

Zánět, fagocyty, komplement

(Milan Číž)

Zánět

Zánět

Tělo je před poraněním/proniknutím mikroorganismu chráněno fyziologickými a fyzikálními bariérami.

Kůže – keratinocyty, pot (promývání, mastné kyseliny)

GI trakt – nízké pH v žaludku, mastné kyseliny, žlučové kyseliny, přirozená střevní mikroflóra

Dýchací trubice – řasinky, mukózní pokryv

Nosohltan a oko – mukózní pokryv, sliny, lysozym v slzách (hydrolýza peptidoglykanů)

Pokud dojde k překonání těchto bariér → zánět, imunitní reakce.

Zánět

Definice:

Souhrn imunitních a fyziologických reakcí na porušení integrity organismu, které vedou k lokalizaci poškození, ochraně poškozeného místa a k jeho zhojení.

Vznik zánětu:

- Antigenní podnět (infekční mikroorganismy)
- Poranění chemickými nebo fyzikálními vlivy
- Ischemie orgánů a tkání

Klasické projevy lokálního zánětu:

- Rubor = zčervenání
- Tumor = otok
- Dolor = bolestivost
- Calor = zvýšení místní teploty

Druhy zánětu:

- Akutní – fyziologická obranná reakce; odezní bez následků a poraněná tkáň se kompletně zhojí
- Chronický = obvykle patologický; tkáň je do určité míry nahrazována vazivem
- Sterilní = bez přítomnosti mikroorganismů

Proces zánětlivé reakce

První signály k rozvoji zánětlivé reakce dávají:

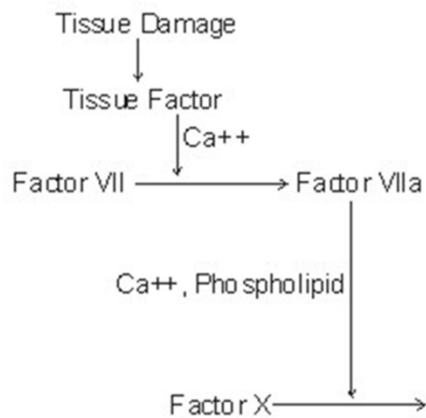
1. Degranulované tkáňové žírné buňky
2. Fagocyty
3. Látky uvolněné z poškozených buněk a mezibuněčné hmoty

Děje doprovázející zánět

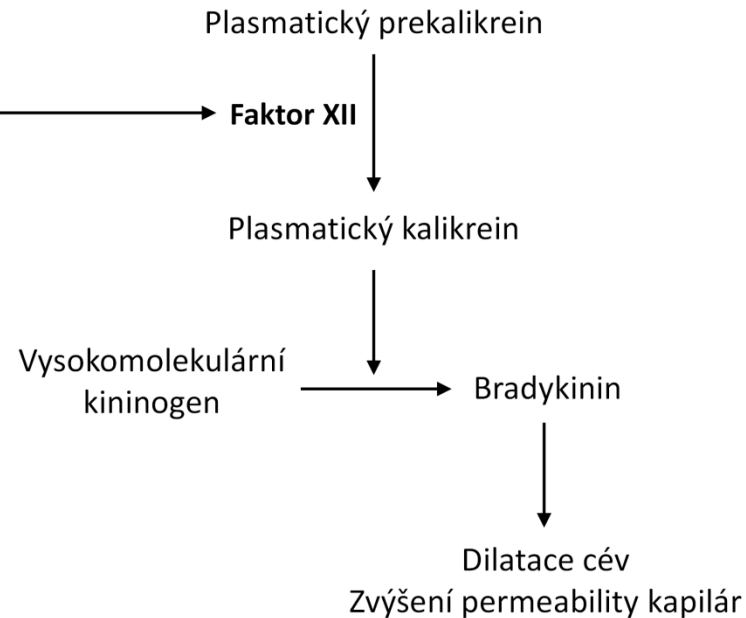
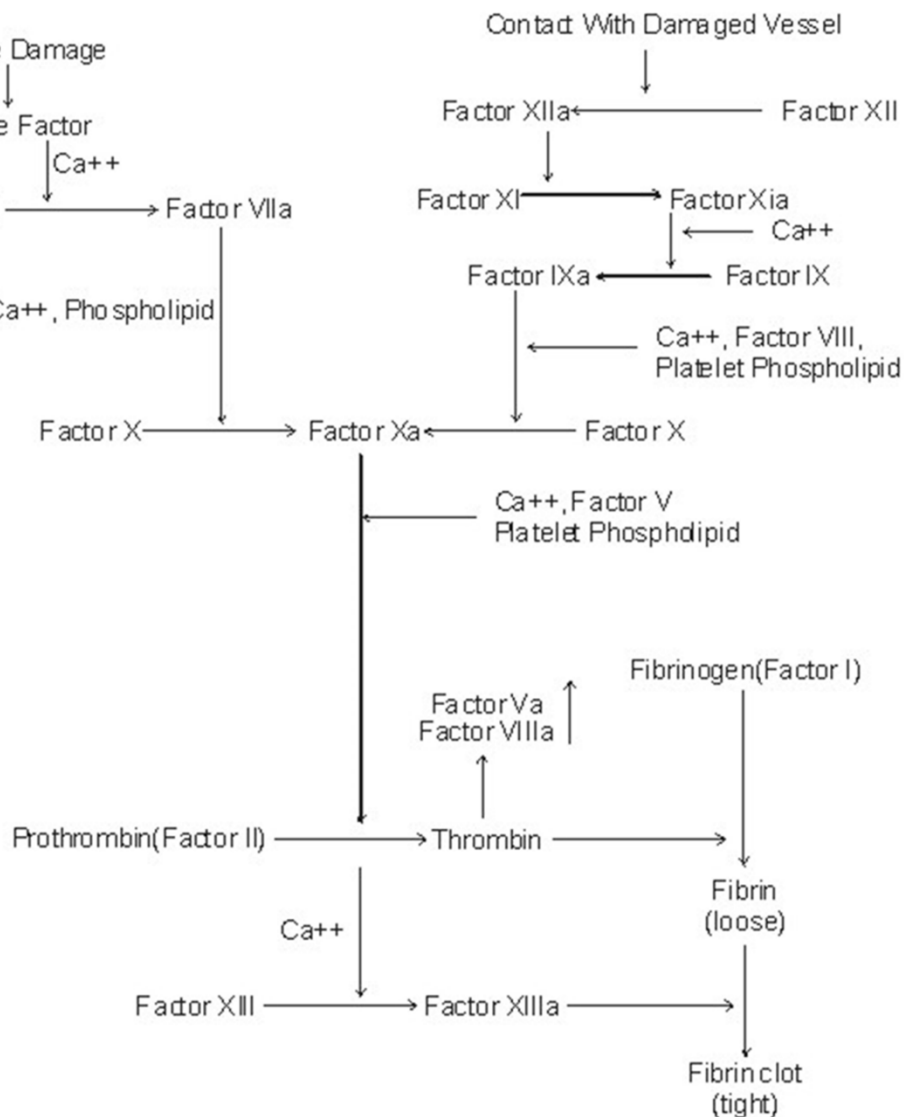
- **Zvýšení permeability cév**, prostup plasmatické tekutiny do extravaskulárního prostoru a **otok**.
- U poranění jako první nastupuje **hemokoagulace** – zabránění úniku krve. Faktory uvolněné z poškozených buněk aktivují koagulaci. Hlavním principem je přeměna rozpustné bílkoviny fibrinogenu na nerozpustný fibrin.
- Aktivace **fibrinolytického systému** – zabránění šíření srážení krve mimo místa poranění. Při fibrinolýze se z inaktivního plasminogenu vytváří enzym plazmin, který štěpí fibrin na řadu menších polypeptidů, a tím snižuje kompaktnost krevní sraženiny, eventuálně krevní sraženinu částečně rozpouští.
- Aktivace **kininového systému** – aktivovaný koagulační faktor XII působí na **prekalikrein**, vzniká **kalikrein**, následně **bradykinin**, který zvyšuje permeabilitu kapilár.
- Zvýšená exprese **adhezivních molekul** na endoteliu – zachycování fagocytů, později lymfocytů.

