

# 1 Fagocytóza a metody jejího sledování

Fagocytóza je jedním ze základních projevů živočišných buněk. V savčím mnohobuněčném organismu existuje celá řada buněk, u kterých je schopnost fagocytózy zachována, ovšem pouze určitá skupina z nich využívá fagocytózu k jinému účelu než k získávání potravy. Tyto buňky se označují jako profesionální fagocyty a lze je rozdělit do dvou skupin podle toho, zda jsou určeny k přímé likvidaci škodlivin (neutrofilů, eozinofilů) nebo zda mají za úkol také zpracování a prezentaci antigenu (dendritické buňky, monocyty, makrofágy).

Po požití patogenní částice fagocytem, dojde k jejímu uzavření ve fagozomu. Ten později fúzuje s lyzozomem a patogeny jsou eliminovány různými enzymatickými a neenzymatickými mechanismy. Proces fagocytózy se tedy skládá z několika dílčích kroků:

<b>Krok fagocytózy</b>	<b>Metoda k jeho detekci</b>
1) Chemotaxe	Boydenova komůrka, Rebuckovo kožní okénko
2) Rozpoznání / navázání	MSHP test
3) Pohlcení	MSHP test
4) Degradace / usmrcení	Detekce oxidativního vzplanutí, baktericidní test

Pro stanovení fagocytózy existuje více metod, přičemž některé se zaměřují pouze na jednotlivé dílčí kroky (např. na pohlcení – MSHP test, nebo na degradaci - oxidativní vzplanutí), zatímco jiné metody jsou schopny monitorovat celý proces fagocytózy (baktericidní test z plné krve). V každém z dílčích kroků fagocytózy může docházet k poruchám. Uvedené testy nás informují pouze o celkovém průběhu fagocytózy či jejího dílčího kroku a nelze tedy s jejich pomocí určit konkrétní příčinu poruchy.

## 5.1 TESTY PRO STANOVENÍ CHEMOTAXE

Pro průběh chemotaxe je nutný:

- 1) podnět (chemokiny, leukotrieny apod.)
- 2) receptory pro výše uvedené signální molekuly (podněty)
- 3) cytoskelet umožňující lokomoci buněk

### 5.1.1 Boydenova komůrka

Je založena na průchodu fagocytů přes nitrocelulózovou membránu z jedné části nádoby do druhé, kde je umístěn chemoatraktant. Počet buněk, které vykazují pozitivní chemotaxi, je možné kvantifikovat. V současnosti se tato metoda již velmi nepoužívá pro velkou pracnost, variabilitu výsledků a poměrně malou výpovědní hodnotu.

### 5.1.2 Rebuckovo kožní okénko

Princip je založen na migraci leukocytů do místa zánětu (poškození tkáně). Sterilní krycí sklíčko se přikládá v určitých časových intervalech na pokožku, která se předtím naruší sterilním skalpelem. Leukocyty, které pronikly na povrch do místa zánětu, pak ulpí na přiloženém sklíčku. Sklíčko se obarví a výsledek se hodnotí vizuálně.

## 5.2 TESTY PRO STANOVENÍ MÍRY INGESCE

### 5.2.1 MSHP test

Slouží k detekci míry pohlcování (ingesce). Při testu jsou používány hydrofilní částice vyrobené z hydroxyethylmetakrylátu (MSHP). Tyto částice mají nízký negativní náboj, a proto pouze minimálně nespecificky adherují na buňky a vzájemně neagregují. Pro stanovení ingesce se používá plná krev. Reakční poměry složek udává výrobce MSHP, test trvá 30 – 60 minut a inkubuje se při 37 °C. Dále je

potřeba zajistit mírné třepání během celého procesu – buňky musí mít relativní klid na ingesci partikulí, ale zároveň partikule nesmí klesnout na dno reakční směsi. Ze suspenze buněk a partikulí se zhotoví krevní nátěr, který se obarví. Intenzita fagocytózy se poté hodnotí ve světelném mikroskopu. Jako pozitivní se zpravidla označují buňky, které pohltní 3 a více partikulí. Lze hodnotit i počet partikulí fagocytovaných jednou buňkou.

