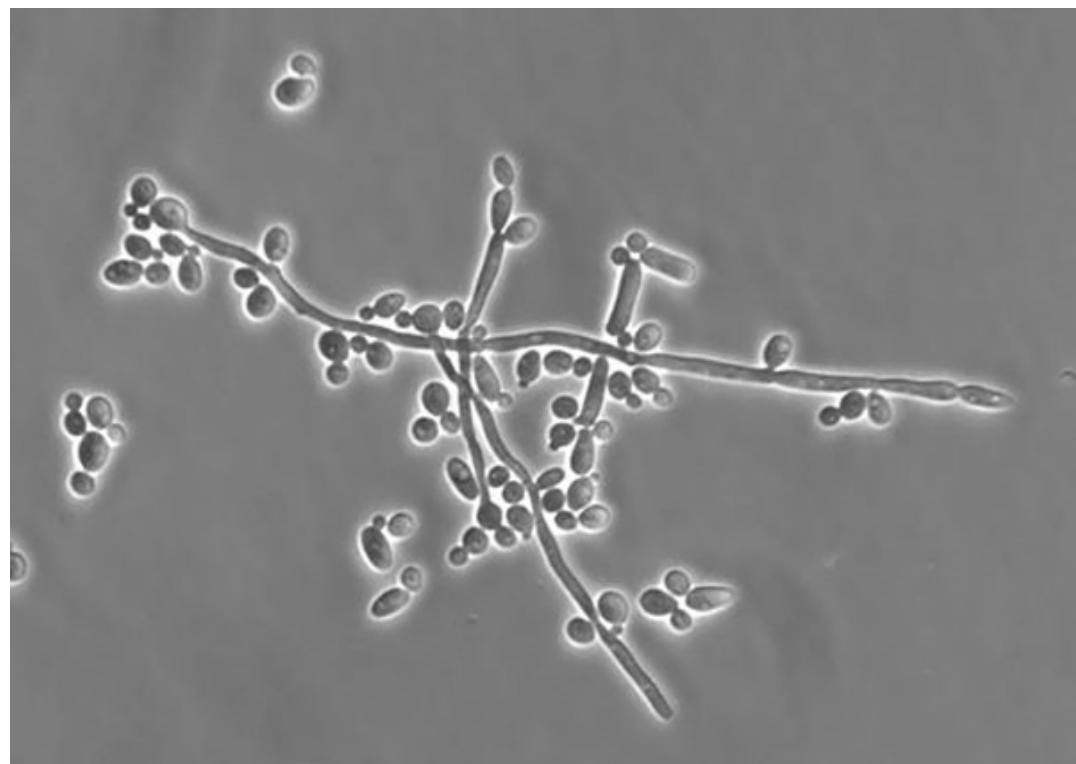


Neutrofilý nedisponují pouze fagocytózou!

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



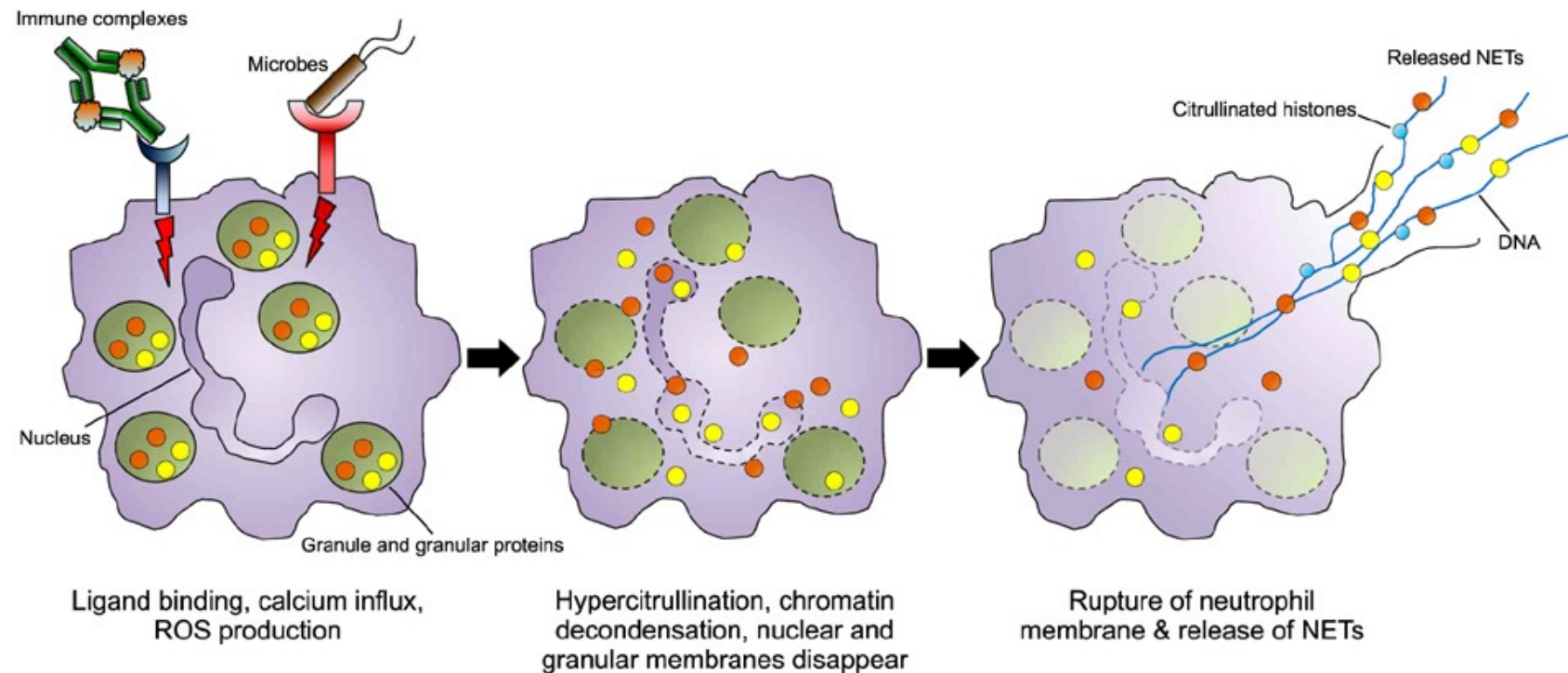
Staphylococcus aureus – mohutná biochemická aktivita – produkce hydrolytických enzymů → zahubí fagocyty dříve, než se k bakterii vůbec stihnou dostat



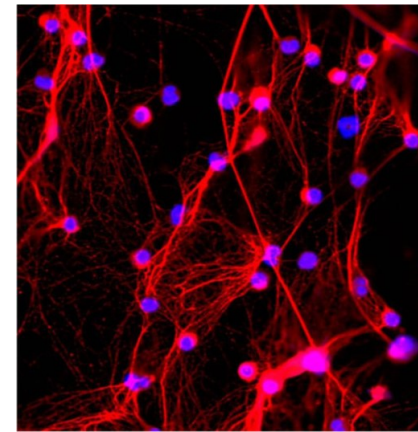
Pseudomycelia *Candida albicans* jsou příliš velké a fagocyt je nedokáže pohltnout