Koagulační kaskáda

Vnější cesta



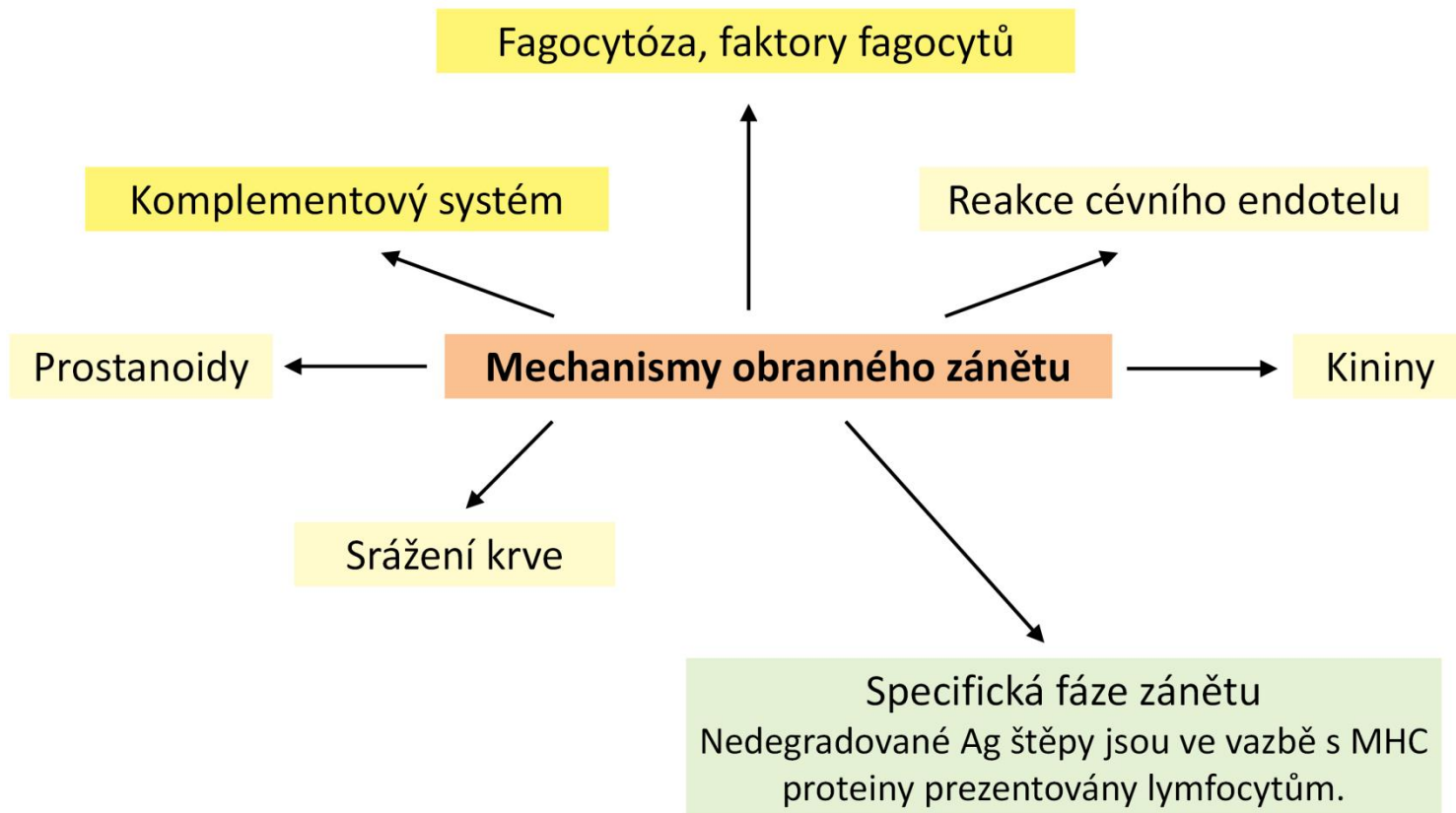
Vnitřní cesta



Děje doprovázející zánět

- Aktivace **komplementového systému**.
- Aktivace **fagocytů**.
- Ovlivnění **místních nervových zakončení** (bolest).
- Zvýšená syntéza **metabolitů kyseliny arachidonové** (TX, LT, PG).
- Změny **regulace teploty** (horečka). Je vyvolána stimulací hypotalamového centra prozánětlivými cytokiny. Následně je aktivován tkáňový metabolismus mobilizací osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (kůra nadledvin – steroidy, antistresový hormon kortizol). Zvýšená teplota sama zvyšuje metabolismus imunokompetentních buněk. Indukuje se exprese Hsp (Heat Shock Proteins). Ty fungují jako tzv. chaperony – váží se na nově syntetizované polypeptidové řetězce a na intracelulární denaturované proteiny a napomáhají jejich poskládání do nativních konformací.
- **Játra** vylučují stopové prvky důležité pro růst bakterií.
- **Cytokiny** produkované v místě zánětu stimulují v játrech produkci proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein, CRP; komplementové složky C3 a C4; sérový amyloid P, SAP).

Mechanismy obranného zánětu



Fagocyty

Historie

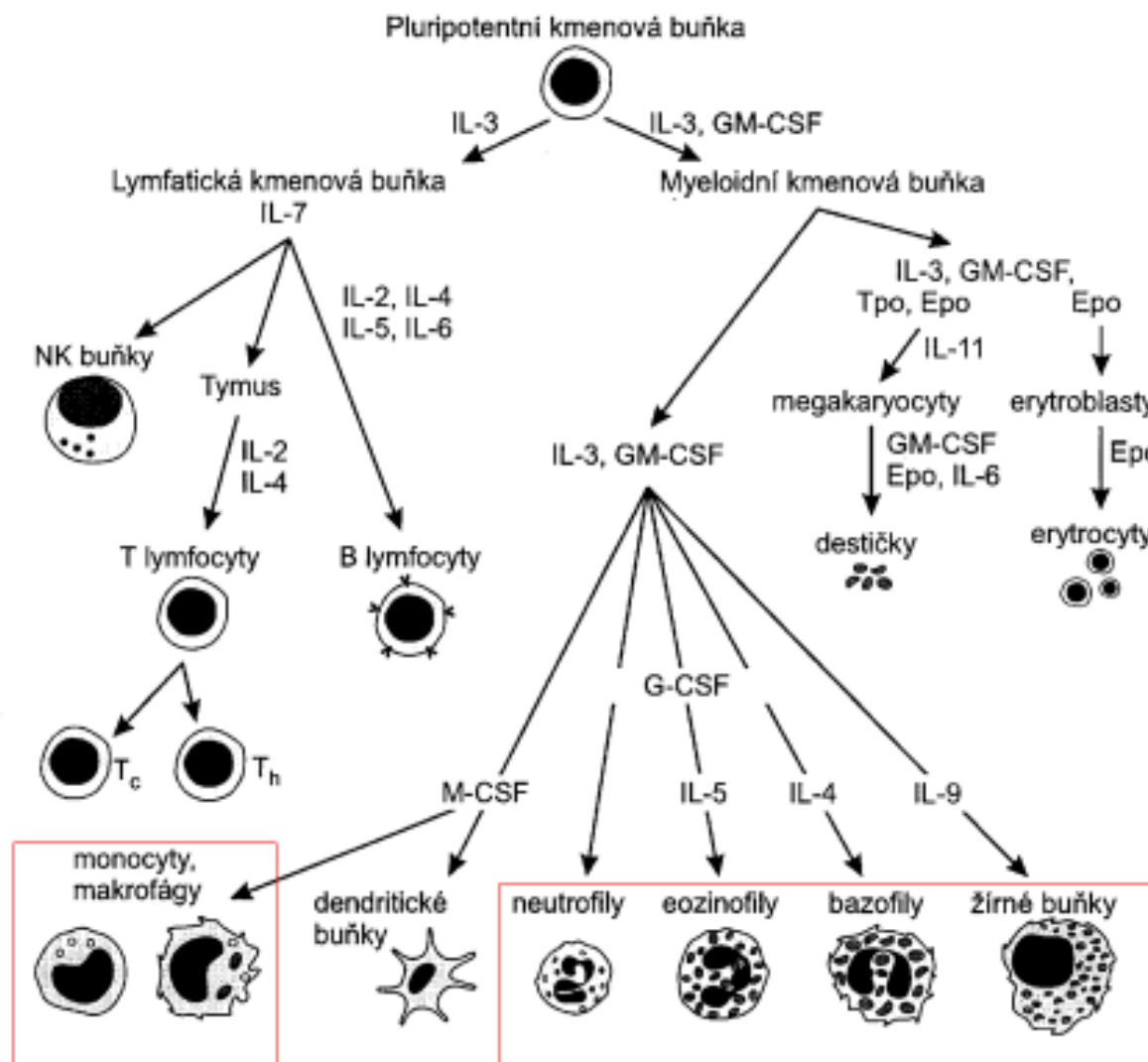
I. Mečnikov – Fagocytóza a přirozená imunita – Nobelova cena 1908

- poprvé použit pojem fagocyt
- fagocyty larev mořské hvězdice obklopily třísku; fagocytóza a digesce bakterií makrofágy a PMNS
- původ z řeckých slov phagein – jíst, cytos – buňka



<http://fb.ru/article/214500/kratkaya-biografiya-ili-ilicha-mechnikova-istoriya-jizni-otkryitiya-dostijeniya-i-osobnosti-deyatelnosti>

Buňky imunitního systému



Polymorfonukleární leukocyty (PMNs)

- 40-65% všech leukocytů ($3-5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ krve)
- krátce žijící, v nadbytku v krvi, chybí ve zdravé tkáni
- charakteristické jádro
- granula a CD66 membránový marker
- první obranná linie v boji proti patogenním mikroorganismům
- chemotaxe
- fagocytóza, intracelulární zabíjení
- generování RMK a RMD
- degranulace
- zánět, poškození tkání



Polymorfonukleární leukocyty (PMNs)

- Primární granula
 - azurofilní
 - charakteristické pro mladé neutrofilny
 - neutrální proteasy - cathepsin G, elastasa, proteinasa 3
 - lysozym, defensiny, fosfolipasa A2, myeloperoksidasa
- Sekundární granula
 - specifické pro zralé neutrofilny
 - lysozym, NADPH oxidasa, laktoferin, elastasa, kolagenasa
- Terciární granula
 - gelatinasová
 - na předním konci migrujících fagocytů
 - gelatinasa (destrukce membrán)
- Sekreční váčky
 - reservoár membránových komponent

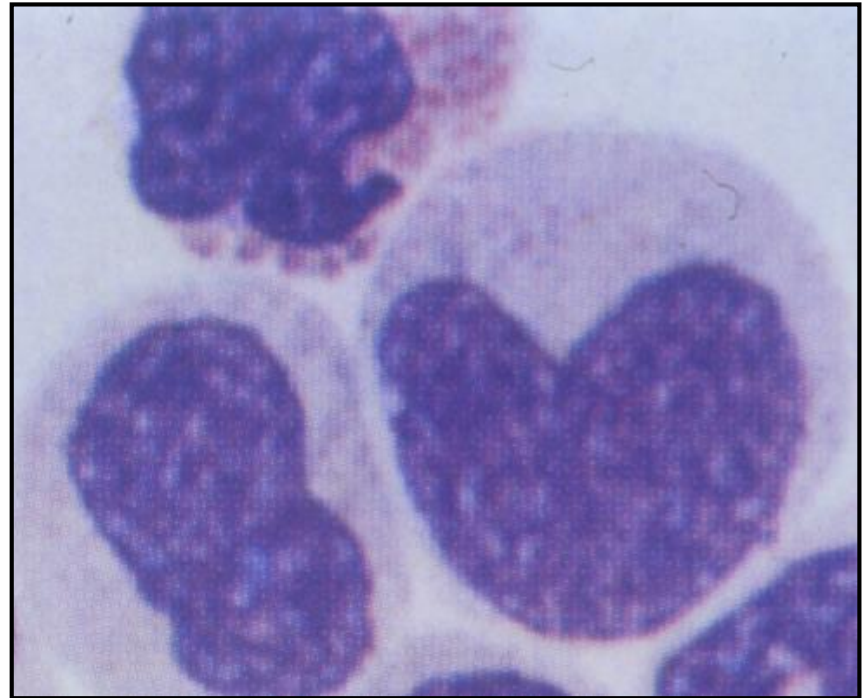
Eosinofily

Jejich úloha v organismu je nyní rozsáhle diskutována a přehodnocována.
Původně – obrana proti parazitům (červům)

