

## ÚLOHA 5: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů in vitro metodou chemiluminiscence

### Princip

Fagocyty, především neutrofily reagují na stimulační podnět oxidativním vzplanutím, při kterém se tvoří kyslíkové radikály – tzv. **Reaktivní Kyslíkové Metabolity** (RKM, z angličtiny ROS). Tyto radikály představují velmi silný baktericidní mechanismus fagocytů.

Dojde-li k požití patogenní částice dojde k jejímu uzavření ve fagosomu. Ten později fuzuje s lyzozomem a patogeny jsou eliminovány různými enzymatickými a neenzymatickými mechanismy. Klíčovým enzymem ve tvorbě RKM a procesu likvidace patogenů je NADPH-oxidáza, která přenáší elektron na molekulární kyslík a ten se tímto redukuje na superoxidový radikál. Superoxidový radikál je pak základem pro další RKM, např. peroxid vodíku či hydroxylový radikál. Peroxid vodíku může dále vstupovat do reakce s myeloperoxidázou a Cl<sup>-</sup> ionty, při které se tvoří vysoce reaktivní oxidanty, včetně kyseliny chlorové.

Chemiluminiscence (CL) je záření, které je emitované látkami po jejich návratu z excitovaných hladin. Chemiluminiscenci lze obecně vyjádřit vztahem:



V tomto vztahu si lze jako luminofor představit jakoukoli látku, která je schopna po excitaci vyžádit světelné kvantum. K jejich excitaci v tomto případě dochází prostřednictvím RKM. Jelikož je přirozená chemiluminiscence fagocytů velmi nízká, používá se pro účely diagnostiky specifických luminoforů (luminol, izoluminol, lucigenin), jejichž schopnost chemiluminiscence je velmi vysoká. K měření chemiluminiscence slouží přístroje zvané luminometry. Výsledkem této metody je tedy světelné kvantum, které odráží oxidační aktivitu měřené suspenze.

U fagocytů lze detekovat chemiluminiscenci spontánní nebo aktivovanou. Při spontánní CL se detekuje kvantum světla emitované u neaktivovaných fagocytů, zatímco při aktivované CL dochází ke stimulaci fagocytů prostřednictvím látek zvaných aktivátory. Běžně jsou používány aktivátory jako opsonizovaný zymozan (OZP) či forbomyristátacetát (PMA). Například OZP aktivuje fagocyty prostřednictvím vazby na komplementové a imunoglobulinové receptory díky opsoninům ze séra, které jsou zachyceny na povrchu zymozanových částic. Aktivovaná CL lépe odráží potenciál fagocytů k likvidaci patogenů.

Měření CL začíná ihned po smíchání všech substancí reakční směsi a měří se intenzita reakce v čase (kinetika). Ve vyhodnocení se pak uvádí grafické znázornění intenzity CL v závislosti na čase nebo tabulkové porovnání integrálů, světelných maxim nebo času jejich dosažení u jednotlivých vzorků.

### Výhody a nevýhody

Vlastní měření je poměrně rychlé, ovšem příprava roztoků je náročná. Moderní levná metoda. Dobře reprodukovatelná. Nutno mít k dispozici poměrně specifický přístroj (luminometr). Lze pracovat jen s čerstvými vzorky (ne staršími než 2 hodiny).

### Chemikálie a roztoky

1. Zásobní roztok Luminolu [0,01 M] ( $M = 177,16$ )
2. Zásobní roztok OZP [5 mg/ml]  
*Pozn.: Před použitím nutno zředit 2x v HBSS tak aby pracovní roztok měl koncentraci 2,5 mg/ml.*
3. Hanks ballanced salt sollution (HBSS, Hanksův roztok) pH 7,4

Vzorek: Heparinizovaná myší krev.

Je lepší využít menších množství plné krve (vysoké ředění v jamce), neboť hemoglobin z erytrocytů zhasí CL. Heparin ve vyšších koncentracích také tlumí chemiluminiscenci, ovšem pro naše účely je vliv heparinu zanedbatelný. Použijeme koncentraci heparinu 50 U/ml krve.

## Přístroje a pomůcky

Luminometr.

Šablona s jednorázovými stripy (plastové mikrojamky) nebo mikrotitrační destička. Pipety a špičky.



## Postup

1. Společně naředíme OZP na pracovní koncentraci 2,5 mg/ml (2 eppendorfky na skupinu):  
500 µl zásobního roztoku OZP + 500 µl HBSS
2. Každý si naředí krev v pracovním pufru HBSS:  
10 µl krve + 5 ml HBSS
3. Pipetovat na desku v pořadí dle následujícího schématu (zleva doprava – viz poslední řádek):

		[µl]					
		Paralelky	HBSS	Luminol	Aktivátor	ředěná plná krev	
Spontánní	Blank <b>S</b>	2	275	25	-	-	
	Vzorek	2	25	25	-	250	
Aktivovaná	Blank <b>OZP</b>	2	250	25	25	-	
	Vzorek	2	-	25	25	250	

pořadí pipetování na destičku: 1. 2. 3. 4.