NETóza

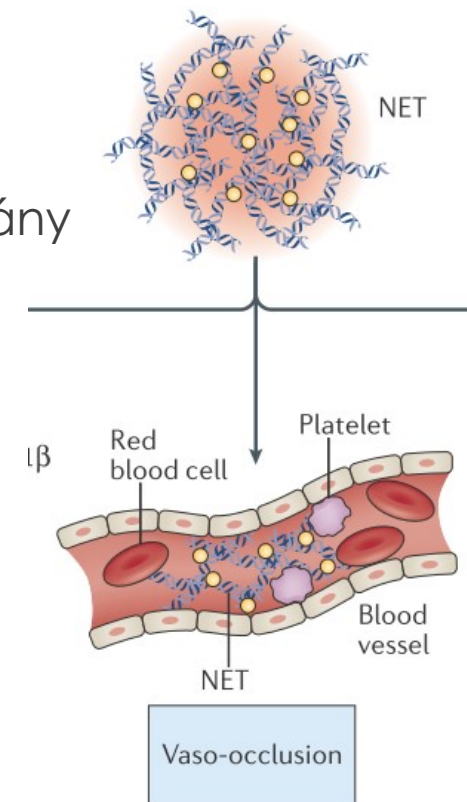
- ▶ Nový typ buněčné smrti
- ▶ Reaktivní kyslíkové mediátory tvořené NADPH oxidázou jsou druhými posly
- ▶ Jádro - dochází k citrulinaci histonů (peptidylarginindeimináza 4 – PAD4), rozvolnění jaderného chromatinu a jeho vypuzení do extracelulárního prostoru



NETóza



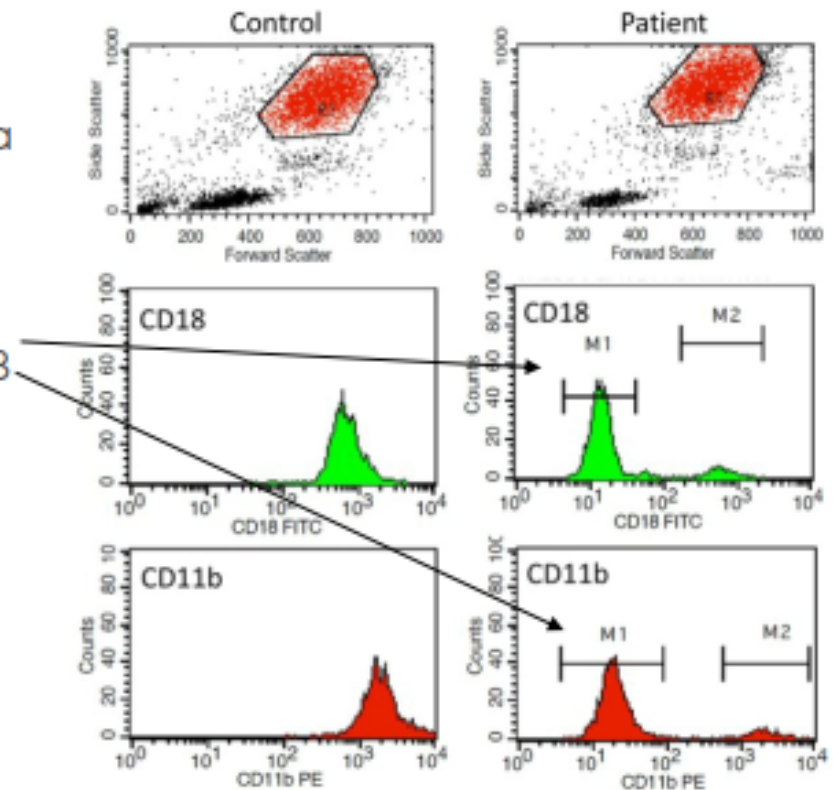
- Vzniká síť tvořená jaderným materiálem, obsahující MPO a některé další antibakteriální peptidy z granulí neutrofilů
- Do procesu NETózy vstupuje pouze malá část z aktivovaných neutrofilů
- Účel – většinou boj s velkými patogeny, které nemohou být zfagocytovány
 - MPO, cadheliciny, defenziny – mikrobicidie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



Vyšetření fagocytózy

Adheze

- Deficit adhezivních molekul integrinů (**CD11b/CD18**), které jsou nezbytné pro adhezi fagocytů na endotelie
- Deficit CD11b/CD18** způsobuje imunodeficit zvaný jako **LAD** syndrom (leukocyte adhesion deficiency)
- Projevy – z důvodu neschopnosti fagocytů přestoupit skrze endoteliální výstelku → zvýšená náchylnost k infekcím, tvorba zánětlivých ložisek s minimem hnisu, výrazná akumulace fagocytů v periferní krvi, nedostatek v místě zánětu
- Laboratorní detekce – stanovení exprese CD11b/CD18 na povrchu fagocytů → u LAD syndromu deficit CD11b/CD18



Vyšetření fagocytózy

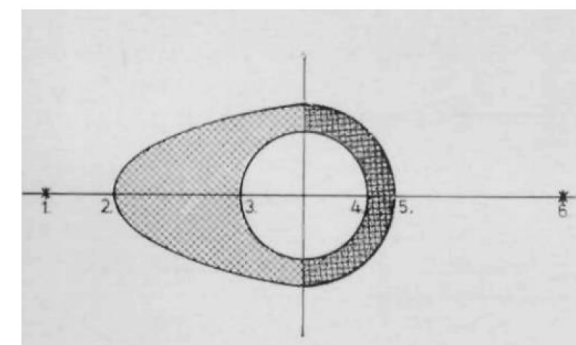
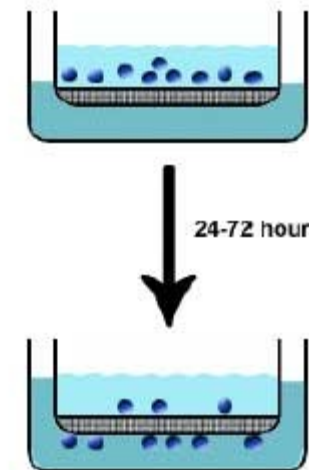
➤ 2. Test chemotaxe