- **NADPH oxidasa** (podobně jako u neutrofilů)
- **Eosinofilní peroxidasa**
- **Hlavní bazický protein** a další proteiny z granulí eozinofilů

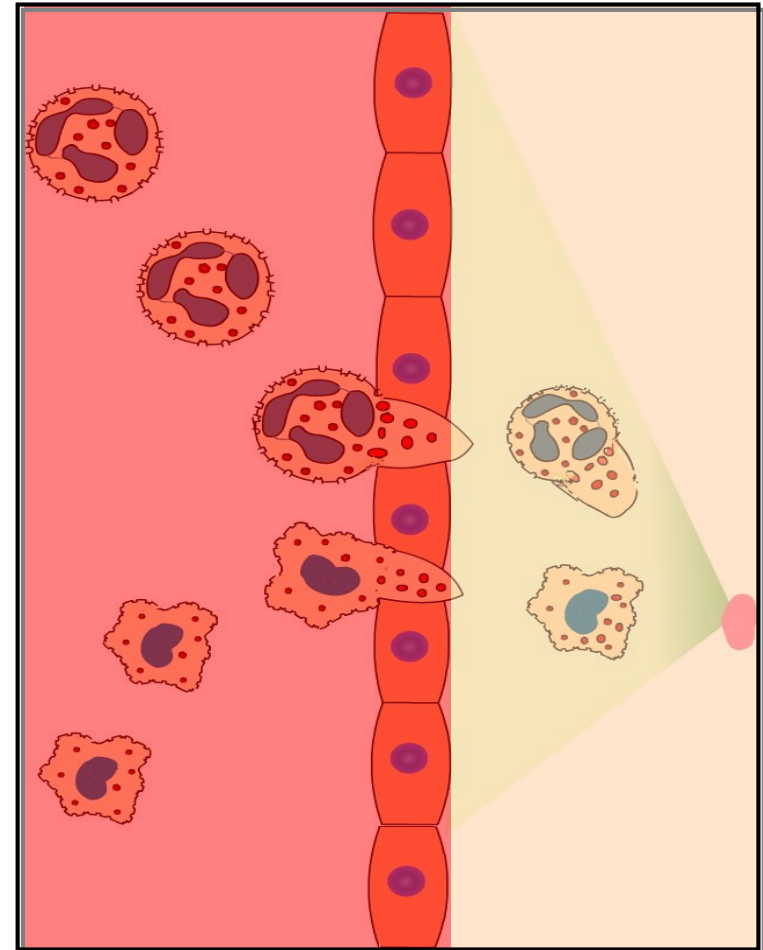
Monocyty / Makrofágy

- fagocytóza, zabíjení
- obnova tkání
- prezentace antigenu pro specifickou im. odpověď
- charakteristické jádro a CD14 membránový marker
- adherují na plast a sklo
- aktivují se působením cytokinů
- samy cytokiny produkují
- likvidují i maligní
a pozměněné vlastní struktury



Aktivace fagocytů v zánětu

- SOS signály
 - N-fMLP
 - PGs, LTs, PAF
 - Komplement
 - Prozánětlivé cytokiny
- Odpověď fagocytů
 - chemotaxe
 - adherence
 - diapedéza
 - aktivace
 - fagocytóza a zabití



