

# Vyšetření funkce fagocytů

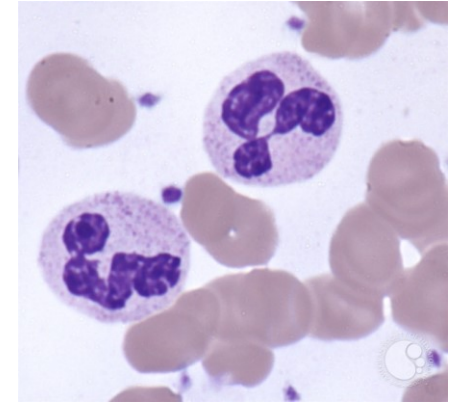
Mgr. Julie Štíhová

# Výkonné buňky nespecifické imunity

## Profesionální fagocyty

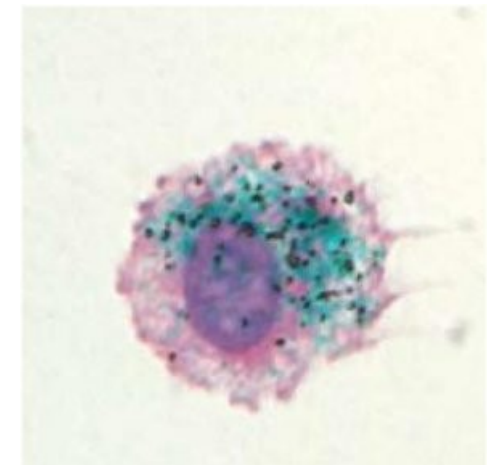
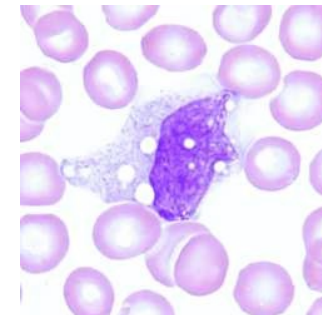
### ➤ Neutrofilní granulocyty

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



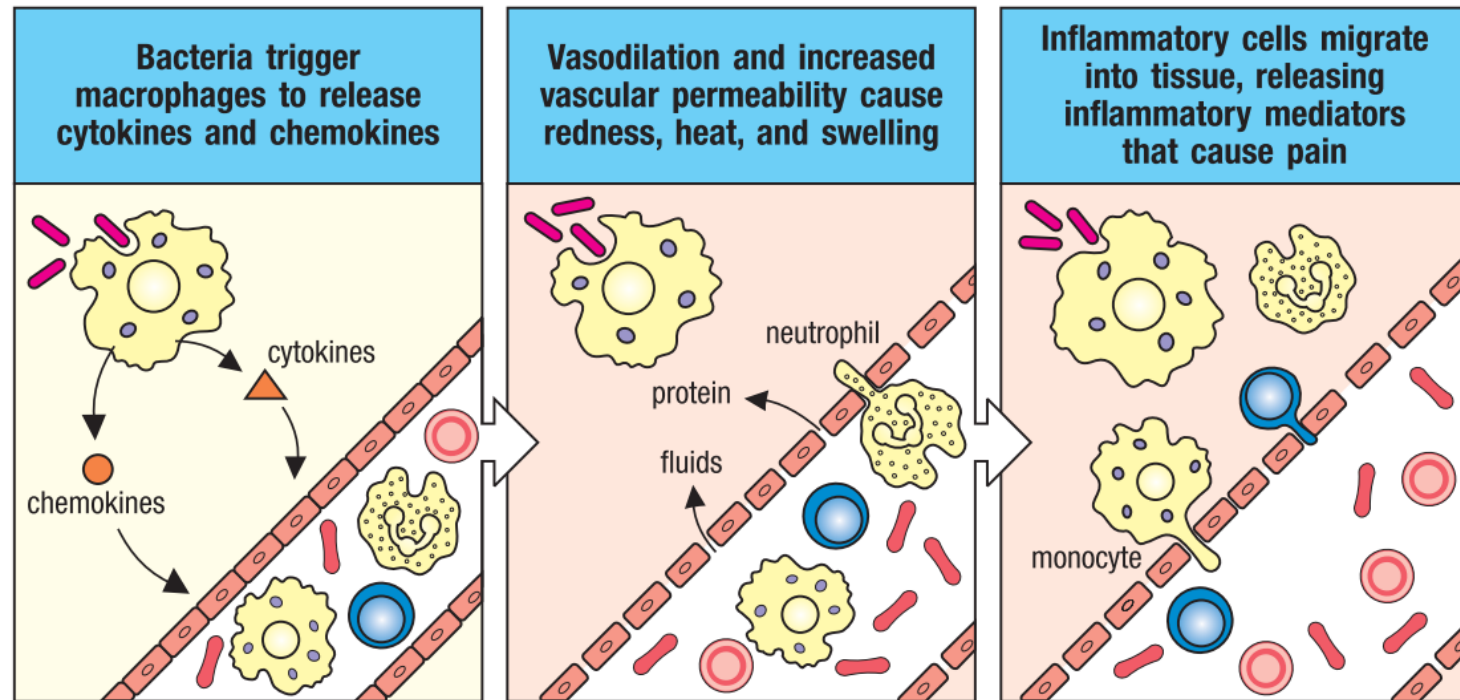
### ➤ Monocyty

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



# První obranná linie

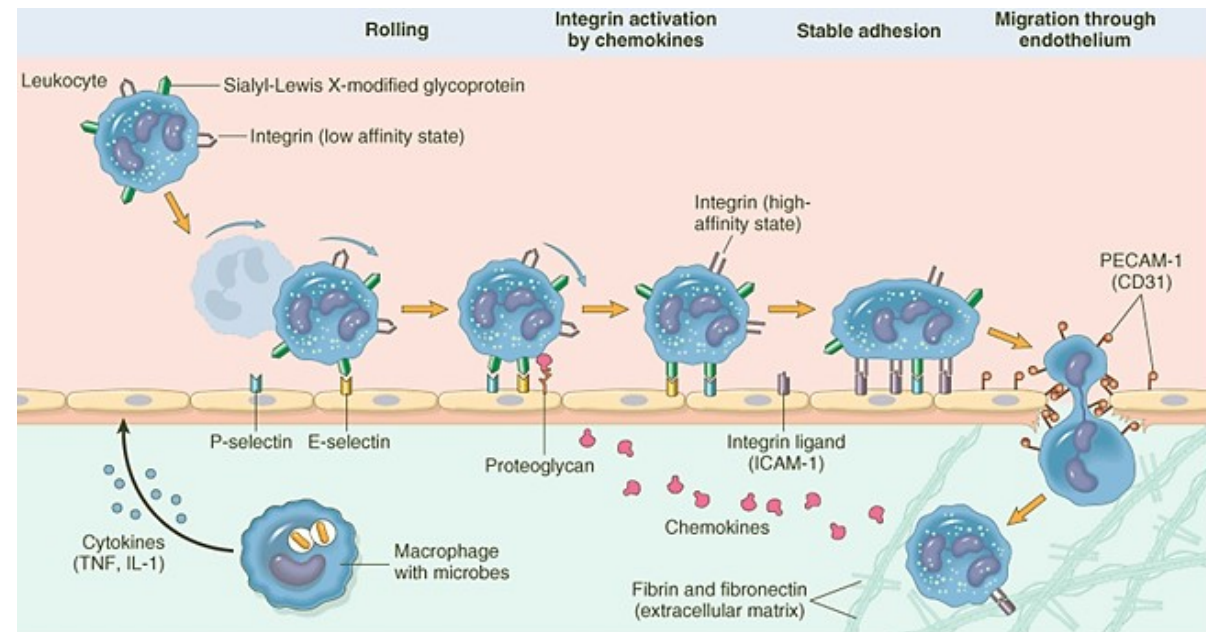
- Poranění tkání → aktivace tkáňových makrofágů
- Produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů
- Rozvoj zánětu, lákání neutrofilů do místa infekce, indukce syntézy proteinů akutní fáze v játrech, vzrůst teploty (hypothalamus)



# Průnik do místa infekce

## 1. ADHEZE

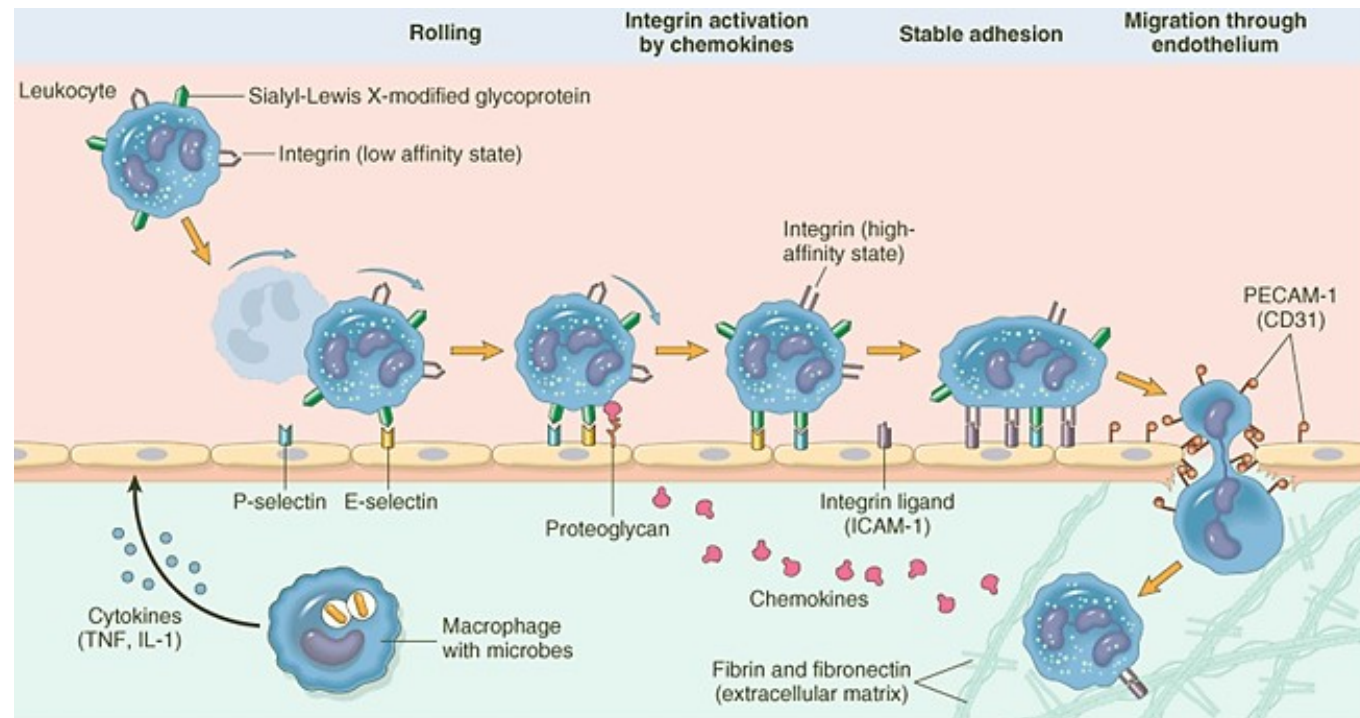
- Endotelie – vlivem prozánětlivých cytokinů exprese adhezivních molekul
- Průběh ve 2 fázích:
  - Fáze 1: E a P selektiny - reverzibilní vazba granulocytů – rolling
  - Fáze 2: Pokud během rollingu přetrvává zánětlivý signál, následuje ireverzibilní vazba na endoteliální stěnu – LFA na povrchu neutrofilu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