➤ Boydenova komůrka

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

➤ Migrace pod agarózou

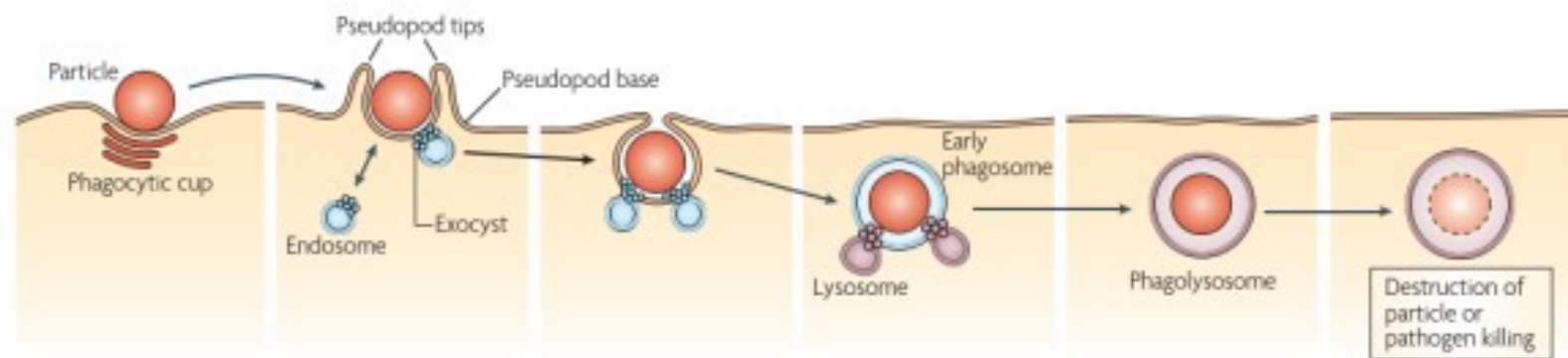
- Do agarózového gelu se vyříznou 2 jamky – do jedné se pipetuje suspenze vyšetřovaných buněk, do druhé chemoatraktant
 - Buňky migrují směrem k jamce s chemoatraktantem
 - Po inkubaci 4 h se gel usuší a obarví
 - Odečítá se vzdálenost, kterou buňky urazily od středu jamky
- Nejčastější klinické projevy snížené chemotaxe fagocytů → **recidivující flegmonózní záněty kůže a sliznic**



Vyšetření fagocytózy

➤ 3. Test ingesce

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



Vyšetření fagocytózy

➤ 4. Mikrobicidní test

- Vyšetření funkce celého procesu fagocytózy – sleduje se schopnost fagocytů pohltnout a usmrtit živý mikroorganismus
- Princip - inkubace plné krve s kvasinkou *Candida albicans*
- Fagocyty candidy usmrtí pokud mají schopnost fagocytózy v pořádku
- Následuje osmotická lýza fagocytujících buněk a vitální barvení **trypanovou modří** (mrtvé candidy jsou modré, živé bílé)
- Odečet poměru živých a mrtvých candid v mikroskopu

- V rutině se test nepoužívá – příliš pracný, malá výpovědní hodnota

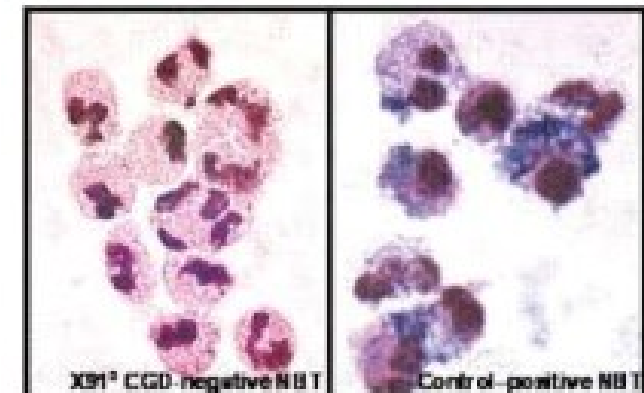
Vyšetření oxidačního vzplanutí

▶ 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
- ▶ Nátěr krve → hodnocení počtu pozitivních buněk (obsahují barevná granula)

▶ Chemiluminescence

- ▶ Stimulace konkrétního počtu buněk (PMA, fMLP, *E.coli*, zymosan)
- ▶ Přídavek chemiluminiscenční látky – vlivem oxidačního vzplanutí dochází k oxidaci chemiluminiscenční sondy* → emise fotonů → přístroj luminometr → počítání záblesků (vztažení k počtu buněk v reakci)
- ▶ Luminol, isoluminol



Vyšetření oxidačního vzplanutí Burst test (BTT)

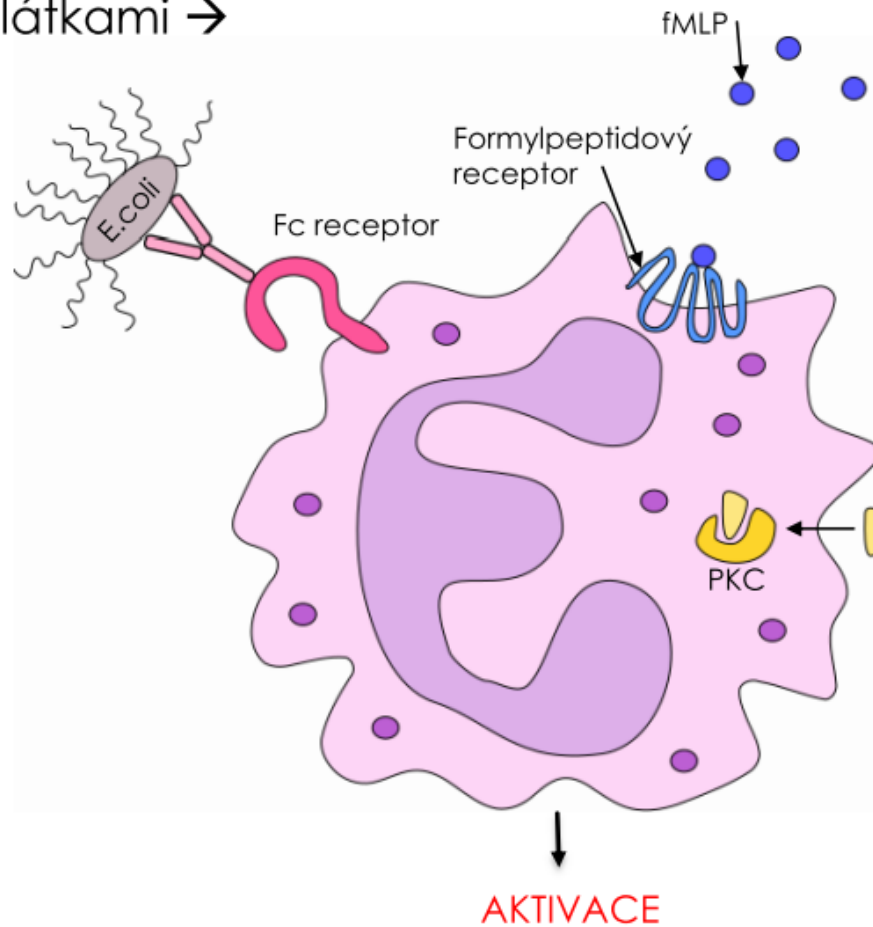
- Detekce oxidačního vzplanutí v **granulocytech** a monocytech pomocí průtokové cytometrie
- Princip – produkty oxidačního vzplanutí oxidují fluorescenční barvivo
- Funkční test
- Odběr krve do heparinu
- Nejsou stanoveny konkrétní referenční meze
- **Nutno se vzorkem pacienta vždy zpracovat i vzorek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



Burst test (BTT)

Oxidační vzplanutí může být indukováno různými způsoby

Opsonizace *E.Coli* protilátkami →
vazba na Fc receptory



Chemoatraktant fMLP – vazba
na formylpeptidové receptory
spřažené s malými G proteiny –
indukce chemotaxe a také
slabé aktivace NADPH oxidázy

PMA – nízkomolekulární látka,
přímo proniká membránou a
váže se na proteinkinázu C →
rychlá a masivní aktivace

Burst test (BTT)