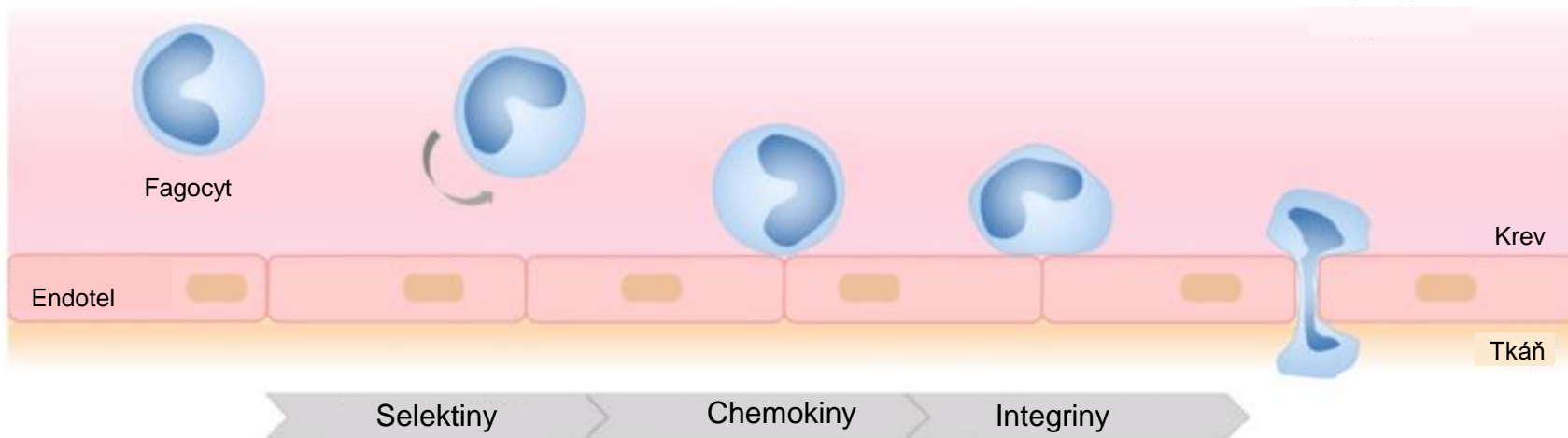
1. Klidový stav

2. Rolování

3. Aktivace

4. Adheze

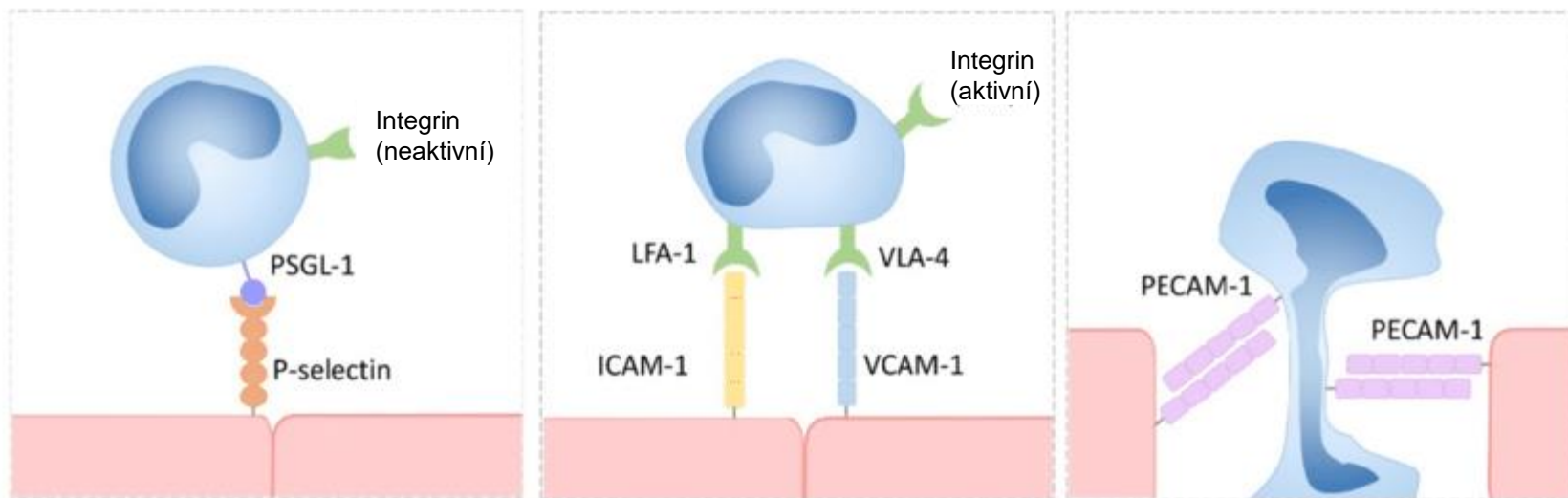
5. Migrace



Rolování

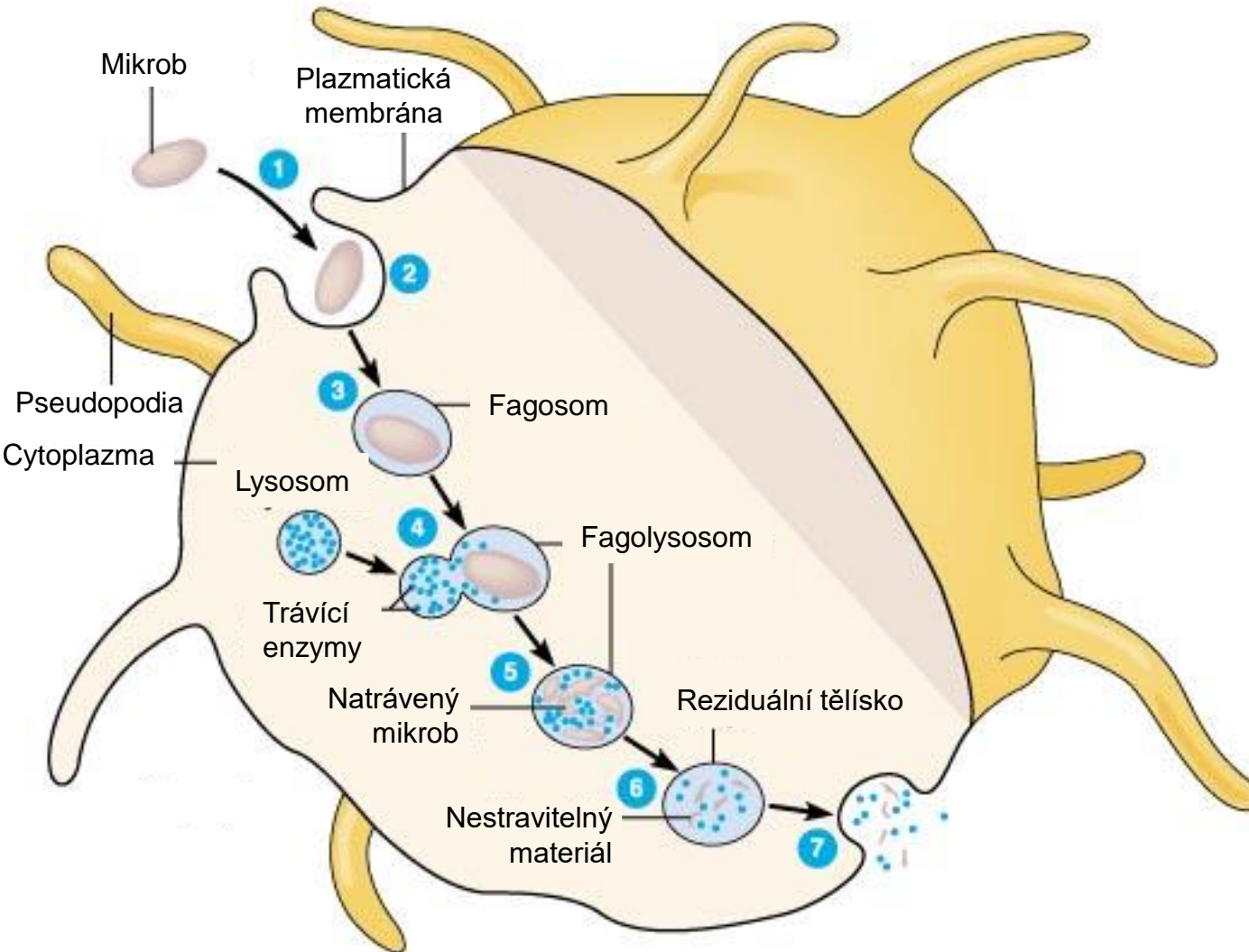
Adheze

Transendoteliální migrace



Receptory na fagocytech

- komplementové receptory
- Fc receptory
- Toll-like receptory
- chemotaktické receptory (fMLP)
- manózoové receptory rozeznávající cukerné struktury na povrchu bakterií a některých virů
- scavengerové receptory – rozeznávají acetylované LDL



- 1 Chemotaxe a adherence
- 2 Ingesce
- 3 Tvorba fagosomu
- 4 Fúze fagosomu a lysosomu, tvorba fagolysosomu
- 5 Digesce
- 6 Tvorba reziduálního tělíska
- 7 Exocytóza

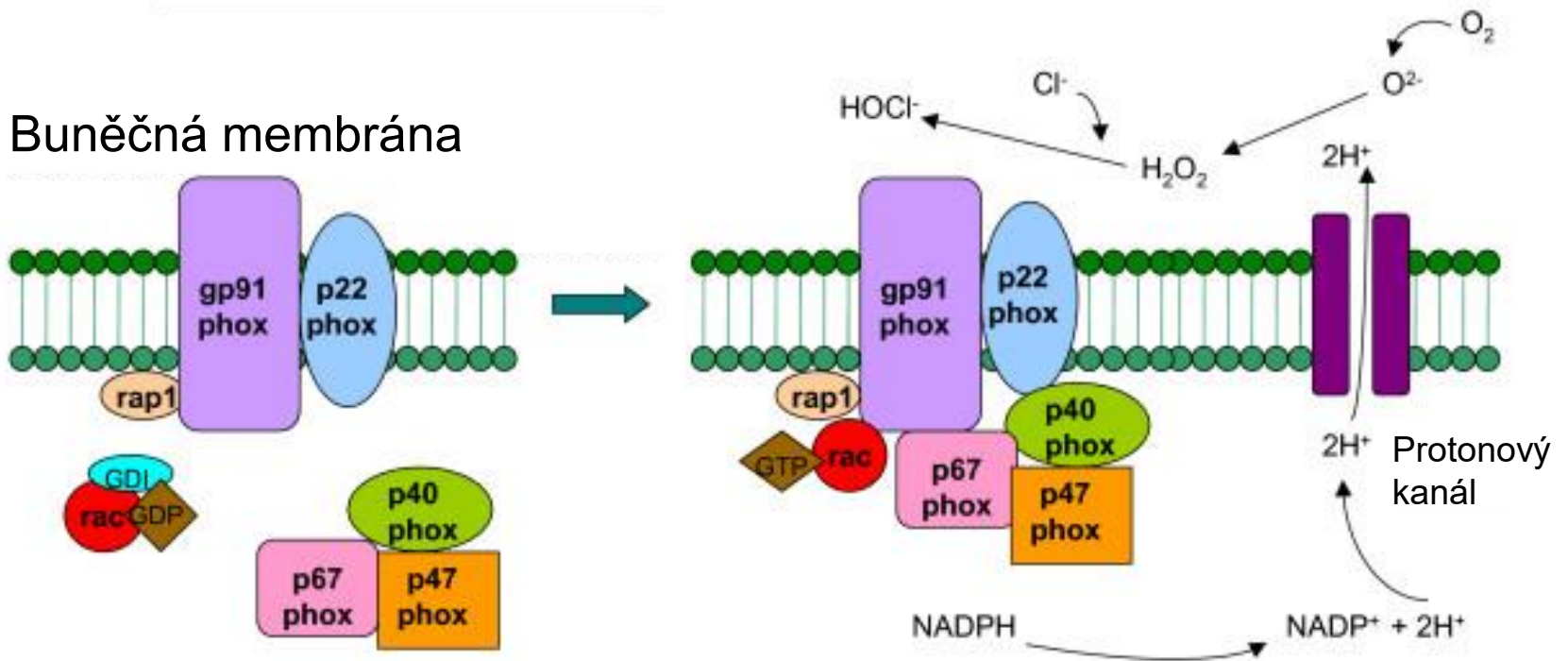
Zabíječské mechanismy fagocytů

Mechanismus	Specifické produkty
Acidifikace	pH = 3,5 – 4,0 (bakteriostatické, baktericidní)
Toxické RMK	Superoxidový aniont, peroxid vodíku, singletový kyslík, hydroxylový radikál, chlornany
Toxické RMD	Oxid dusnatý
Antimikrobiální peptidy	Defensiny, kationické proteiny
Enzymy	Lysozym, kyselé hydrolasy
Další	Laktoferin, protein vázající vitamin B12

Figure 2-6 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

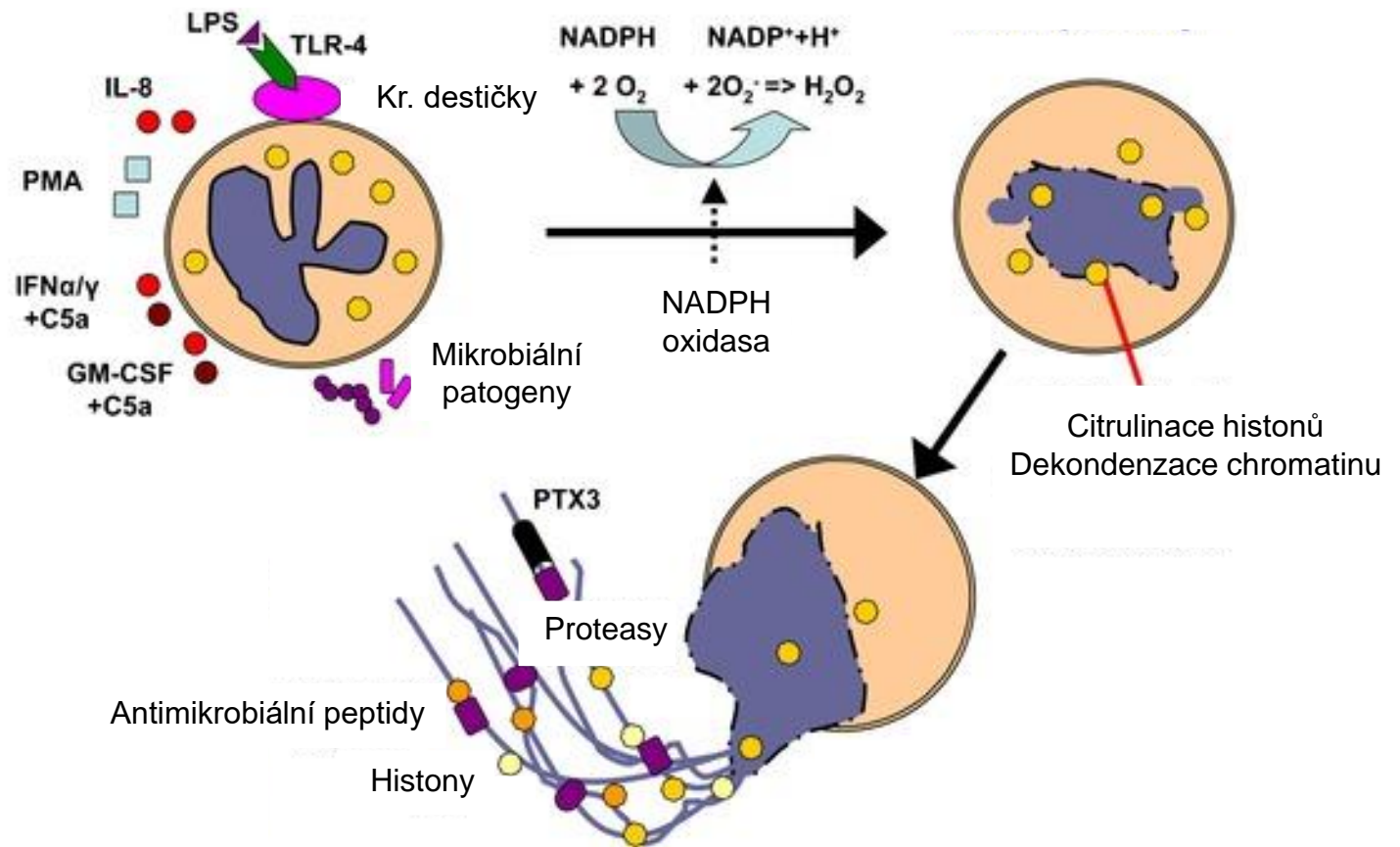
Aktivace NADPH oxidasy

Buněčná membrána



Cytosol

Tvorba neutrofilních extracelulárních pastí (NETs)