# Průnik do místa infekce

## 2. Extravazace, diapedéza

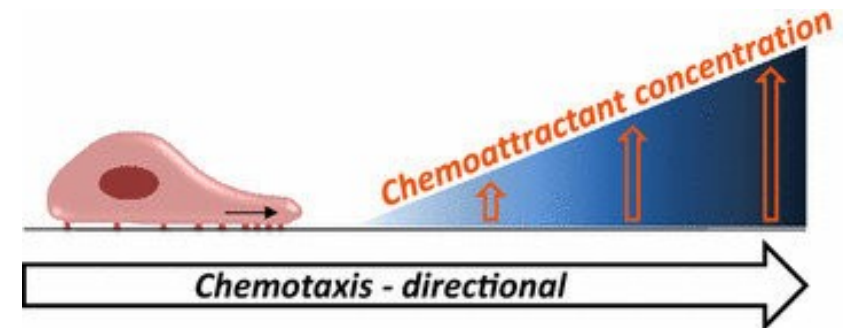
- Prostup skrze endotelie
- PECAM, JAM, CD99
- Paracelulární - hlavní
- Transcelulární



# Průnik do místa infekce

## 4. Chemotaxe

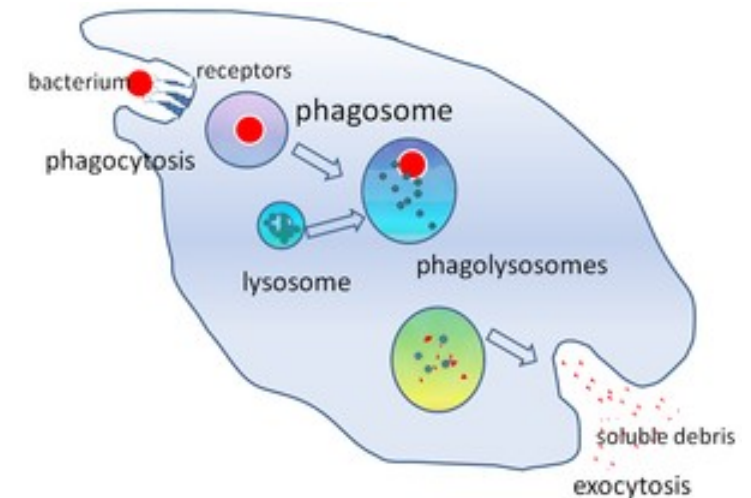
- ▶ V místě zánětu tvořeny látky s chemotaktickými účinky
  - ▶ Exogenní – fMLP
  - ▶ Endogenní – C3a, C5a, IL-8, CXCL8, CXCL-7
- ▶ Vazba na chemokinové receptory neutrofilního granulocytu
- ▶ Receptory řízený pohyb ve směru koncentračního gradientu
- ▶ Produkce hydrolytických enzymů → narušení mezibuněčné 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
  - ▶ **Digesce -splynutí fagosomu s lysozomy – konečná degradace**
    - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku nezávislé
    - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku závislé





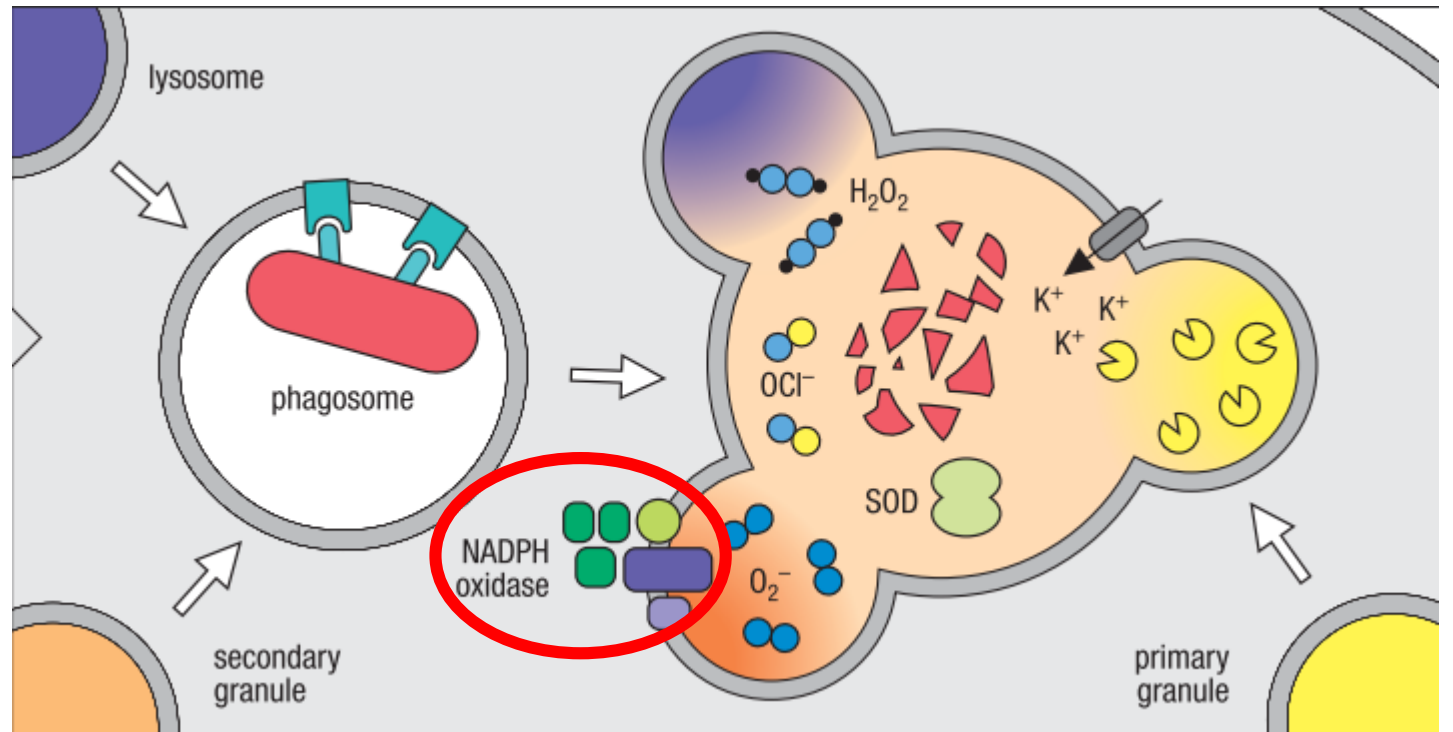
# Mechanismy zabíjení na O<sub>2</sub> nezávislé

- ▶ Antimikrobiální peptidy a enzymy
  - ▶ Kathepsiny
  - ▶ Lysozym
  - ▶ Defenziny
  - ▶ Kyselé pH
  
- ▶ Proteiny omezující dostupnost stopových prvků a vitaminů
  - ▶ Laktoferin – vyvazuje železo
  - ▶ Vitamin B12 binding protein



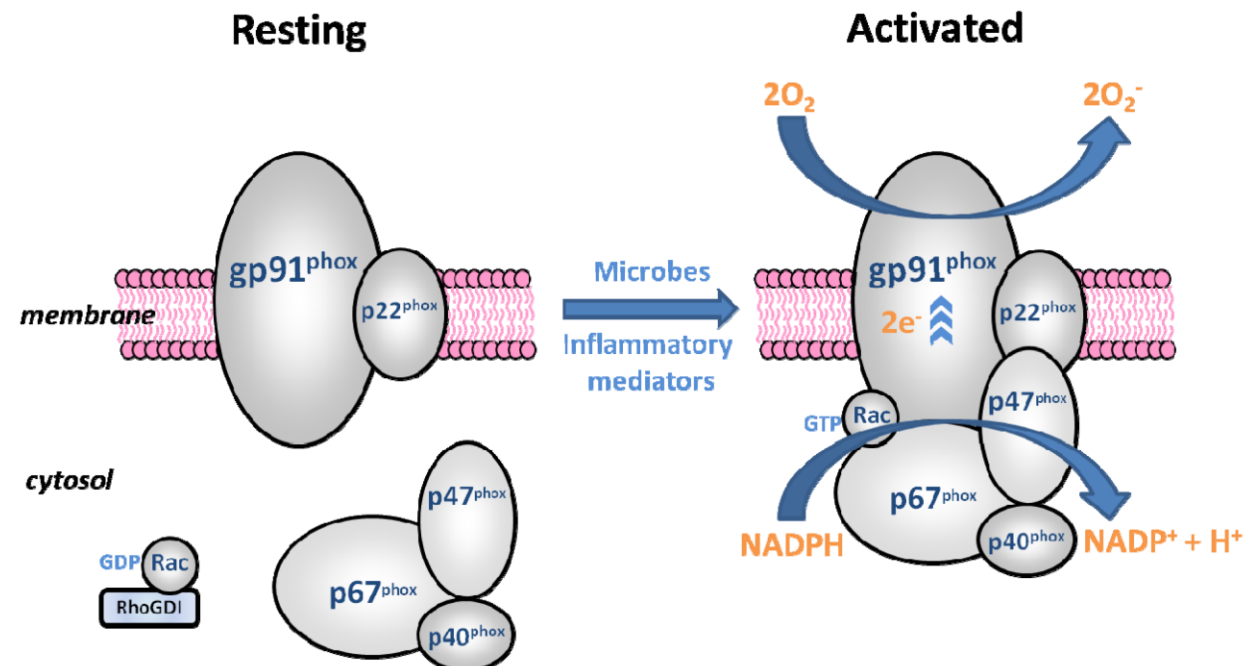
# Mechanismy zabíjení na O<sub>2</sub> závislé