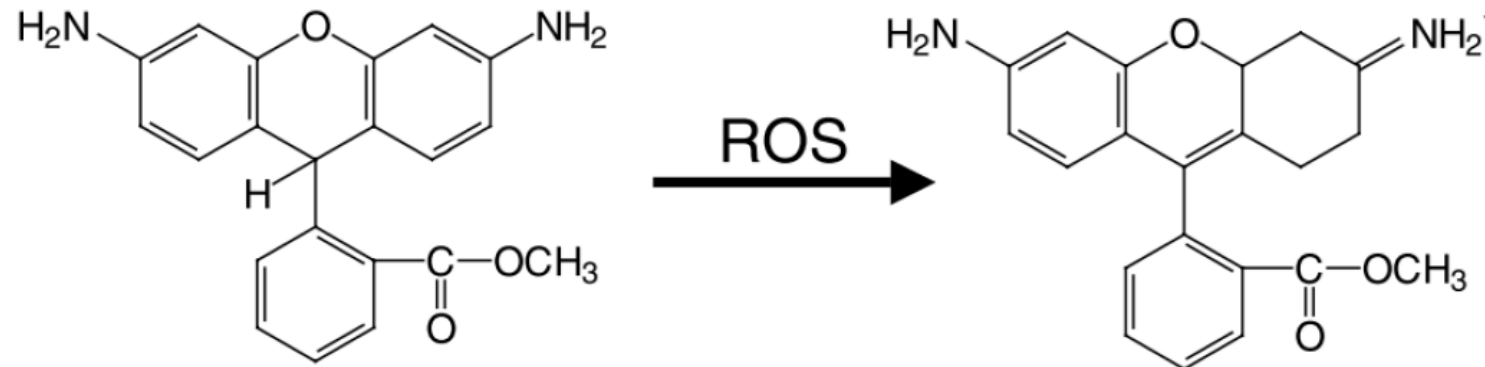
► Krok 1: Stimulace fagocytů

- **PBS** – negativní kontrola
- **E. Coli** – vazba na Fc receptory – aktivace fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K)
pozn. v reakci je nutná přítomnost opsonizujících proteinů – bez nich granulocyty na *E.coli* nereagují (např. izolované granulocyty z krve)
orientační norma > **70 %**
- **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
orientační norma > **90 %**
- Proč různé stimulace? → široké spektrum patogenů, různé cesty aktivace NADPH oxidázy
- Snaha postihnout nejčastější signální dráhy aktivace, které vedou k fosforylaci NADPH oxidázy a její aktivaci → může být defektní pouze určitá dráha aktivace

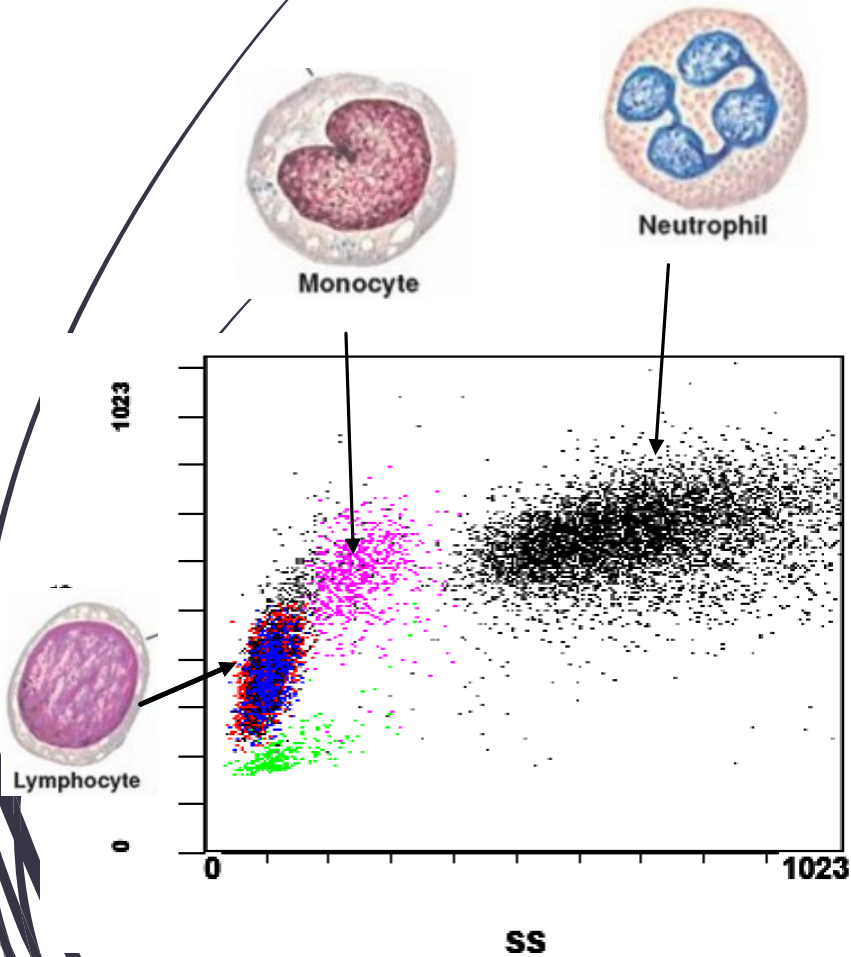
Burst test (BTT)

➤ 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

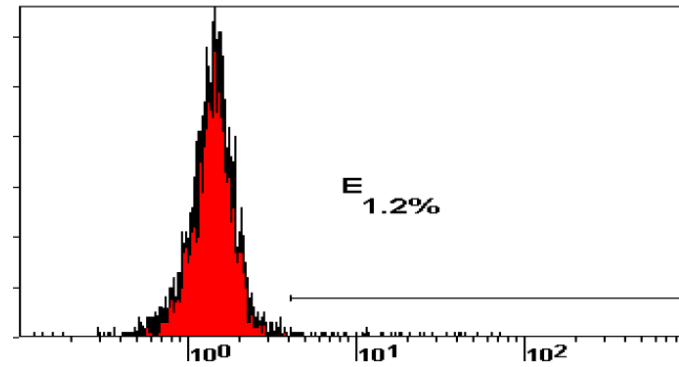


Burst test (BTT) – hodnocení



BEZ STIMULACE

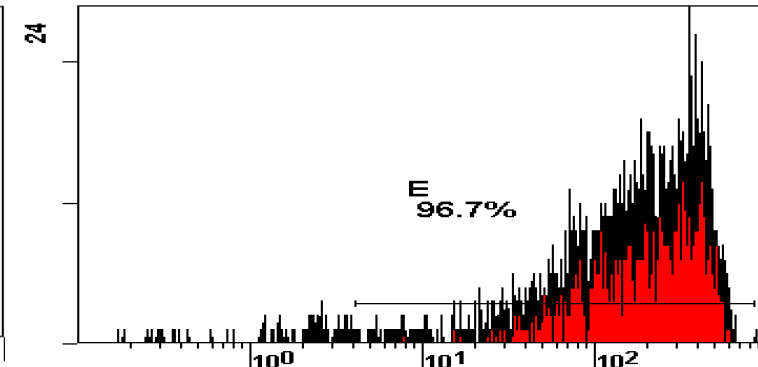
(1):Z0021459.LMD FL1 LOG A



NEGATIVNI K.