Správná funkce fagocytů je pro organismus nezbytná

Deficience ve funkcích fagocytů = těžký průběh banálních infekcí

Příklad: CGD – defektní NADPH oxidasa

Naopak hyperaktivace fagocytů – problémy

poškození okolních buněk a tkání reaktivními metabolity a proteolytickými enzymy

Komplement

Komplement: historie

Objeven v r. 1894 – 1899

Jules Bordet (1870-1961)

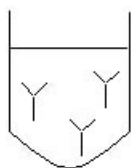
Pracoval v Mečnikově laboratoři
(Pasteurův ústav v Paříži)

Serum z morčat imunizovaných proti choleře ve zkumavkách aglutinovalo *Vibria cholerae* (průkaz specifických protilátek k antigenu). Po vazbě na Ag byly senzitivovány další molekuly (došlo k bakteriolyze) nazvané Bordetem alexin, nyní komplement. Komplement se váže na Ag-Ab komplex – to je podstatou **komplement fixační reakce**.

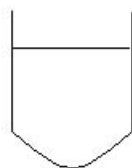
Tato reakce se dodnes používá v diagnostice infekčních nemocí.



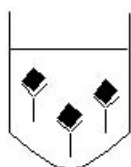
Komplement fixační test



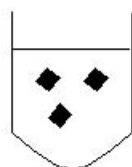
sérum
s protilátkami



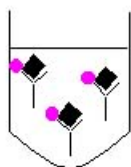
sérum
bez protilátek



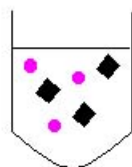
Ag se váže
s protilátkami



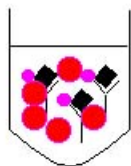
Ag
nenavázaný



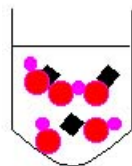
komplement
se váže
s Ag/Ab



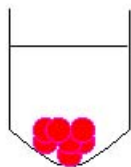
nenavázaný
komplement



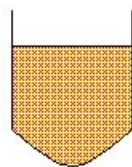
ovčí
erythrocyty + Ab



ovčí
erythrocyty + Ab



žádná
lýze



lýze erythrocytů
komplementem

Komplementový systém

- je složen z různých plasmatických proteinů (30)
- ty mezi sebou reagují
- opsonizují patogen
- indukují zánětlivou odpověď

Komplement - základní pojmy

- C-aktivace: alterace C proteinů a jejich interakce s další složkou (komponentou)
- C-fixace: komplementová utilizace komplexů Ag-Ab
- Hemolytická aktivita: C lyzuje erythrocyty potažené protilátkou
- C-inaktivace: denaturace teplem

Proteiny komplementového systému

Nomenklatura:

- C1komplex(qrs), C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9
- faktory B, D, H a I, properdin (P)
- manózu vázající lektin (MBL), MBL asociované serinové proteasy (MASP-1 MASP-2)

Aktivační produkty komplementových proteinů (nomenklatura)

Aktivované složky jsou obvykle „overlined“: např. C1qrs

Po enzymatickém štěpení se větší štěp obvykle váže na aktivační komplex nebo membránu a menší peptid je uvolněn do okolí.

Písmeno “b” je obvykle používáno pro větší peptid a písmeno “a” pro menší peptid, např. C3b/C3a, C4b/C4a, C5b/C5a)

Obecný biochemický princip kaskády komplementové aktivace

Několik komplementových proteinů jsou **proteasy**, které samotné jsou **aktivovány proteolytickým štěpením**.

Tyto enzymy jsou nazývány zymogeny.

Cesty komplementové aktivace

Komplementová kaskáda může být aktivována jedním ze tří způsobů:

Klasická cesta – iniciována vazbou C1q

- Vazbou na komplex Ab-Ag
- Vazbou na povrchové komponenty bakterií (proteiny, polyanionické struktury)
- Vazbou na C-reaktivní protein (protein akutní fáze, který se váže na fosfocholinová rezidua bakteriálních polysacharidů)

Lektinová cesta – iniciována vazbou MBL (mannose-binding lectin) = sérový protein, jehož koncentrace vzrůstá v průběhu akutní fáze imunitní odpovědi, na povrchové struktury bakterií a virů, které obsahují manózu

Alternativní cesta – iniciována vazbou spontánně aktivovaného C3 na povrch patogenů

Cesty aktivace komplementu

Klasická
cesta

Lektinová
cesta

Alternativní
cesta

závislá na protilátkách

nezávislé na protilátkách

Aktivace C3

generování C5 konvertasy

aktivace
C5

LYTICKÁ cesta

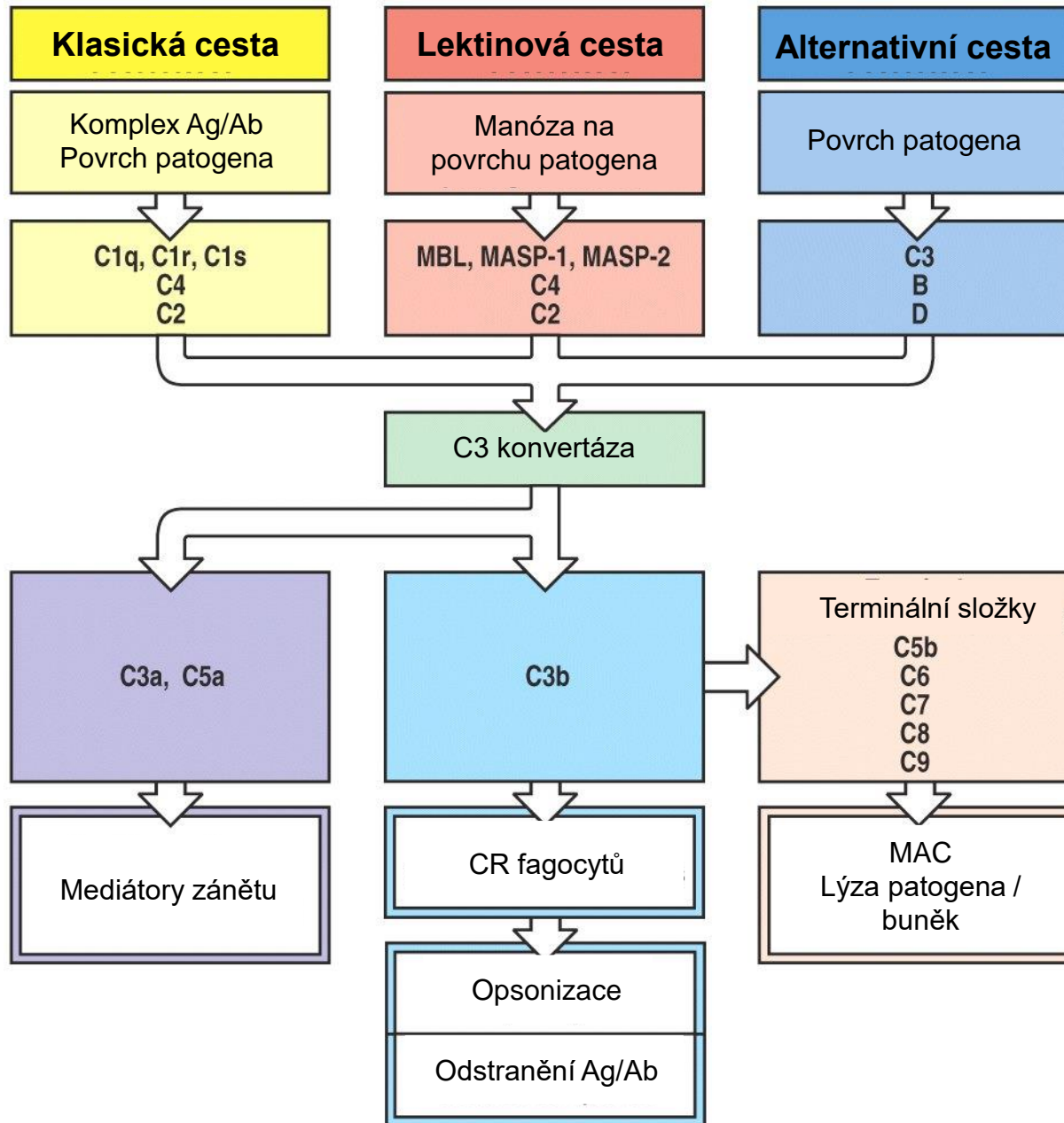


Figure 2-19 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Aktivace klasické cesty

C1q je komplex se 6 hlavičkami = vazebné místo
C1q je asociováno po 2 molekulách C1r a C1s
Vazba na povrch znamená v konečném důsledku
aktivaci C1r, následně C1s a štěpení C4.