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

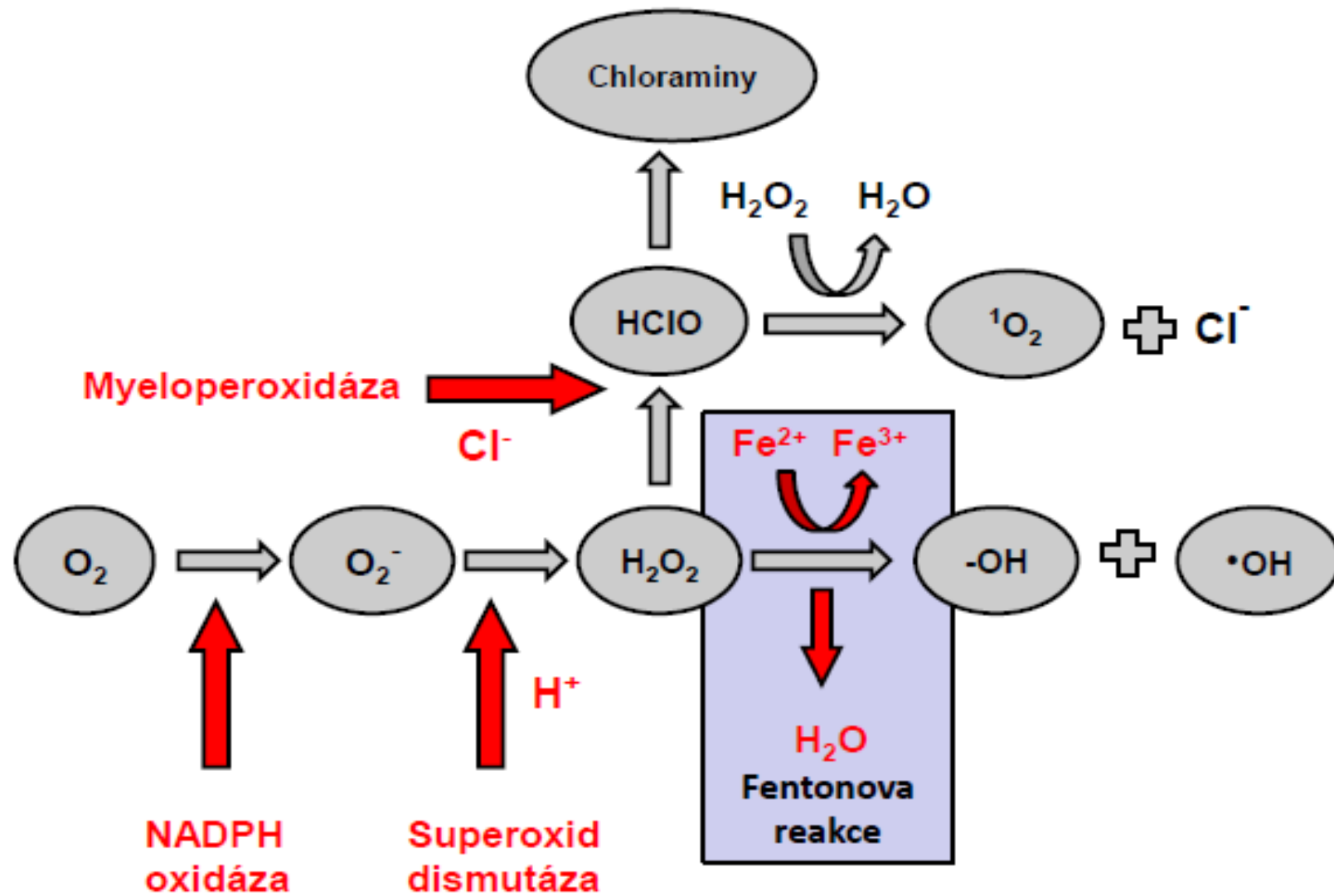


# NADPH oxidáza

- ▶ 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

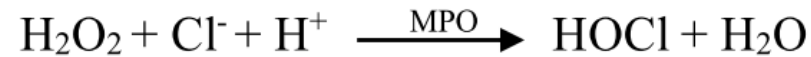


# NADPH oxidáza a tvorba reaktivních kyslíkových mediátorů (ROS)

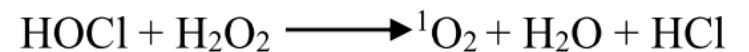


# Myeloperoxidáza

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



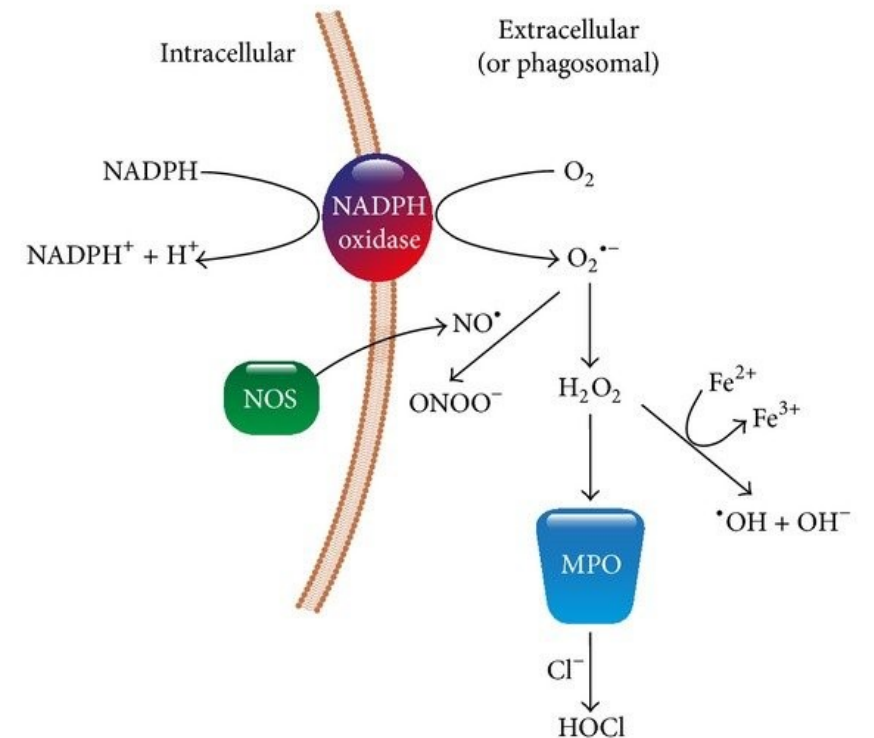
- Kyselina chlorná může být substrátem dalších reakcí, při kterých vzniká hydroxylový radikál a signletový kyslík – lipoperoxidace membrán → smrt fagocytující buňky



# iNOS

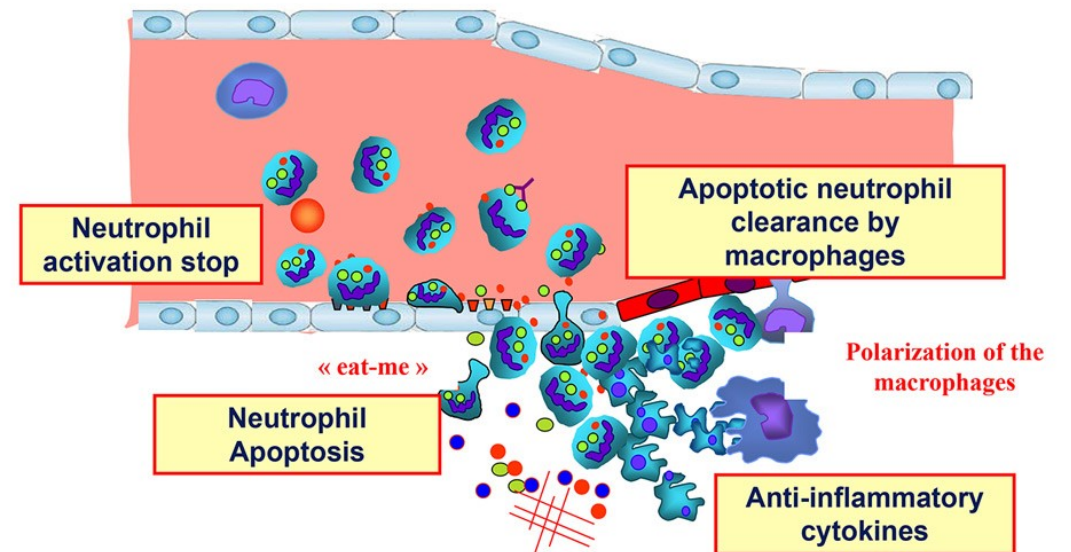
## inducibilní syntáza oxidu dusnatého

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



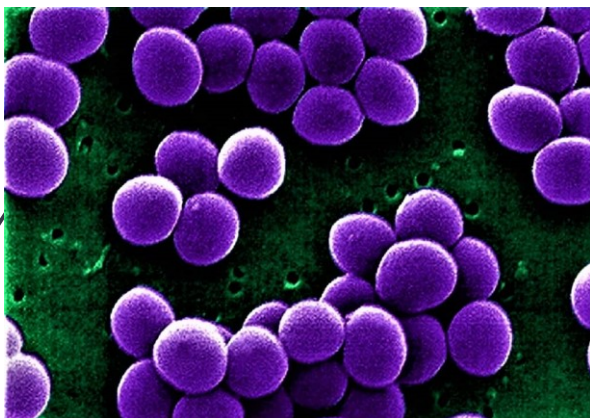
# Závěrečná fáze fagocytózy

- 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)