STIMULACE PMA

(4):Z0211867.LMD FL1 LOG A



STIMULACE PMA

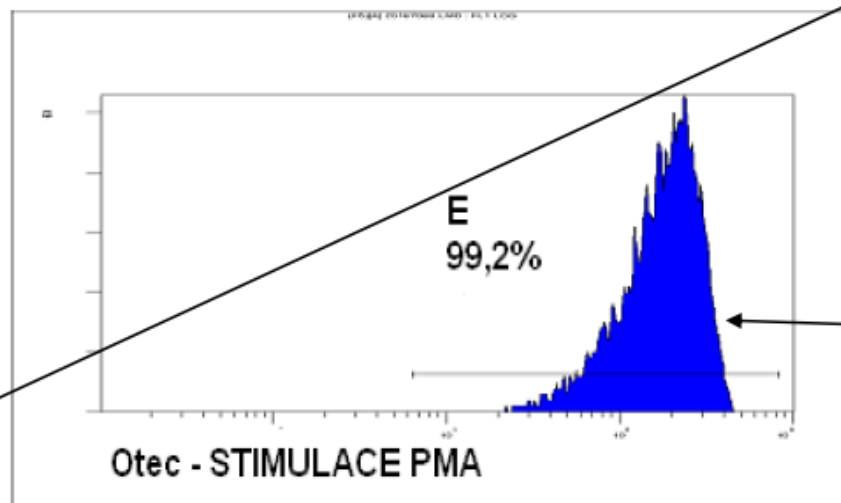
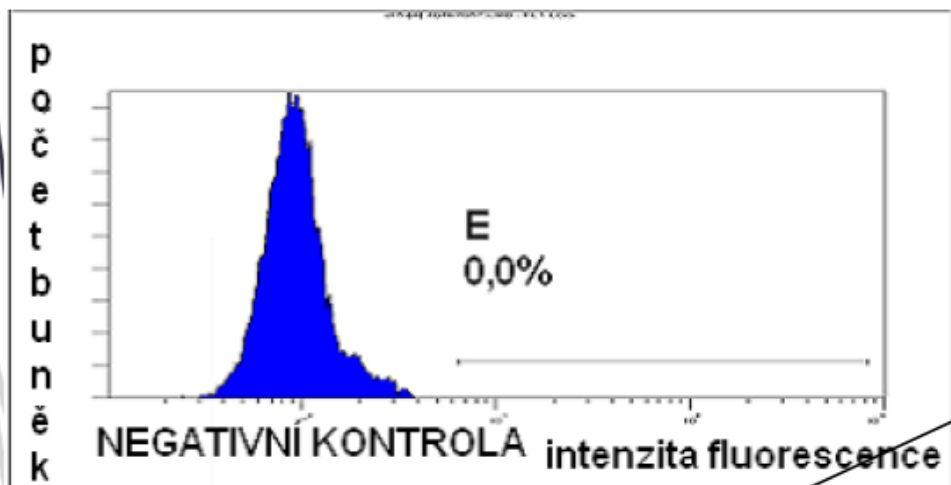
Intenzita fluorescence

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 (děti)

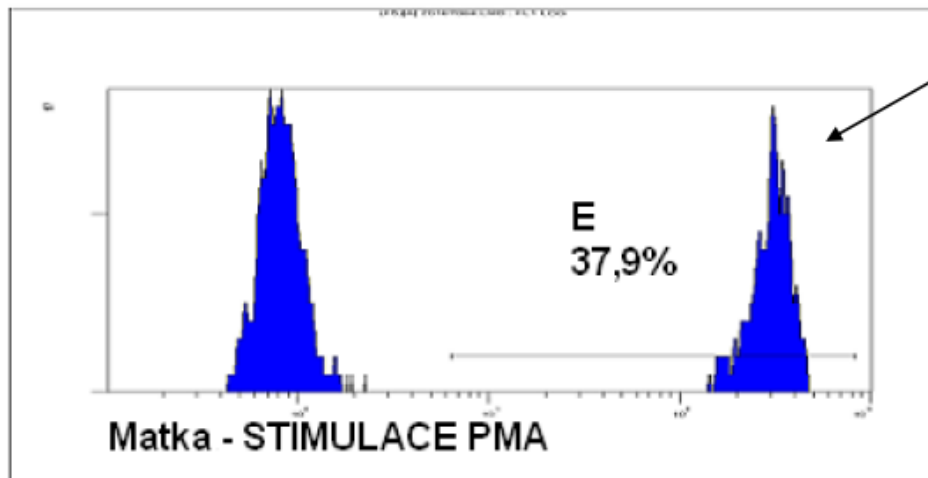
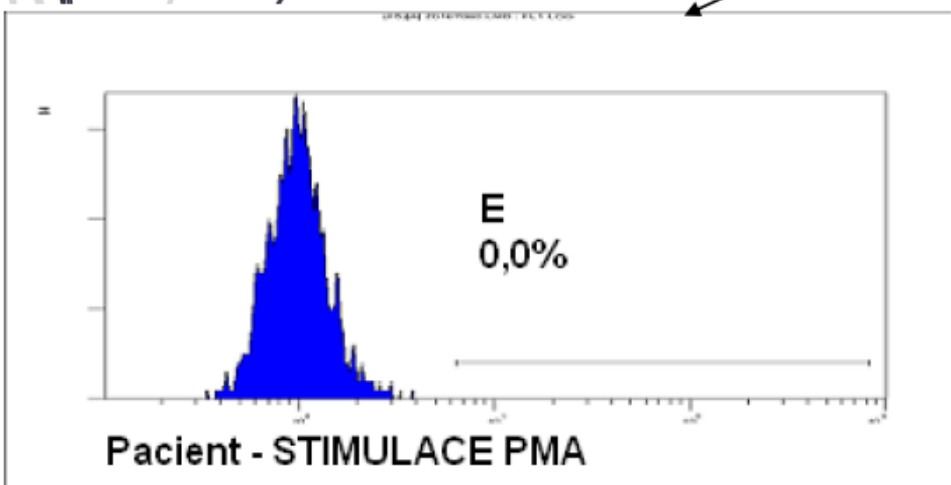


GCD X-vázaná



Pacient po stimulaci PMA nereaguje (shodný obraz s negativní kontrolou)