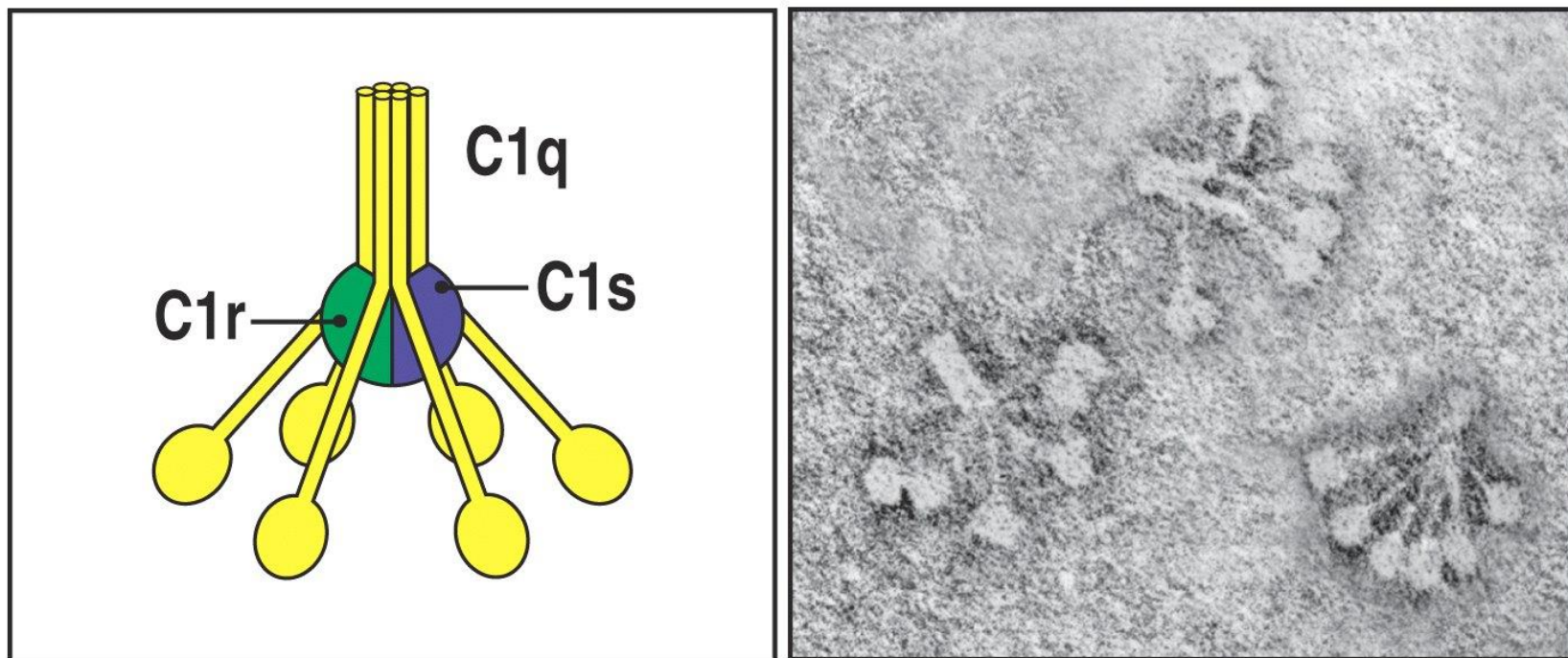


Figure 2-21 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Aktivace lektinové cesty

MBL (mannose binding lectin) připomíná C1 komplex. S 6 hlavičkami s afinitou pro cukerné struktury povrchu patogenů je asociováno po 2 molekulách MBL-associated serine protease (MASP-1 a MASP-2). Vazba na povrch znamená aktivaci MASP a štěpení C4.

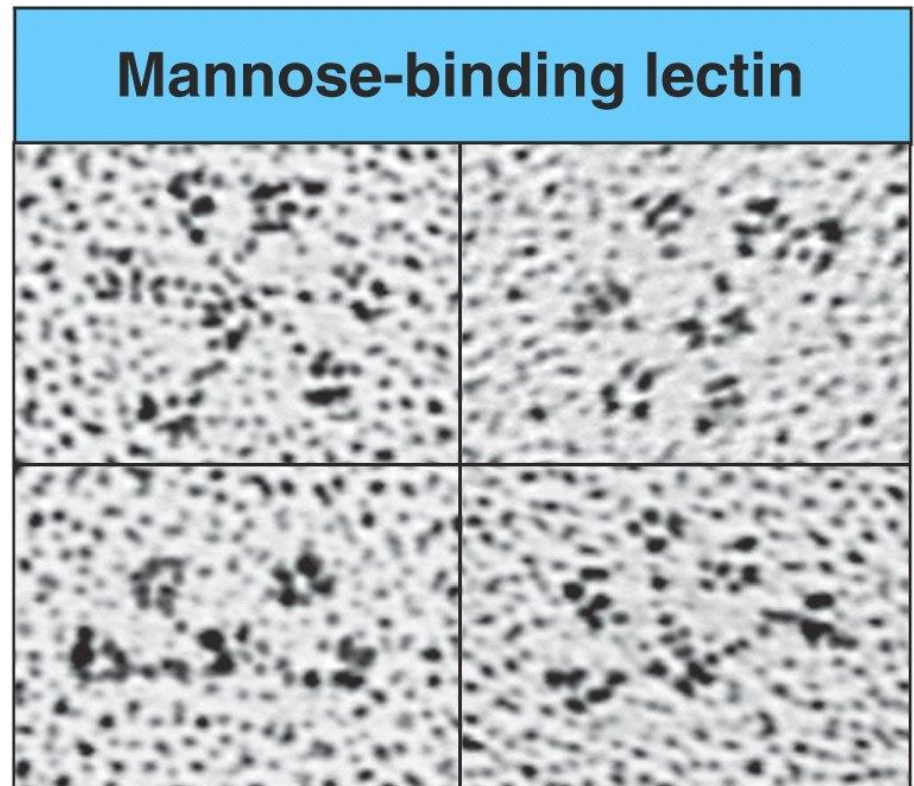
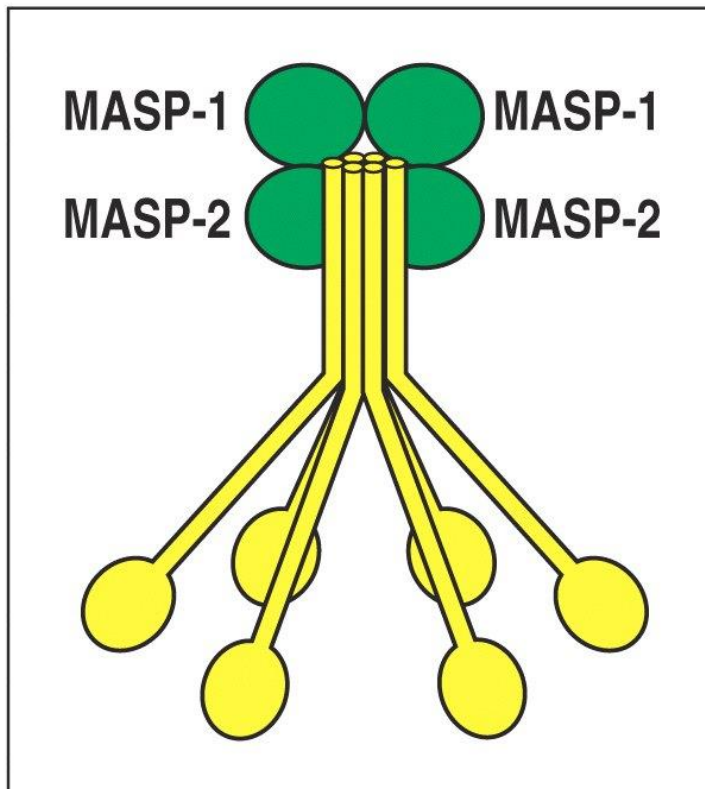


Figure 2-24 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Aktivace klasické (i lektinové) cesty