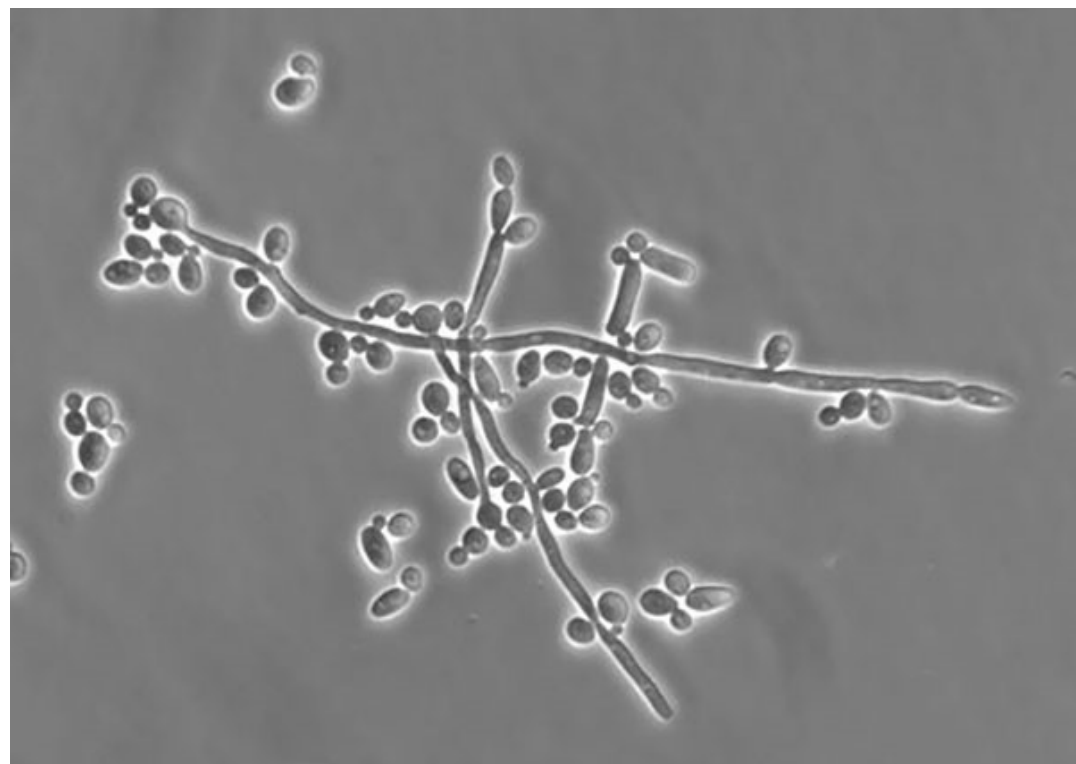


# Neutrofilý nedisponují pouze fagocytózou!

- ▶ 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

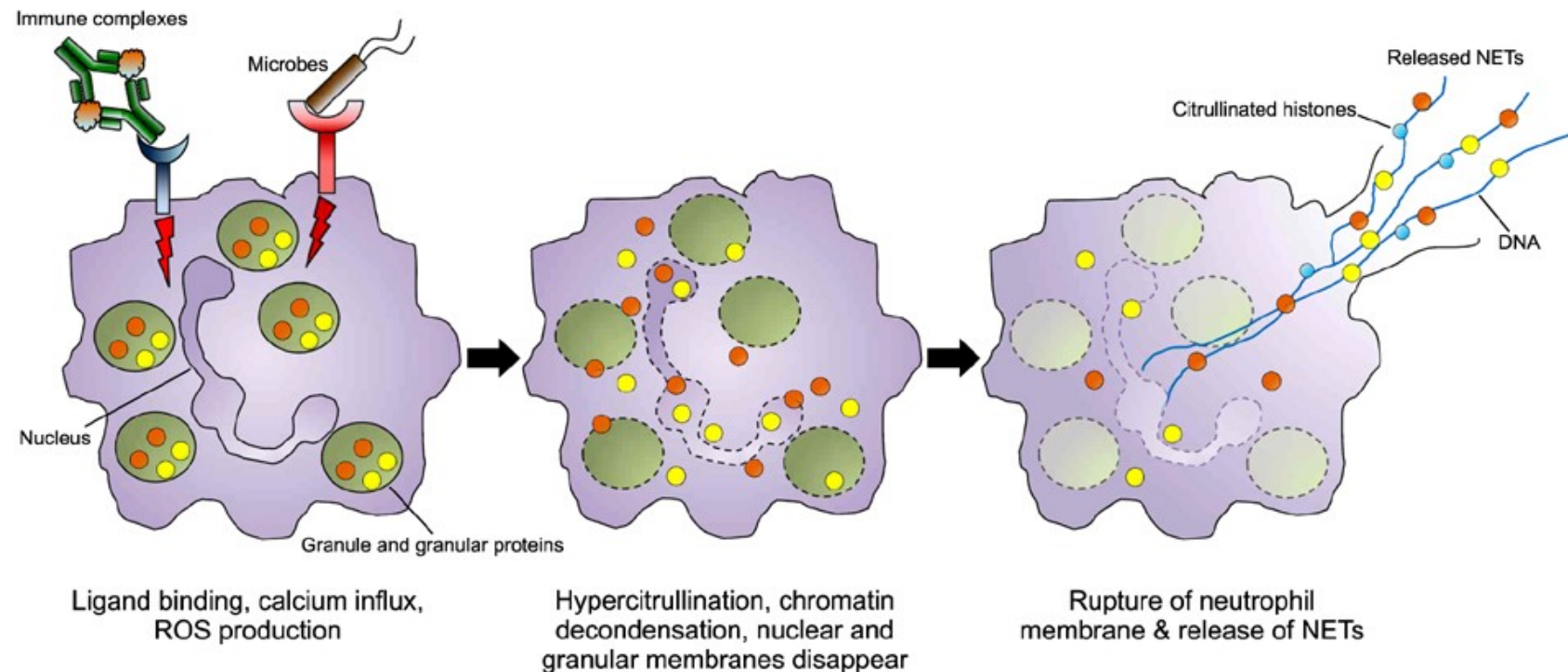


Pseudomycelia *Candida albicans* jsou příliš velké a fagocyt je nedokáže pohltit

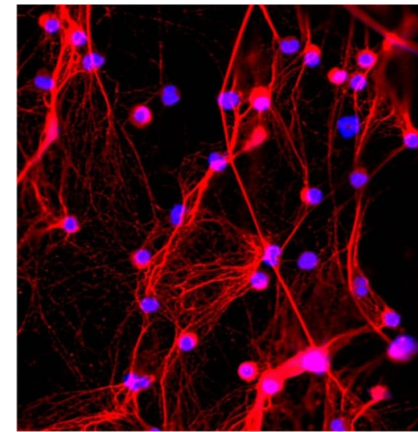


# NETóza

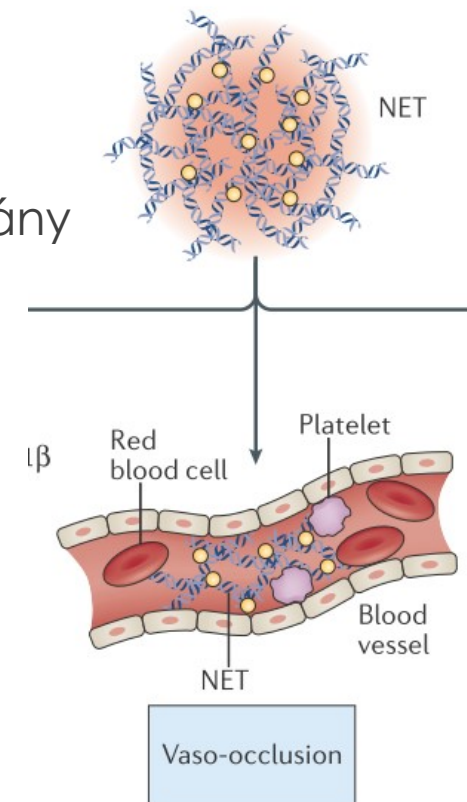
- ▶ Nový typ buněčné smrti
- ▶ Reaktivní kyslíkové mediátory tvořené NADPH oxidázou jsou druhými posly
- ▶ Jádro - dochází k citrulinaci histonů (peptidylarginindeimináza 4 – PAD4), rozvolnění jaderného chromatinu a jeho vypuzení do extracelulárního prostoru