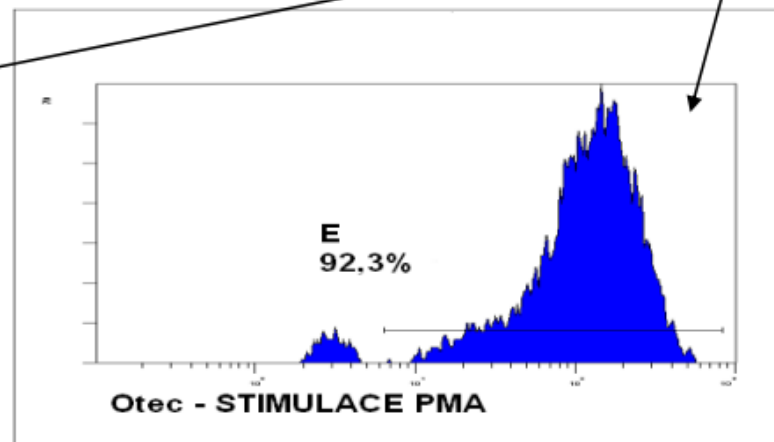
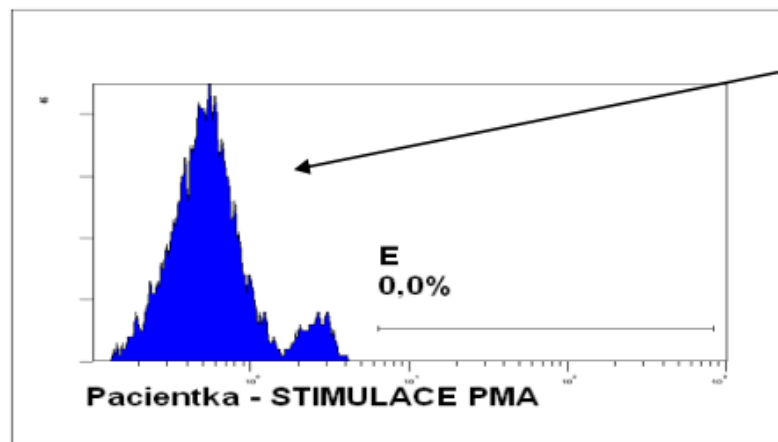
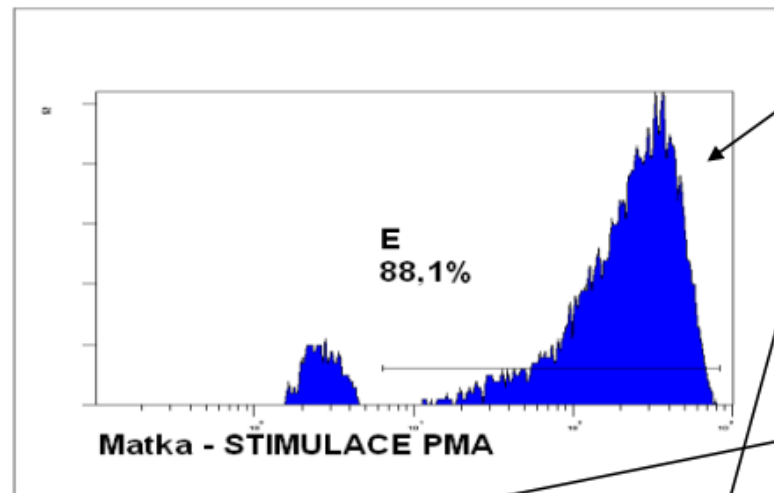
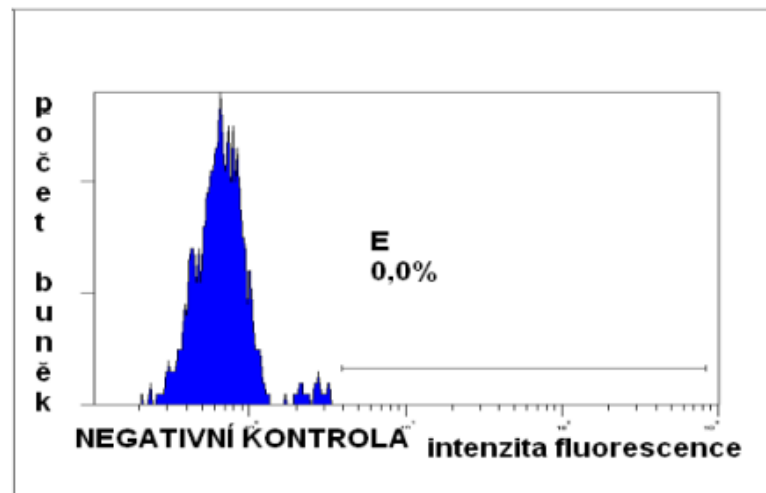
Otec má oxidační vzplanutí po PMA v normě (1 pík vpravo)



Ale matka má dvojitou populaci neutrofilů – jedna populace (pík vpravo) reaguje na stimulaci, ale druhá populace (pík vlevo) nereaguje → matka je přenašečkou mutace

GCD

de-novo mutace – autosom. recesivní



Matka i otec mají neporušenou aktivitu oxidačního vzplanutí fagocytů, zatímco jejich dítě (pacientka) po PMA vypadá shodně s negativní kontrolou

Deficience myeloperoxidázy

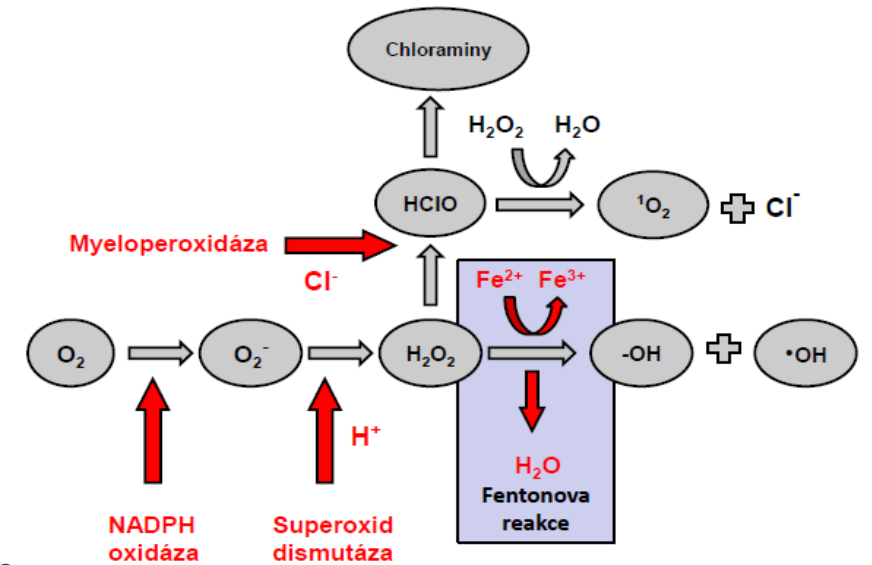
► Deficience vrozená:

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)

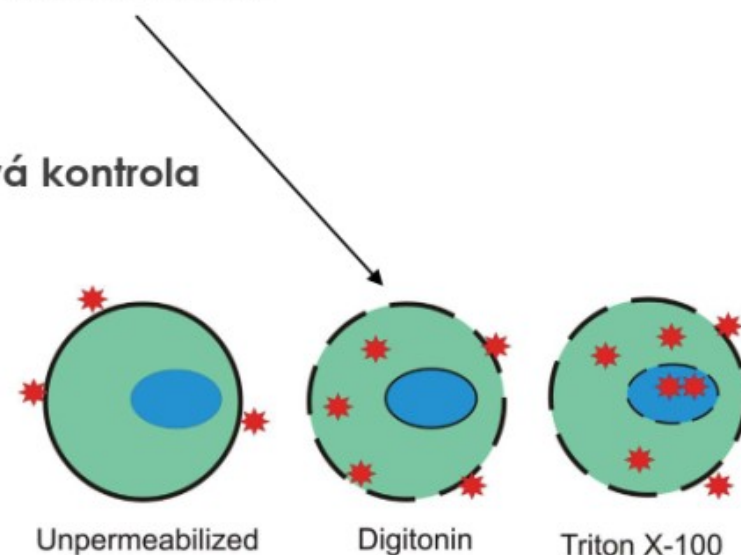
► Deficience získaná:

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



Vyšetření MPO – příprava vzorku

- 1 pacient = 2 zkumavky
- Značení leukocytů v obou zkumavkách pomocí anti-CD14 (odlišení monocytů od granulocytů)
- 30 min inkubace s protilátkou ve tmě, poté následuje promytí
- Další krok - **zcela nezbytná je fixace a permeabilizace membrán** (MPO je intracelulární marker, zatímco protilátky jsou velké molekuly, které přes neporušenou membránu přirozeně projít nemohou)
 - Permeabilizace** – vytvoření pórů do buněčné membrány (umožní průnik anti-MPO do cytoplazmy a granulí, kde se MPO přirozeně nachází)
 - Fixace** – stabilizace membrán, brání rozpadu permeabilizovaných buněk
- Jedna zkumavka - značení protilátkou anti-MPO
- Druhá zkumavka se **neznačí** anti-MPO – slouží jako **izotypová kontrola**
- Hodnocení - % MPO pozitivních granulocytů a monocytů
- Norma 75 -100%**

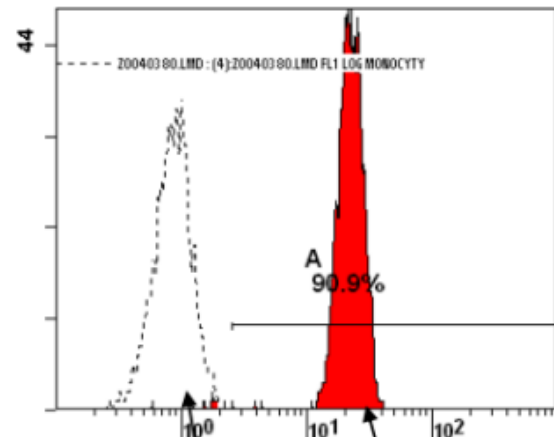


Deficit MPO

Exprese MPO - monocyty

ZDRAVÁ KONTROLA

(6):Z0021369.LMD FL1 LOG MONOCYTY



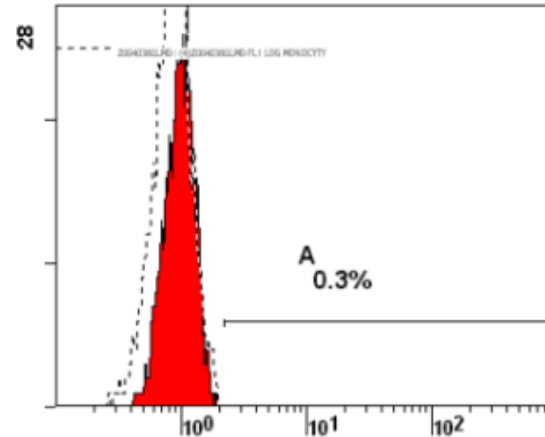
MPO FITC

Izotypová kontrola

MPO pozitivní monocyty

PACIENTKA

(5):Z0040381.LMD FL1 LOG MONOCYTY

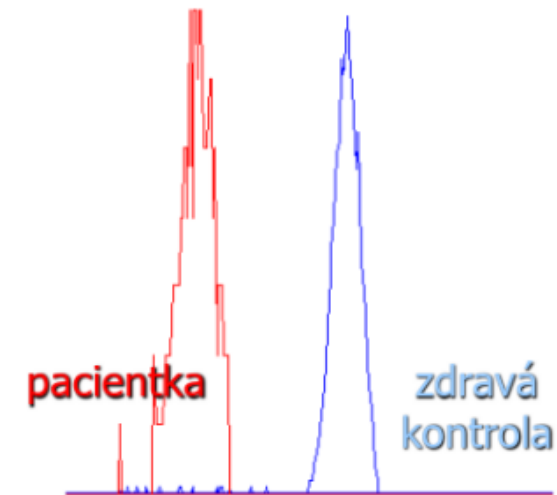


MPO FITC

U pacientky jsou monocyty MPO negativní – pík se překrývá s izotypovou kontrolou

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC
■ MPO FITC

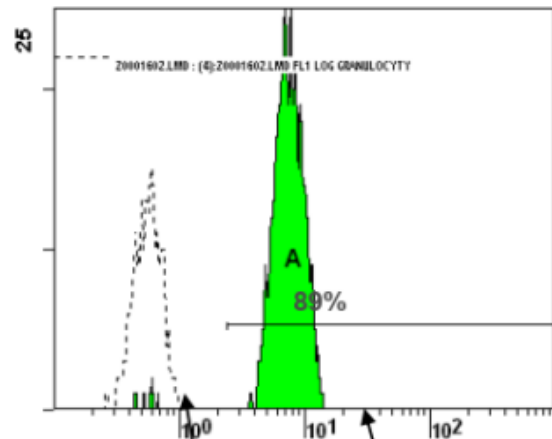


Deficit MPO

Exprese MPO - granulocyty

ZDRAVÁ
KONTROLA

(2):Z0019678.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



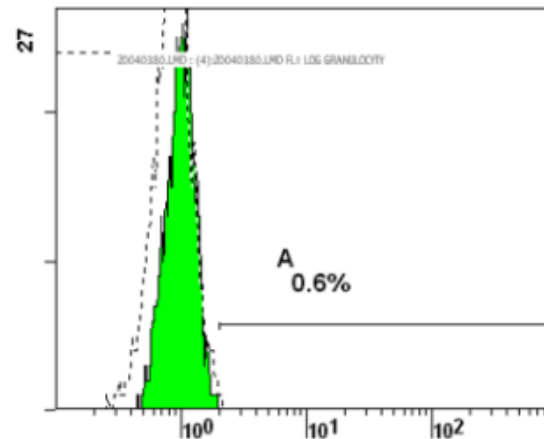
MPO FITC

Izotypová
kontrola

MPO pozitivní
granulocyty

PACIENTKA

(6):Z0040381.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



MPO FITC

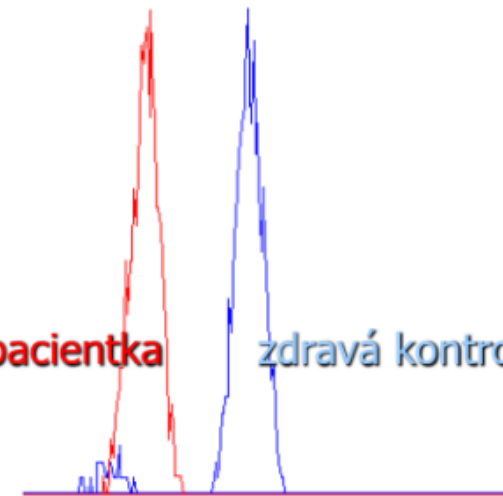
U pacientky jsou
granulocyty MPO negativní
– pík se překrývá s
izotopovou kontrolou