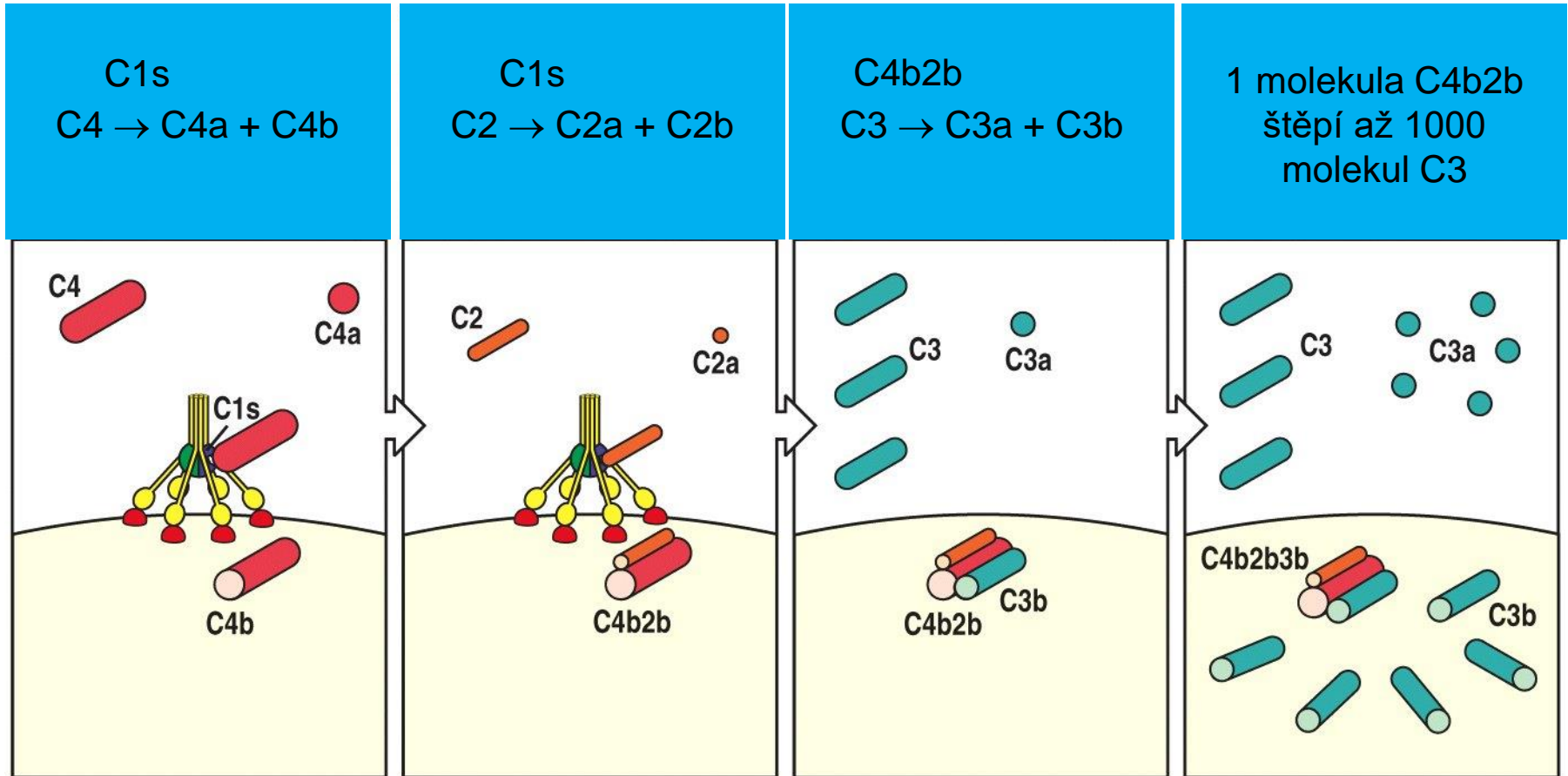


Figure 2-22 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

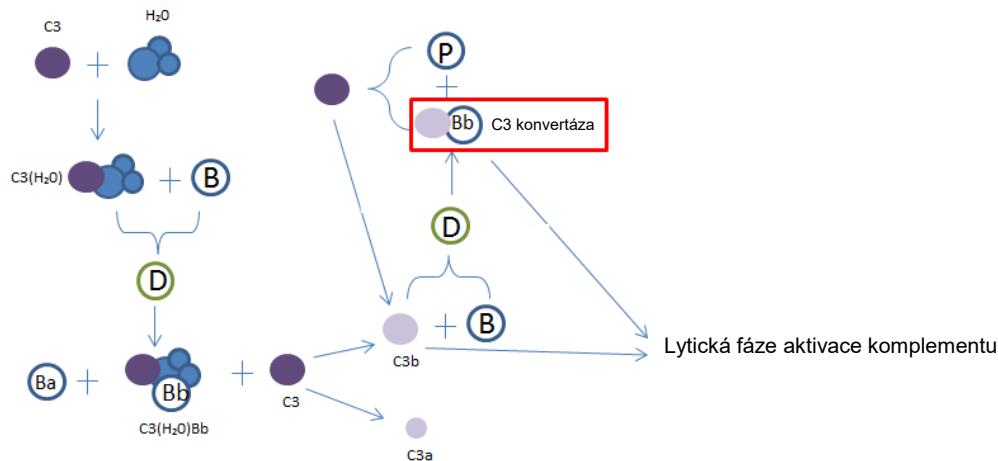
Spuštění alternativní cesty:

C3 komponenta je štěpena spontánně (hydrolyza thioesterových vazeb) – vznik $C3(H_2O)$ = funkčně aktivní C3

$C3(H_2O)$ váže faktor B, který je následně štěpen faktorem D

Vzniká rozpustná C3 konvertasa, která štěpí další C3 na C3a a C3b

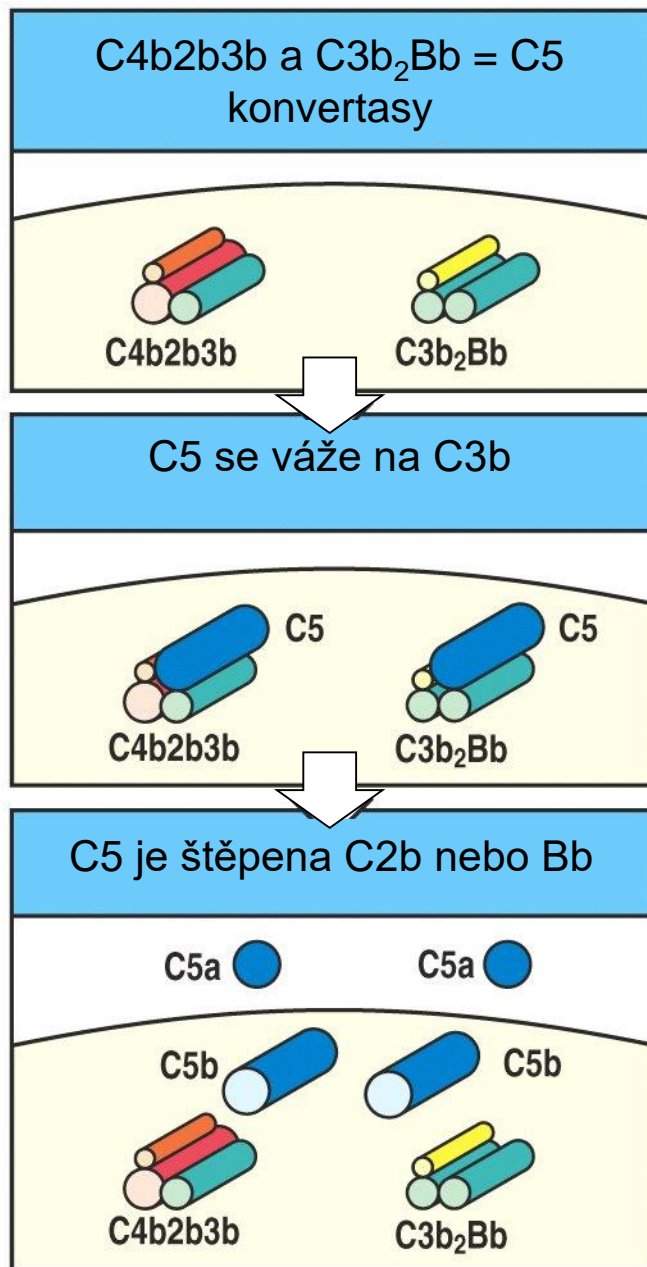
C3b se váže na povrch vlastních buněk nebo na povrch patogena



Pokud je na povrchu vlastních buněk, je rychle inaktivován – vznik $iC3b$

Pokud je $C3bBb$ na povrchu patogena – nejsou přítomny regulující proteiny
Potom se váže faktor P – properdin, který stabilizuje $C3bBb$ konvertázovou aktivitu

$C3bBb$ je ekvivalentem $C4b2b$ klasické cesty



C4b2b3b z klasické (resp. lektinové) cesty

nebo jeho ekvivalent C3b₂Bb z alternativní cesty

jsou C5 konvertasy

Figure 2-30 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

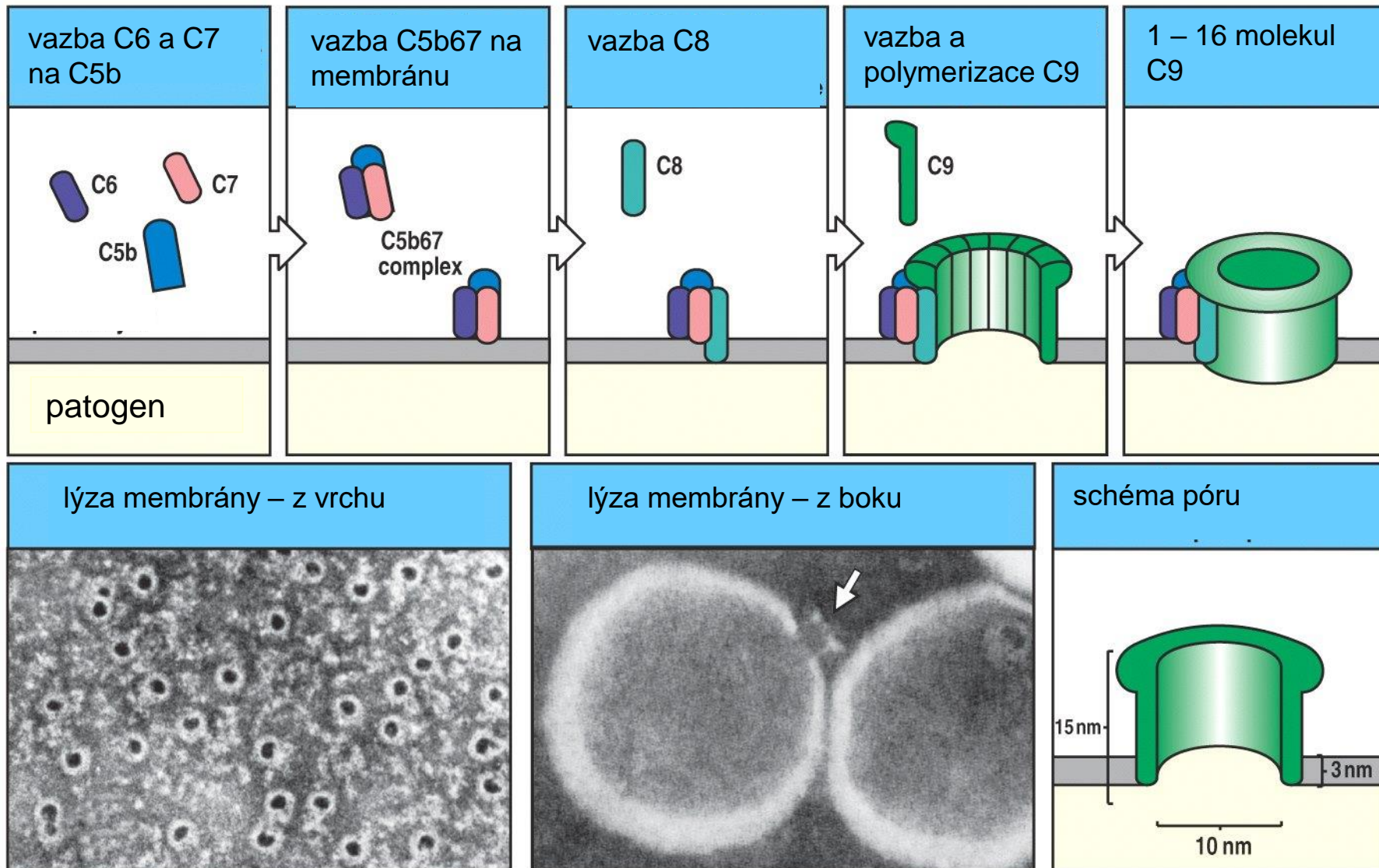


Figure 2-35 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Výsledek aktivace komplementu