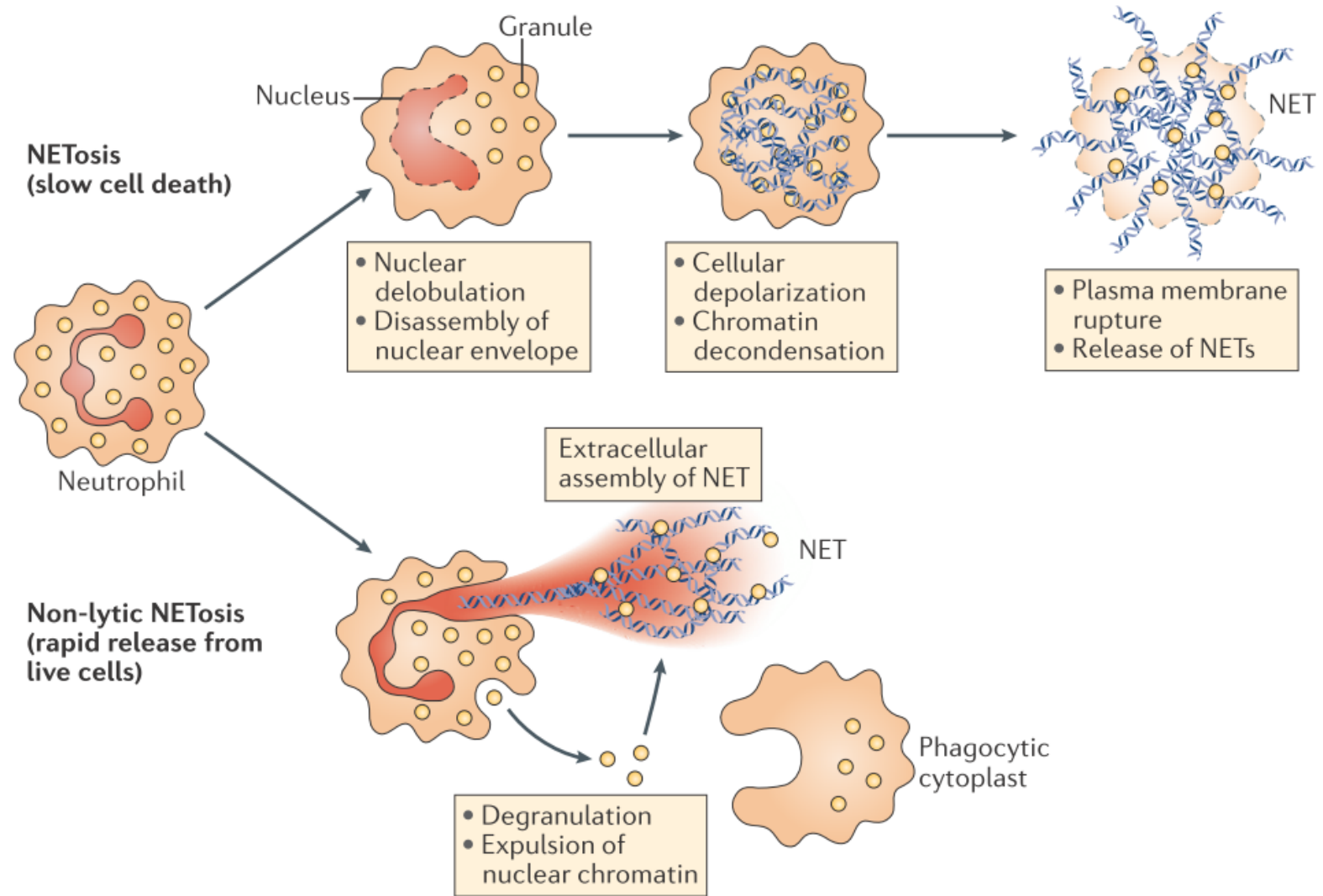
# NETóza



- 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



# NETóza – 2 typy



# Vyšetření fagocytózy

## ➤ 1. Test adheze

- Cytometrická detekce **CD11b/CD18** – deficit – **LAD syndrom**

## ➤ 2. Test chemotaxe

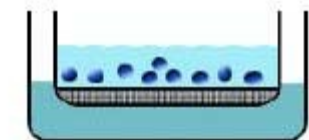
### ➤ Boydenova komůrka

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

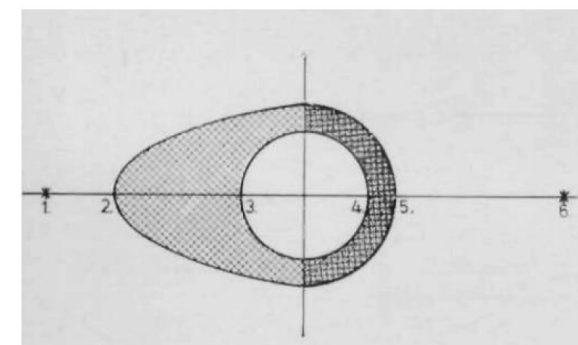
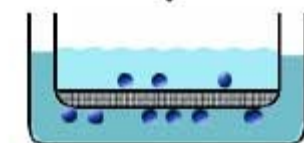
### ➤ Migrace pod agarózou

- Do agaróзовého 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

### ➤ **Recidivující flegmonózní záněty kůže a sliznic** – snížení



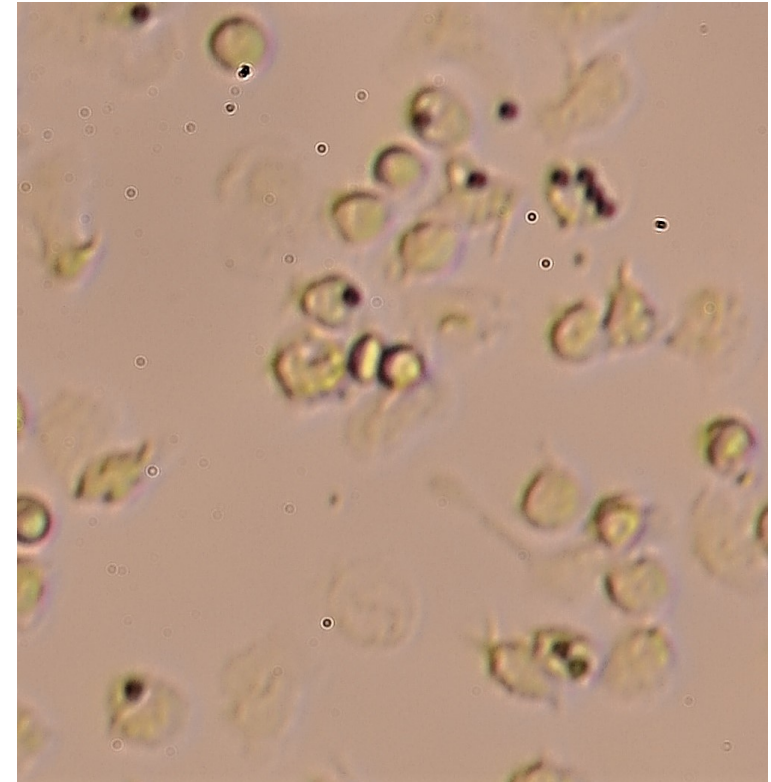
24-72 hours



# Vyšetření fagocytózy

## ➤ 3. 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 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)

## ▶ Chemiluminiscence

- ▶ 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)

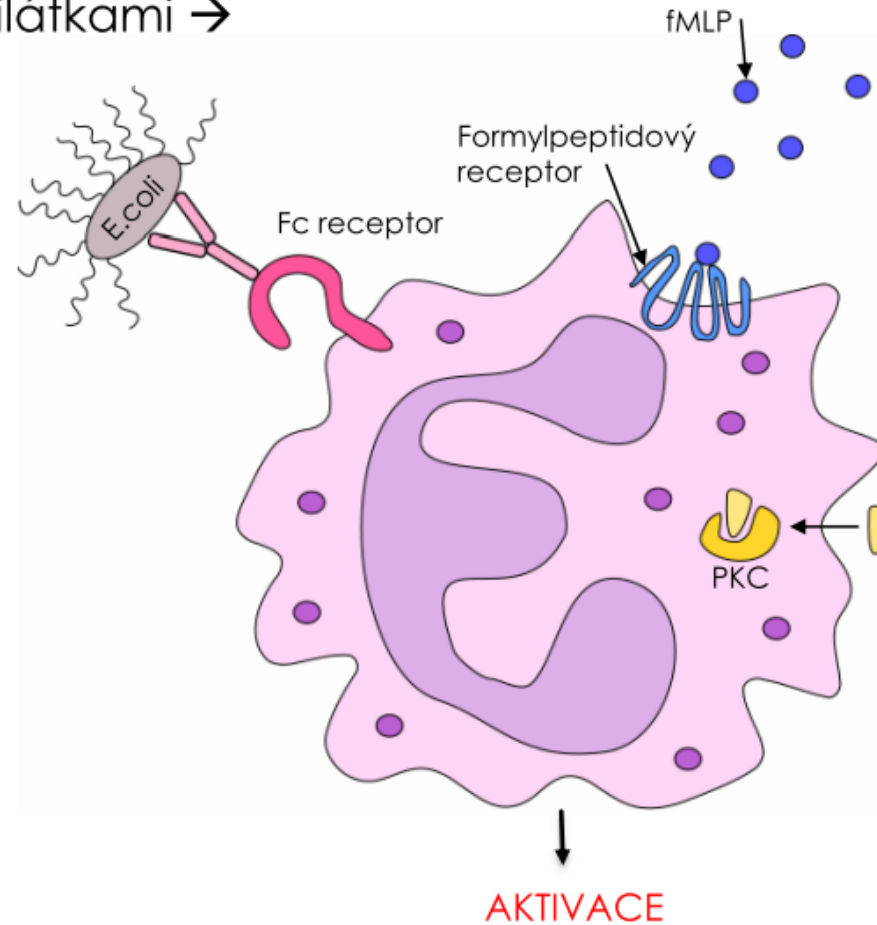
- Detekce oxidačního vzplanutí v **granulocytech** a monocytech pomocí průtokové cytometrie
- Princip – produkty oxidačního vzplanutí oxidují fluorescenční barvivo
- Funkční test
- Odběr krve do heparinu
- Nejsou stanoveny konkrétní referenční meze
- **Nutno se vzorkem pacienta vždy zpracovat i vzorek 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

AKTIVACE

# Burst test (BTT)

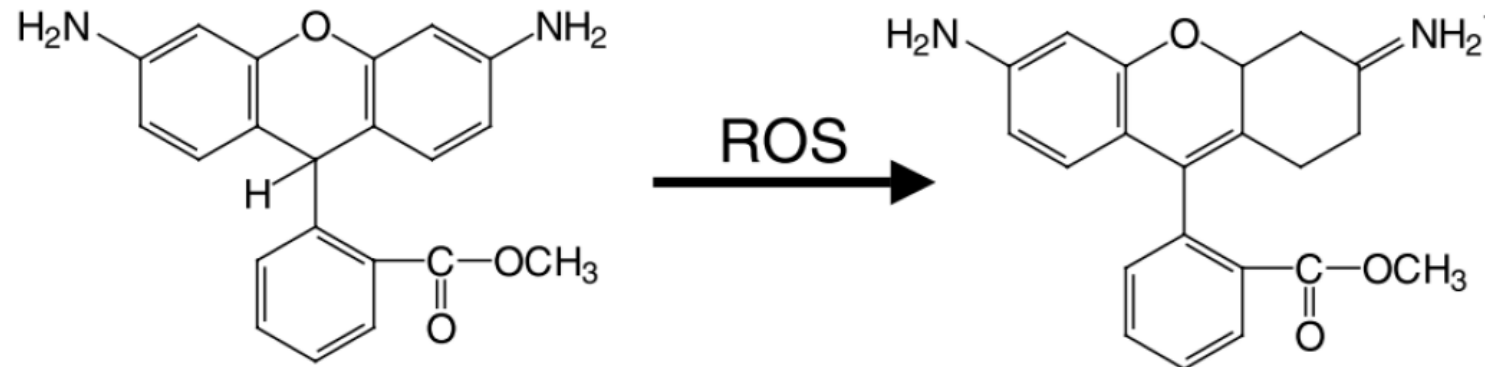
## ➤ Krok 1: Stimulace fagocytů

- **PBS** – negativní kontrola
- **E. Coli** – vazba na Fc receptory – aktivace fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K)  
pozn. v reakci je nutná přítomnost opsonizujících protilátek – bez nich granulocyty na *E.coli* nereagují (např. izolované granulocyty z krve)  
orientační norma **>80 %**
- **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