Tab 2. Pořadí pipetování na mikrotitrační destičku. Každý vzorek bude měřený v duplikátech. Čísla uvádějí pipetované objemy přímo na destičku. Jak je vidět místo aktivátoru se ve spontánní CL dává stejný objem HBSS.

		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12													
Spontánní	Blank S	A													
		B													
	vzorek	C													
		D													
Aktivovaná	Blank OZP	E													
		F													
	vzorek	G													
		H													
			st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st. 10	st. 11	st. 12	

Tab. 3. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každý student bude mít 1 sloupec, což popisuje poslední řádek (zkratka st. = student).

4. Ihned po napipetování destičky měříme na luminometru v režimu:  
interval mezi jednotlivými měřeními: 90 s  
počet měřících cyklů: 40  
teplota: 37 °C  
bez třepání

## Hodnocení

Přístroj pracuje s jednotkami RLU (*relative light unit*), které udávají relativní svítivost vzorků. Výstupem je objemná tabulka, ve které jsou hodnoty RLU pro každou jamku v různých časech. S tabulkou lze pracovat v excelu nebo jiném tabulkovém programu.

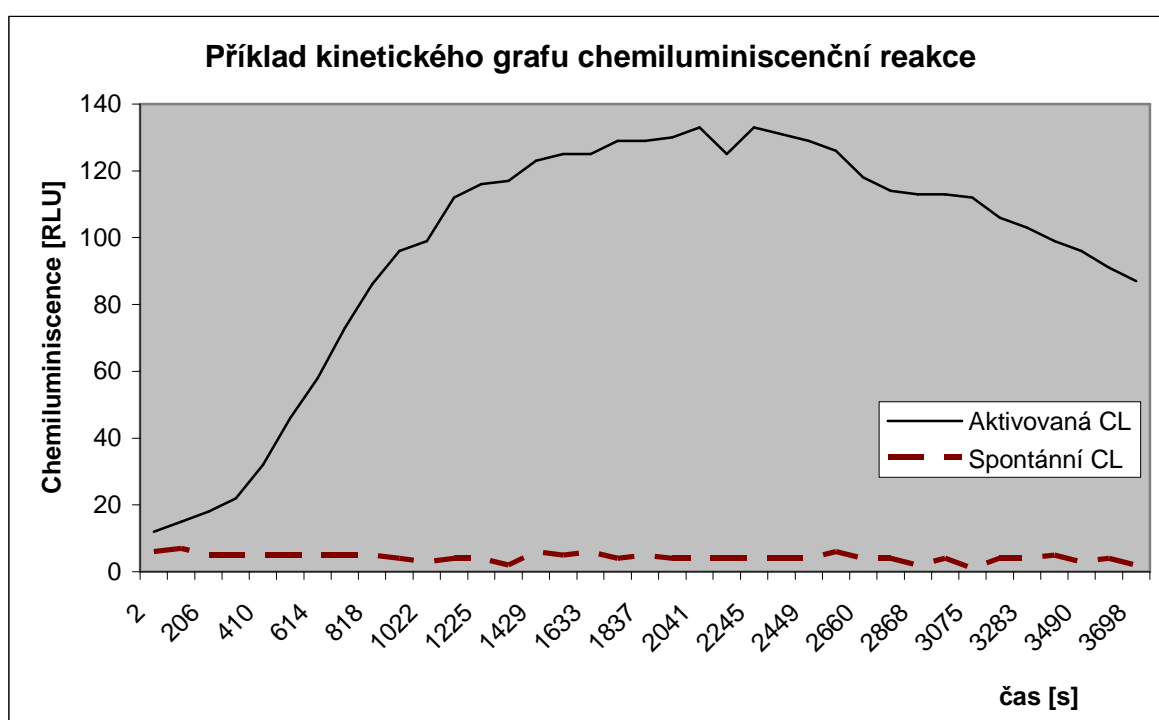
## Výstup

Jako výstup uveďte do tabulky následující údaje pro každý vzorek:

1. Maximum chemiluminiscence (tzv. **peak**), kterého bylo v průběhu měření dosaženo
2. **Času kdy bylo maxima dosaženo**
3. **Integrál**, jako plocha pod kinetickou křivkou

*Nezapomeňte, že pracujete v duplikátech, takže je třeba vytvořit průměr z obou jamek téhož vzorku.*

Dále vytvořte z původních hodnot graf kinetiky, ve kterém bude znázorněn průběh CL v čase pomocí křivky. V grafu porovnejte spontánní CL a aktivovanou CL.



Vždy je třeba uvést při jaké koncentraci luminolu a aktivátoru bylo měření provedeno, tj. jaká je koncentrace v reakční směsi (v jamce) - tyto hodnoty vypočteme z koncentrací uvedených v sekci *chemikálie a roztoky*. Stejně tak je třeba uvést finální ředění krve v reakční směsi.

*Pozn.: Pro potřeby přesných srovnání jednotlivých vzorků je nutné naměřený CL signál přepočítat na počet fagocytů (uvádí se chemiluminiscence na  $10^6$  fagocytů).*