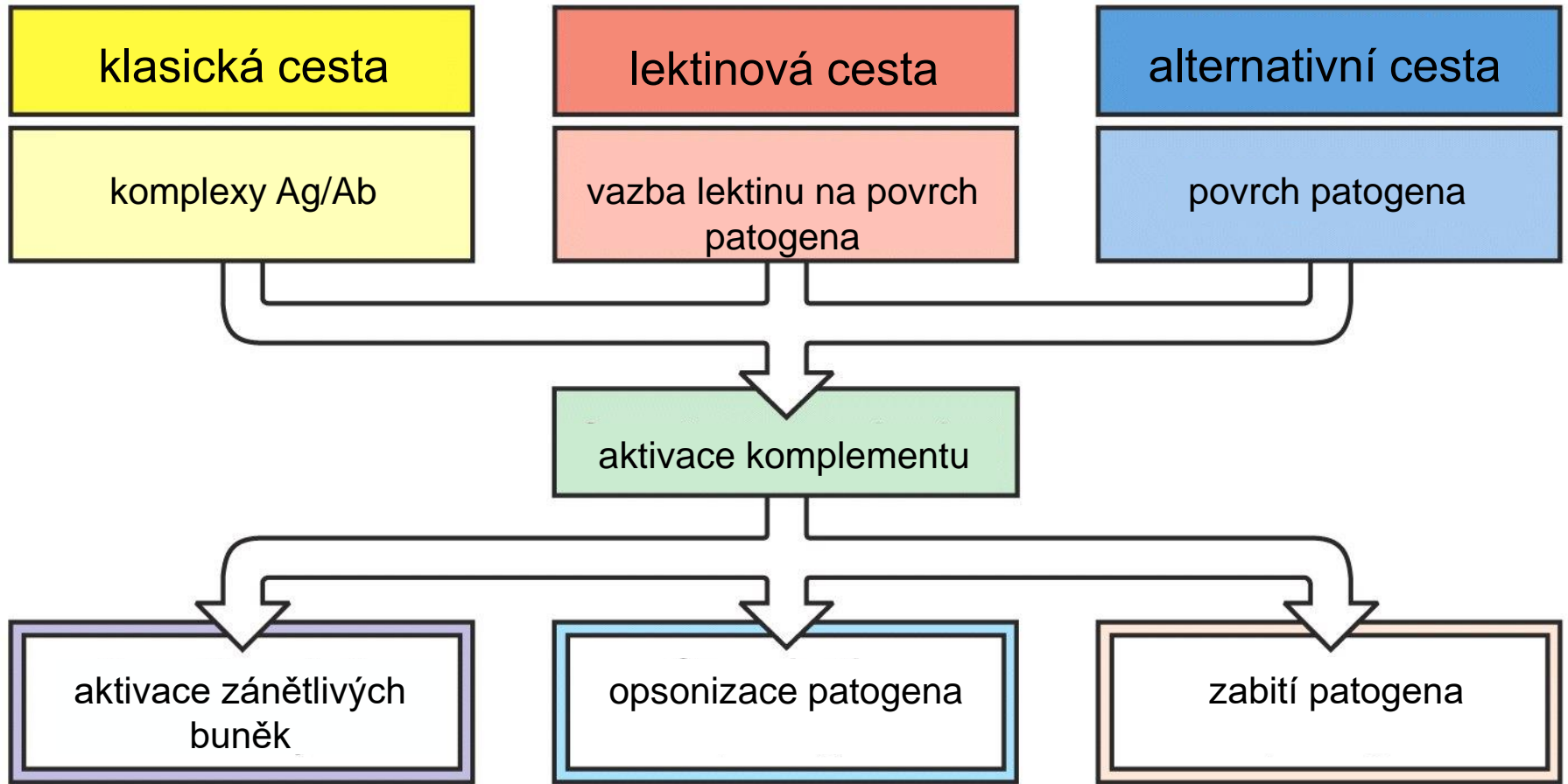


Figure 2-18 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Funkční třídy proteinů komplementového systému	
Vazba na Ag/Ab	C1q
Vazba na manózu	MBL
Aktivační enzymy	C1r C1s C2b Bb D MASP-1 MASP-2
Proteiny vázající se na membránu a opsoniny	C4b C3b
Mediátory zánětu	C5a C3a C4a

Funkční třídy proteinů komplementového systému	
Proteiny atakující membránu	C5b C6 C7 C8 C9
Komplementové receptory	CR1 CR2 CR3 CR4 C1qR
Proteiny regulující komplement	C1INH C4bp CR1 MCP DAF H I P CD59

Figure 2-20 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

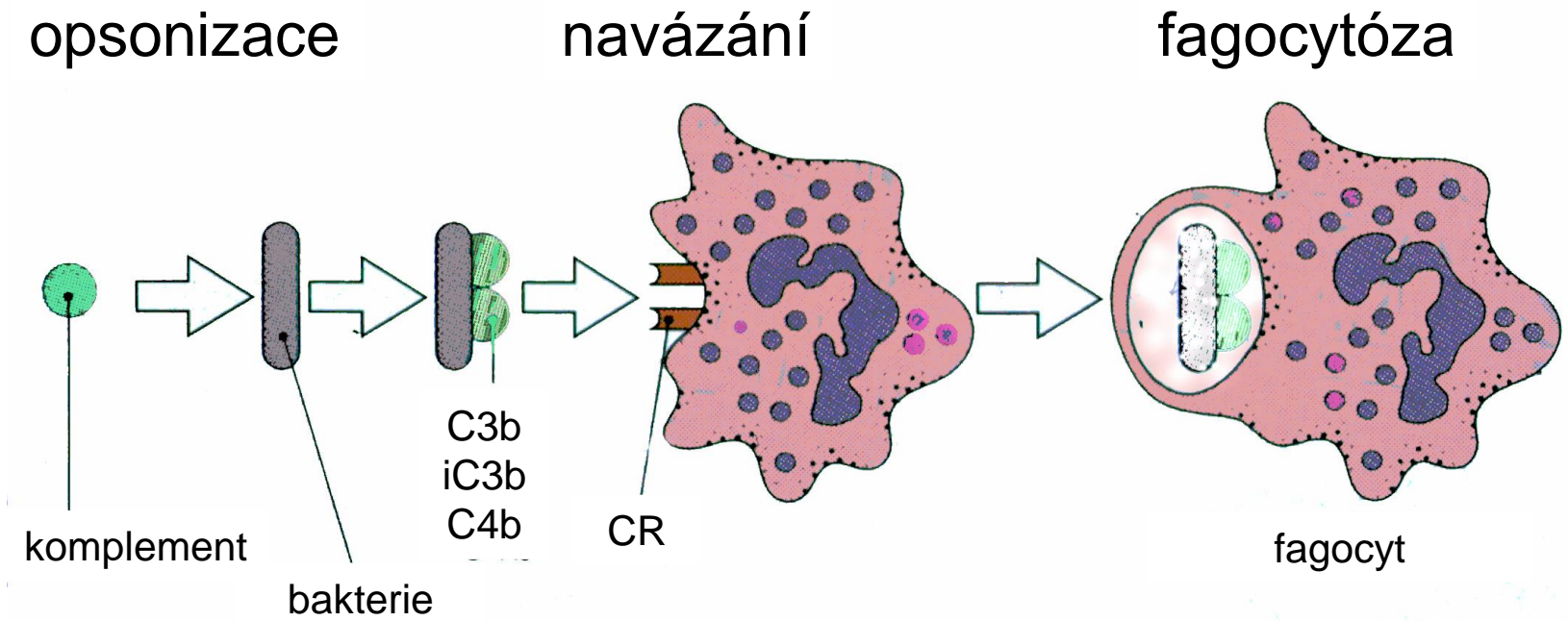
receptor	specifická	funkce	buněčný typ
CR1 (CD35)	C3b, C4b iC3b	stimulace fagocytózy	Makrofágy, monocyty, neutrofil, FDC, erytrocyty, B-lymfocyty
CR2 (CD21)	C3d, iC3b, C3dg Epstein- Barr virus	součást koreceptoru B-lymfocytů	B-lymfocyty FDC
CR3 (Mac-1) (CD11b/ CD18)	iC3b	stimulace fagocytózy	Makrofágy, monocyty, neutrofil, FDC
CR4 (gp150,95) (CD11c/ CD18)	iC3b	stimulace fagocytózy	Makrofágy, monocyty, neutrofil, DC
C5a receptor	C5a	aktivace G proteinu anafylatoxin	endotel., žírné b, fagocyty
C3a receptor	C3a	aktivace G proteinu anafylatoxin	endotel., žírné b, fagocyty

Figure 2-31 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Biologické efekty produktů komplementové aktivace

- C3a (anafylatoxin) - degranulace žírných buněk; zvýšená vaskulární permeabilita; anafylaxe
- C3b (opsonin) - opsonizace; aktivace fagocytů
- C4a – anafylaxe
- C5a - anafylaxe jako u C3, ale intenzivnější; atraktant a aktivátor neutrofilů, vyvolává agregaci neutrofilů, stimulaci oxidativního metabolismu a uvolnění leukotrienů, degranulaci žírných buněk
- MAC – cytolýza

Opsonizace a fagocytóza



Komplement – shrnutí účinků

- užitečné:
 - opsonizace a usnadnění fagocytózy
 - chemoatrakce a aktivace fagocytů
 - lýza bakterií a infikovaných buněk
 - regulace protilátkové odpovědi
 - clearance imunických komplexů
 - clearance apoptických buněk
- škodlivé:
 - zánět, anafylaxe