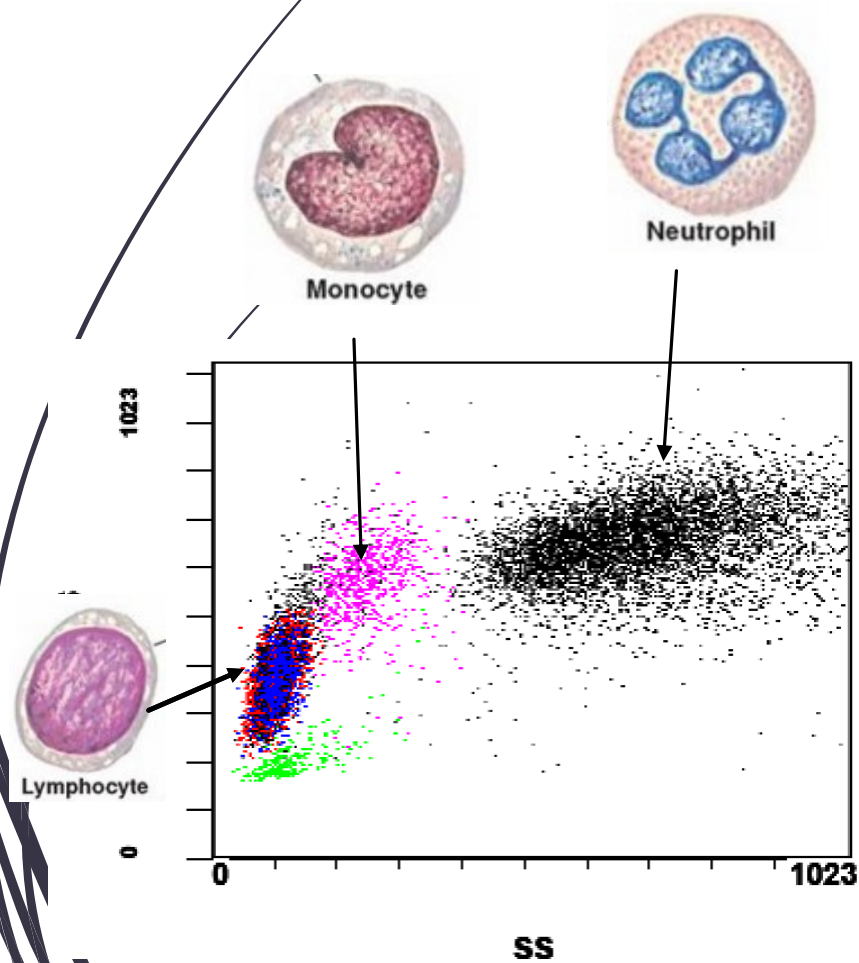
# Burst test (BTT)

## ➤ 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

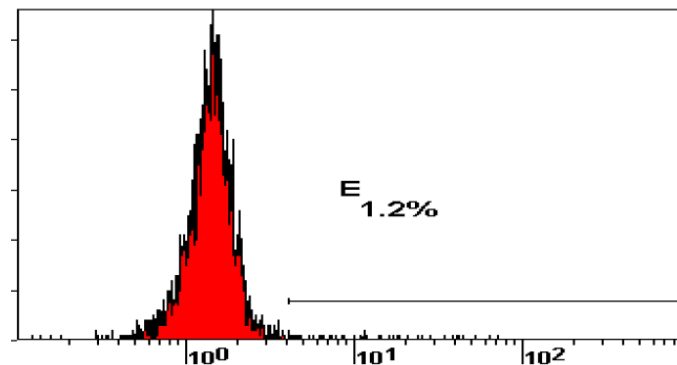


# Burst test (BTT) – hodnocení



BEZ STIMULACE

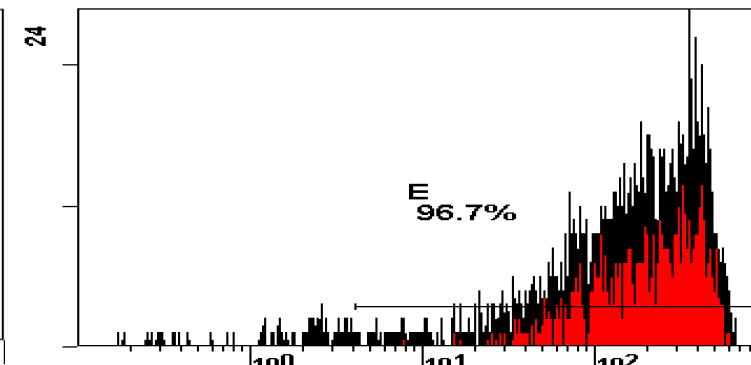
(1):Z0021459.LMD FL1 LOG A



NEGATIVNI K.

STIMULACE PMA

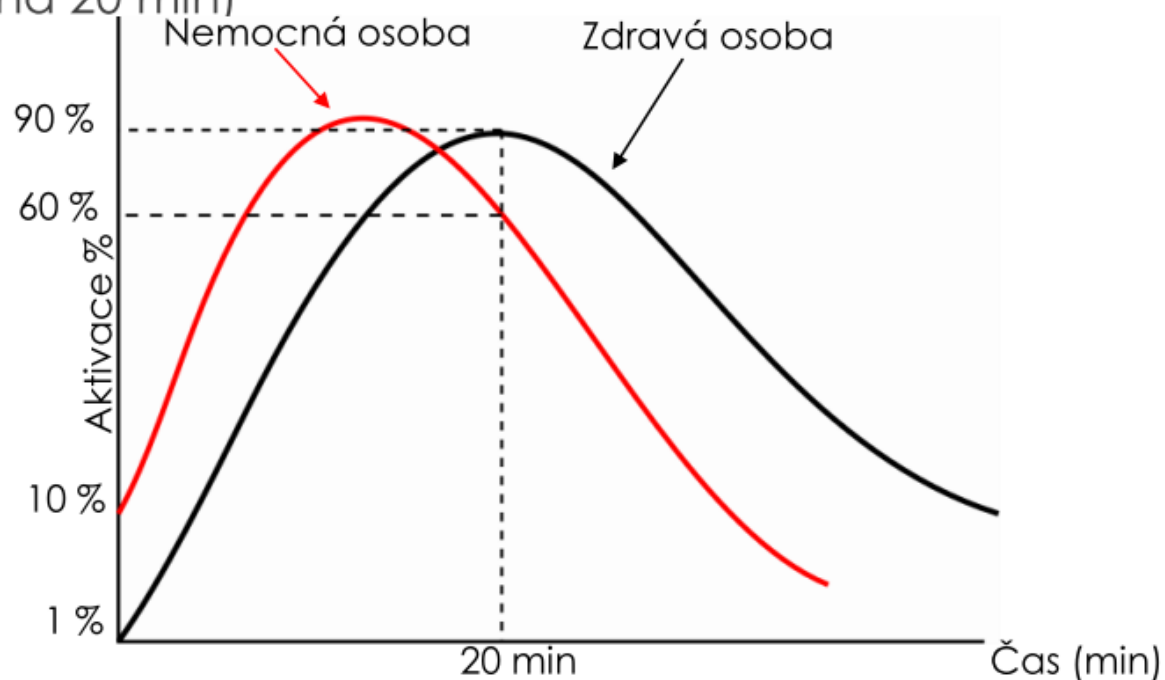
(4):Z0211867.LMD FL1 LOG A



STIMULACE PMA

# Odhalení falešně snížené aktivity oxidačního vzplanutí

- U některých onemocnění (např. akutní zánět, sepse, diabetes mellitus) mohou být granulocyty pacienta naaktivované *in vivo*!
- Proto při stimulaci odpovídají granulocyty rychleji a dříve dochází i k poklesu aktivity oxidačního vzplanutí a rozpadu granulocytů (v laboratoři je čas nastaven na 20 min)





# Odhalení falešně snížené aktivity oxidačního vzplanutí

- ▶ **Test oxidačního vzplanutí se provede znova s fMLP:**
- ▶ **fMLP** – chemoakraktant - vazba na formyl peptidový receptor spřažený s malými G proteiny – aktivace fosfolipázy A2 (PLA2)
- ▶ Nízká míra aktivace (do 35 %) granulocytů
- ▶ Je-li aktivita oxidačního vzplanutí snížena po stimulaci E.coli a PMA a neobvykle vysoká u fMLP (např. aktivace 60%) → pravděpodobná aktivace buněk *in vivo*, nikoli deficit NADPH oxidázy!

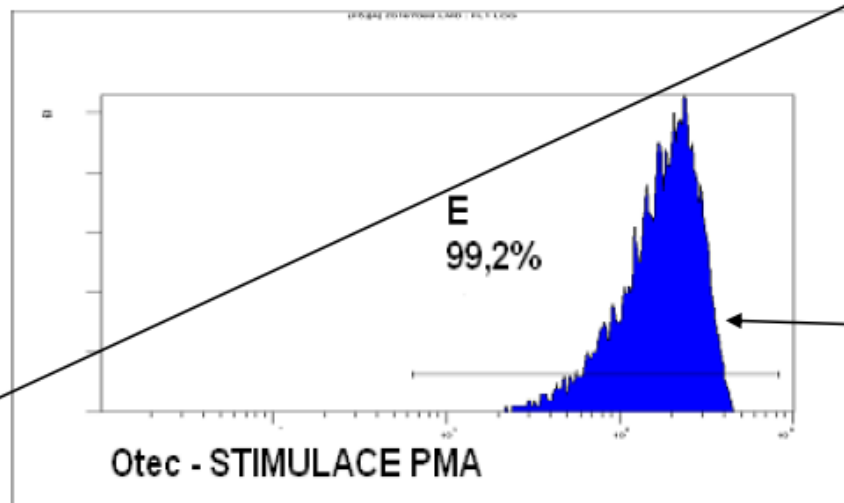
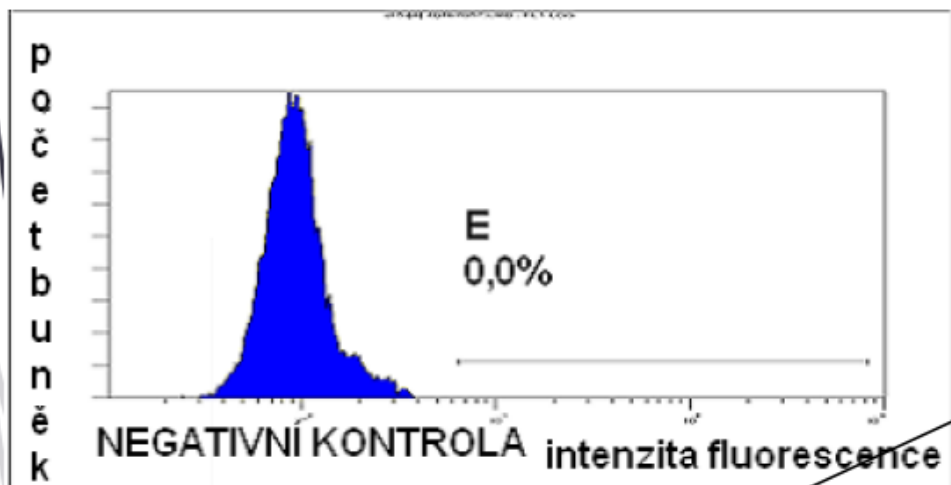


# Chronická granulomatózní choroba (GCD)

- ▶ 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)