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC
■ MPO FITC

pacientka

zdravá kontrola

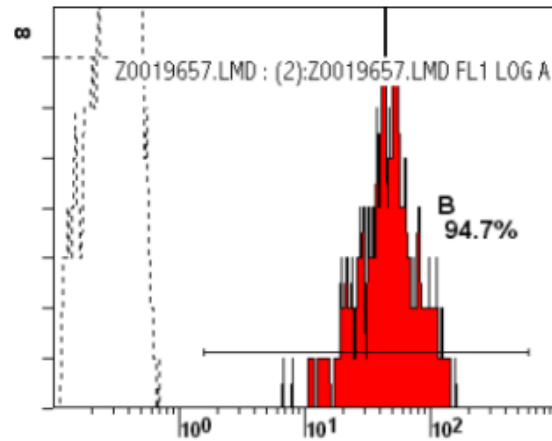


Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

Burst Test - stimulace *E. coli*

ZDRAVÁ
KONTROLA

(3):Z0019658.LMD FL1 LOG A



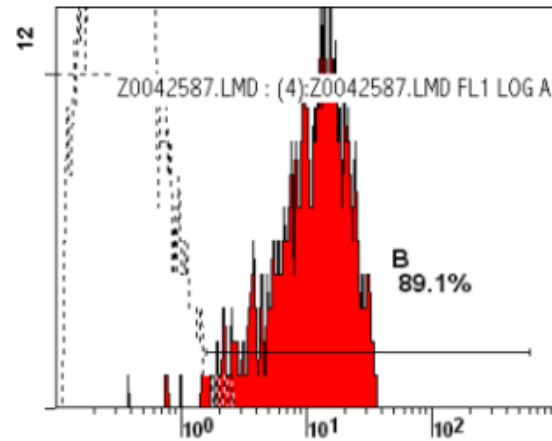
STIMULACE E.C.

Počet aktivovaných
buněk: 95%

Stimulační index: 163

PACIENTKA

(1):Z0040296.LMD FL1 LOG A



STIMULACE E.C.

Počet aktivovaných
buněk: 89%

Stimulační index: 22

SROVNÁNÍ

■ STIMULACE E.C.
■ STIMULACE E.C.

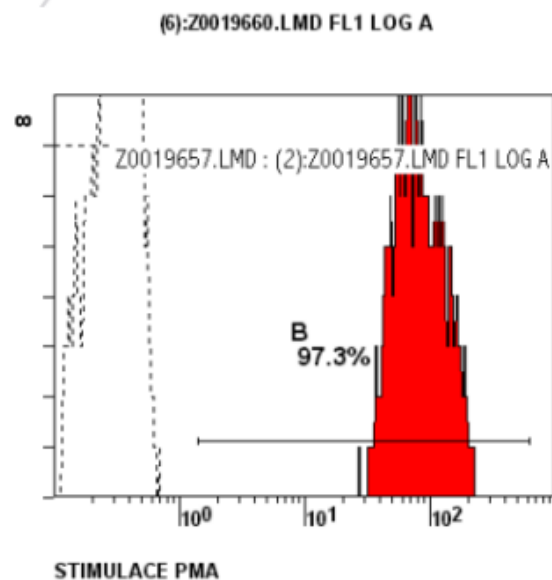


Fagocyty mají u pacientky nižší pozitivitu meanu intenzity fluorescence (posun píku doleva) na oxidační vzplanutí po stimulaci *E. coli* ve srovnání se zdravou kontrolou.

Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

Burst test - stimulace PMA

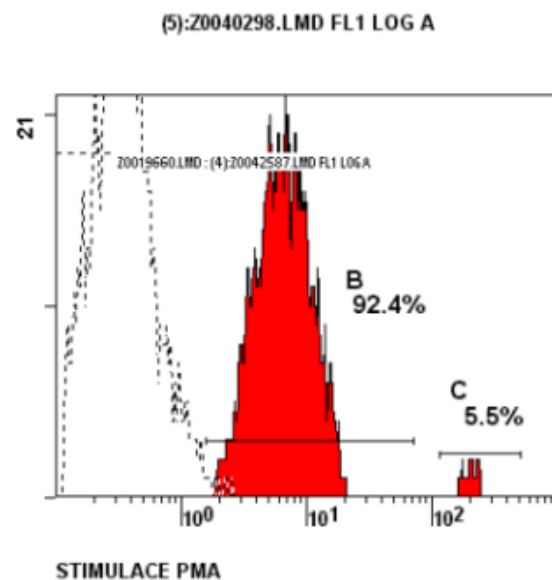
ZDRAVÁ KONTROLA



Počet aktivovaných buněk: 97%

Stimulační index: 281

PACIENTKA

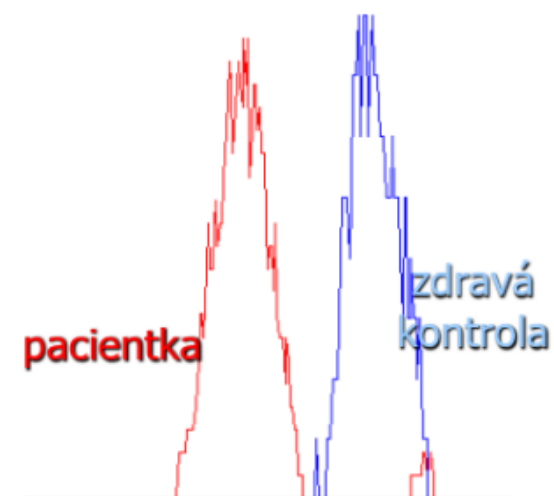


Počet aktivovaných buněk: 92% a 6%

Stimulační index: 23 a 201

SROVNÁNÍ

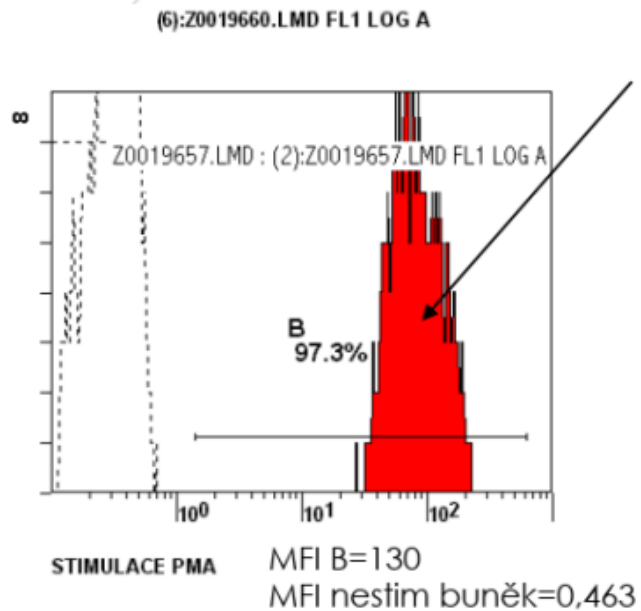
■ STIMULACE PMA
■ STIMULACE PMA



Fagocyty mají u pacientky nižší pozitivitu na oxidační vzplanutí po stimulaci PMA ve srovnání se zdravou kontrolou → doordinoval se test MPO kde se ukázalo, že pacientka je MPO deficitní

Co je stimulační index (SI)?

ZDRAVÁ KONTROLA



- Medián intenzity fluorescence daného píku (MFI) = poloha středu píku na ose x
- **Stimulační index = $\frac{\text{MFI stimulovaných buněk}}{\text{MFI nestimulovaných buněk}}$**
- **Stimulační index = $130 / 0,463 = 281$**

Stimulační index: 281