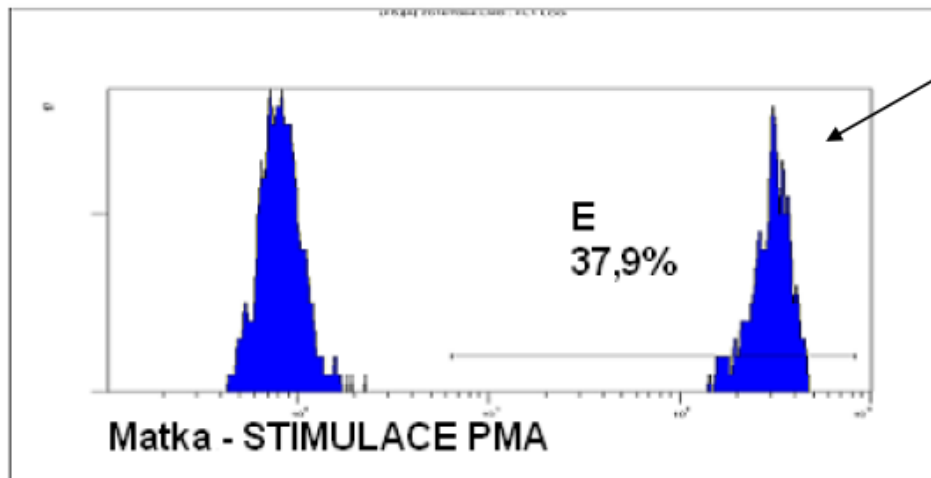
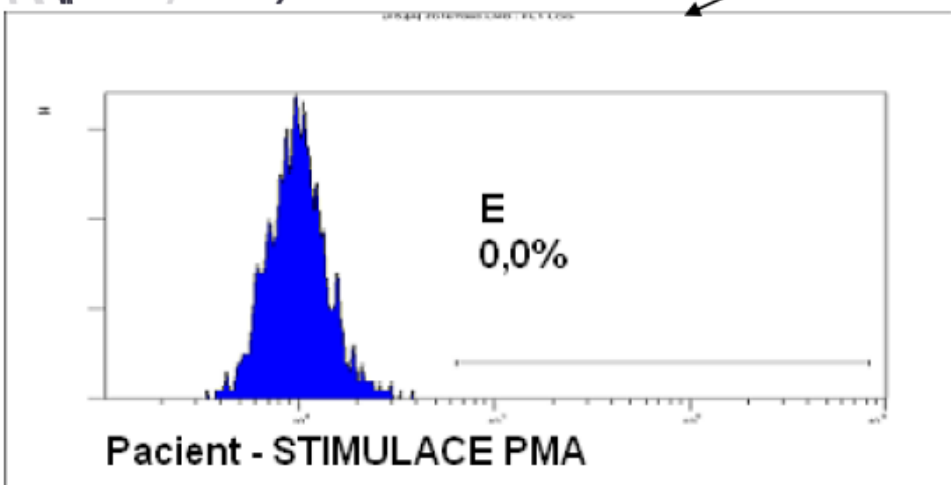


# GCD X-vázaná



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

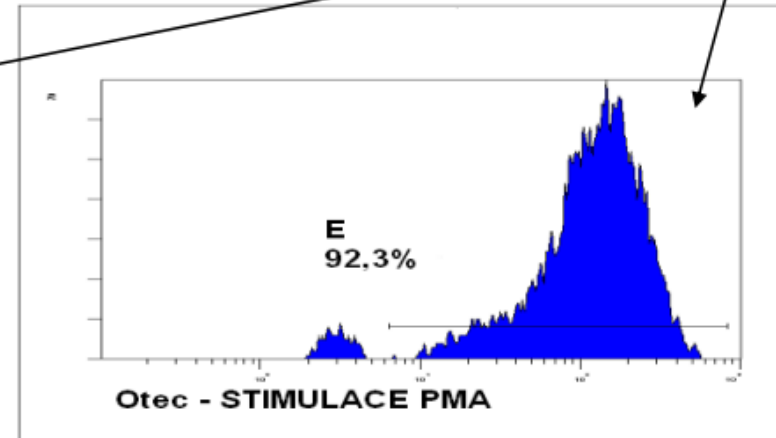
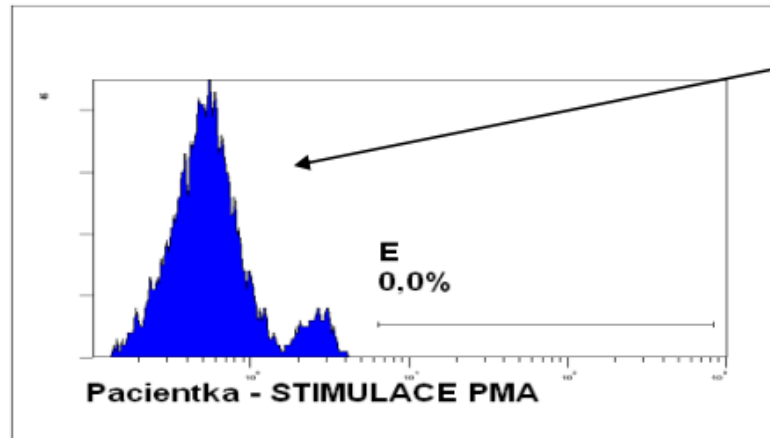
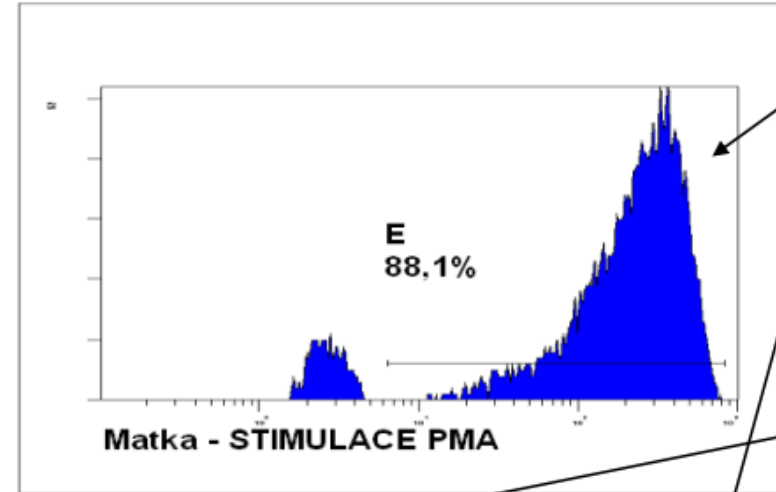
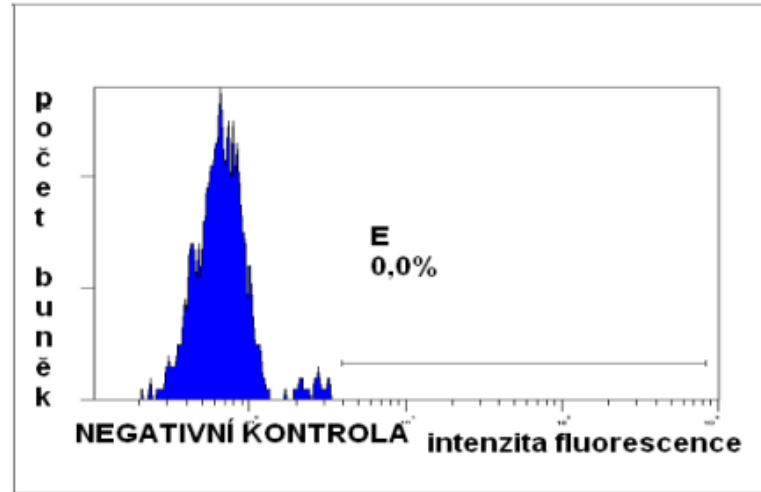
Otec má oxidační vzplanutí po PMA v normě (1 pík vpravo)



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)

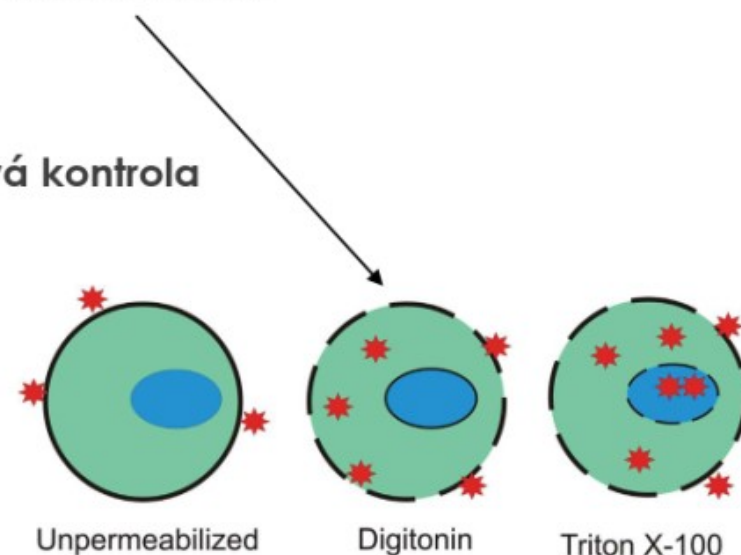


## **Deficience získaná:**

- ▶ 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%**

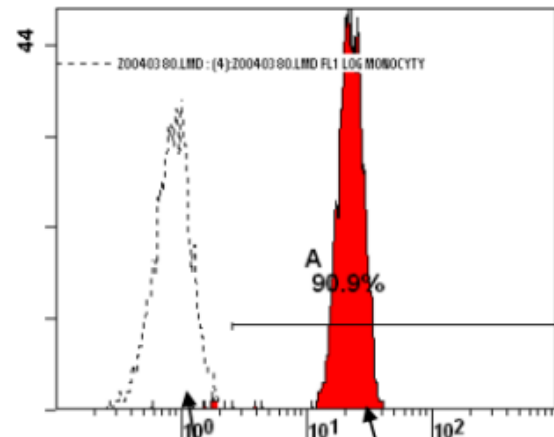


# Deficit MPO

## Exprese MPO - monocyty

ZDRAVÁ  
KONTROLA

(6):Z0021369.LMD FL1 LOG MONOCYTY



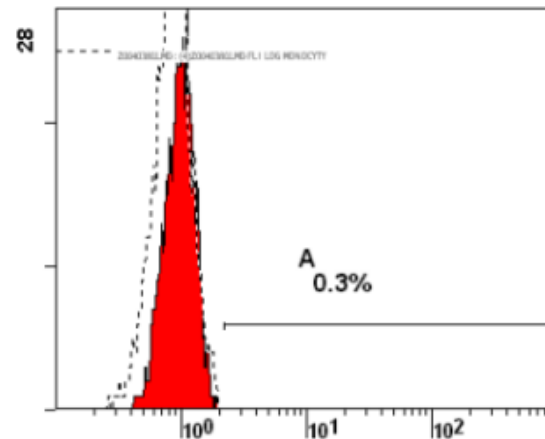
MPO FITC

Izotypová  
kontrola

MPO pozitivní  
monocyty

PACIENTKA

(5):Z0040381.LMD FL1 LOG MONOCYTY

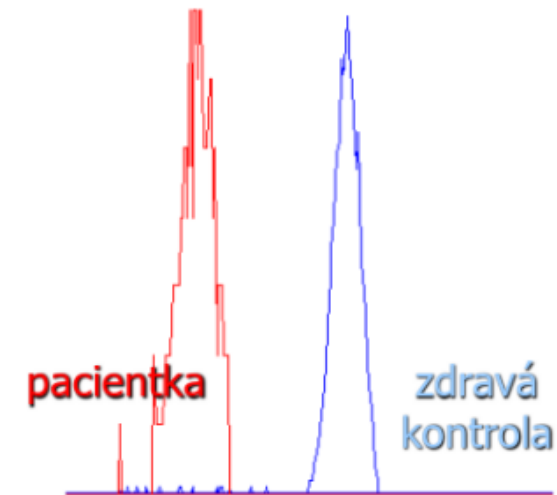


MPO FITC

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

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC  
■ MPO FITC

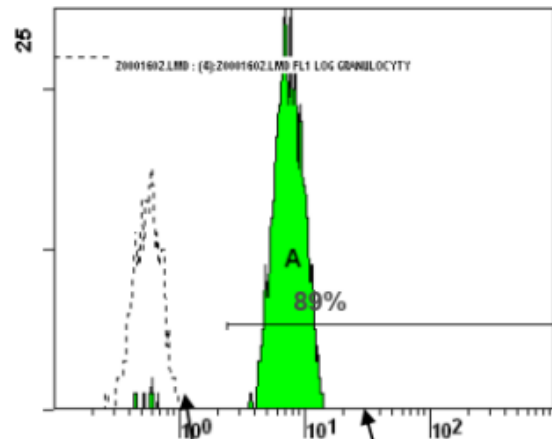


# Deficit MPO

## Exprese MPO - granulocyty

ZDRAVÁ  
KONTROLA

(2):Z0019678.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



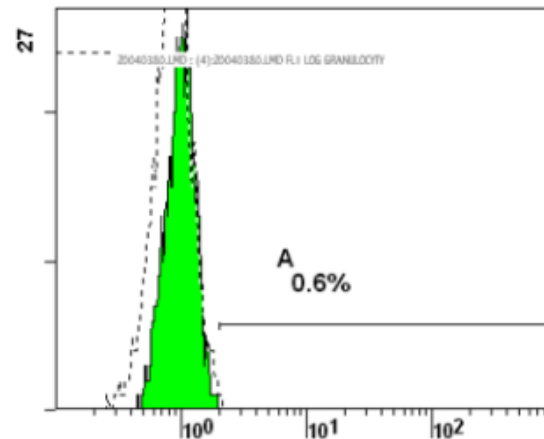
MPO FITC

Izotypová  
kontrola

MPO pozitivní  
granulocyty

PACIENTKA

(6):Z0040381.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



MPO FITC

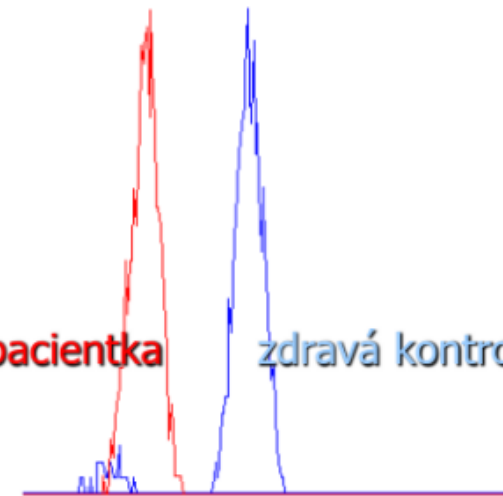
U pacientky jsou  
granulocyty MPO negativní  
– pík se překrývá s  
izotopovou kontrolou

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC  
■ MPO FITC

pacientka

zdravá kontrola



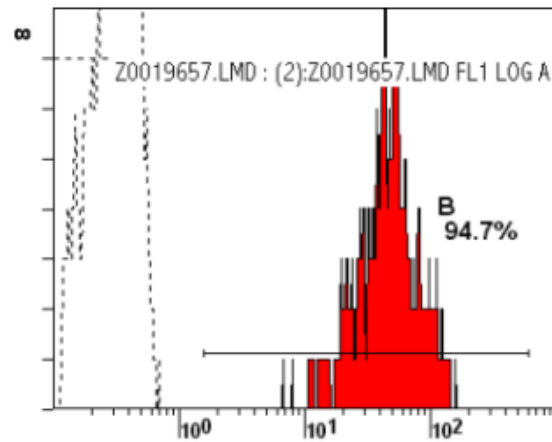


# Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

## Burst Test - stimulace *E. coli*

ZDRAVÁ  
KONTROLA

(3):Z0019658.LMD FL1 LOG A



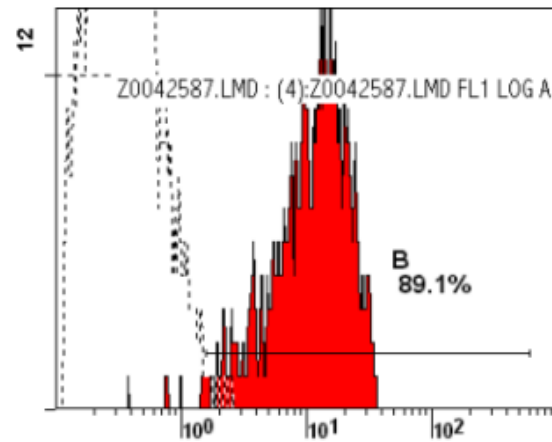
STIMULACE E.C.

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.

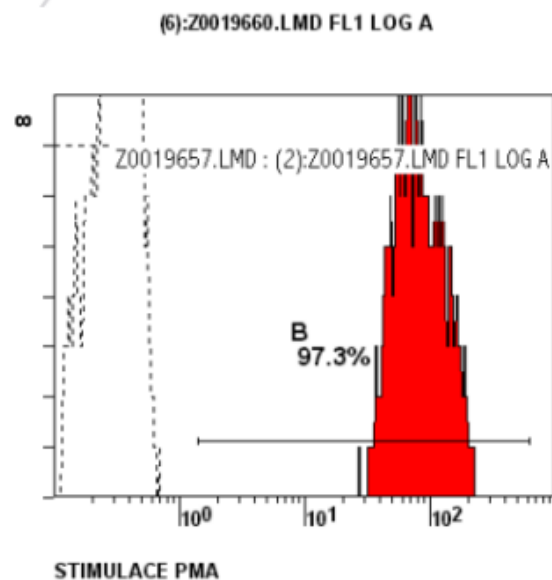


Fagocyty mají u pacientky nižší pozitivitu meanu intenzity fluorescence (posun píku doleva) na oxidační vzplanutí po stimulaci *E. coli* ve srovnání se zdravou kontrolou.

# Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

## Burst test - stimulace PMA

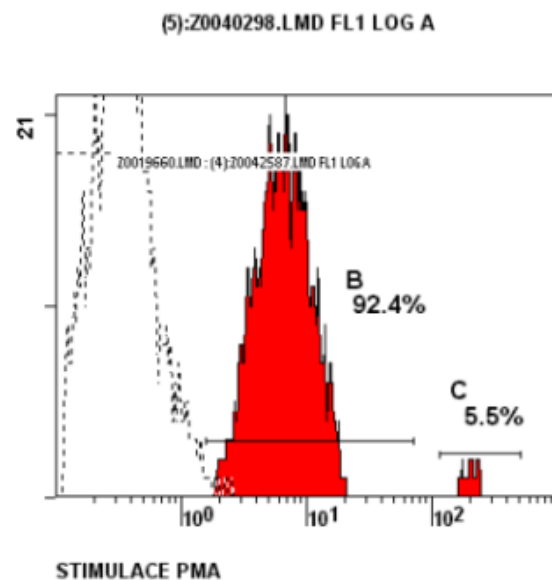
ZDRAVÁ KONTROLA



Počet aktivovaných buněk: 97%

Stimulační index: 281

PACIENTKA

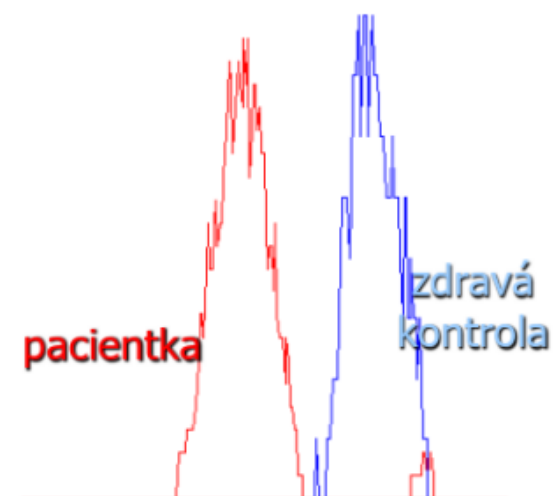


Počet aktivovaných buněk: 92% a 6%

Stimulační index: 23 a 201

SROVNÁNÍ

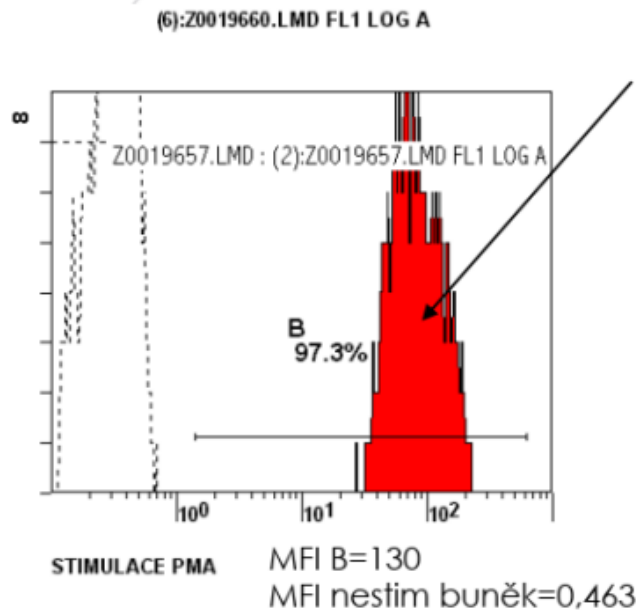
■ STIMULACE PMA  
■ STIMULACE PMA



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