Z protisrážlivých aditiv lze pro účely MSHP testu použít heparin nebo EDTA. Heparin se používá v koncentraci 10 – 50 U/ml, ale mírně tlumí míru fagocytózy. EDTA zase vychytává vápenaté ionty, které jsou nutné pro aktivaci buněk.

**Výhody:** Jednoduchost, přístrojová a časová nenáročnost (hodina inkubace + půl hodiny vyhodnocení), nízká cena.

**Nevýhody:** Nutná zkušenost s vyhodnocováním, krev musí být čerstvá (do dvou hodin po odběru), nutnost použití antikoagulantů.

**Využití:** Výpovědní hodnota této metody je omezená - měřit lze pouze snížení hodnot. Zvýšení nelze dost dobře detekovat, neboť každý fagocyt je schopen fagocytózy, pokud je mu dodán substrát v nadbytku.

Ke snížení fagocytózy však dochází pouze za velmi vážných stavů, jako jsou například konečná stadia nádorových onemocnění nebo těžké imunodeficence. Nízkou schopnost fagocytózy mají také prekuzory periferních neutrofilů – tyčky. Větší využití má metoda ve výzkumu než v klinické praxi. Například v toxikologických testech, kdy xenobiotika mohou ovlivňovat funkce fagocytů. Další využití je při sledování účinnosti léčby kolonie stimulujícími faktory (GM-CSF).

## 5.3 DETEKCE OXIDATIVNÍHO VZPLANUTÍ

### 5.3.1 Chemiluminiscence

Chemiluminiscenční (CL) analýza umožňuje sledování cidní schopnosti fagocytů. K tomu, aby mohlo dojít k cidnímu působení na cizorodé částice, je ovšem nutné, aby byly funkční všechny předchozí fáze fagocytózy (rozpoznání, navázání, pohlčení). Z tohoto pohledu nás tedy CL stanovení informuje o funkčnosti celého procesu fagocytózy od prvního kontaktu s částicí až po její rozklad.

Vlastní proces tvorby kyslíkových radikálů ve fagocytu se označuje jako **oxidativní vzplanutí** (*respiratory burst*). Pro označení kyslíkových radikálů se v literatuře používají zkratky RKM nebo RKI (reaktivní kyslíkové metabolity/intermediáty) nebo z angličtiny ROS (reactive oxygen species). **Nejvíce RKM produkují neutrofil.** RKM se začínají tvořit ve větším množství v okamžiku, kdy je škodlivina uzavřena ve fagozomu a tento fagozom fúzuje s lyzozomy za vzniku fagolyzozomu.

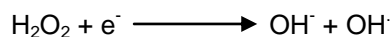
**Klíčovým enzymem je NADPH oxidáza v membráně fagocytů**, která přenáší elektron na molekulový kyslík, čímž se tvoří superoxidový radikál:



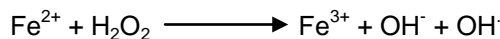
Vzniklý **superoxidový radikál** je základem pro celou řadu dalších RKM. V kyselém prostředí přímo generuje peroxid vodíku, v neutrálním nebo alkalickém prostředí je tato přeměna katalyzována **superoxid dismutázami** (SOD). V živočišných tkáních je vzhledem k pH častější katalyzovaná forma reakce, která je také výrazně rychlejší, ovšem ve fagolyzozomu je nízké pH a pravděpodobně zde reakce může běžet i bez katalýzy.



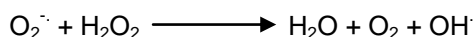
**Peroxid vodíku** je malá molekula, která může difundovat přes membrány, což zvyšuje jeho biologickou nebezpečnost. Zároveň je velmi reaktivní a může přímo oxidovat biomolekuly. Peroxid vodíku je také základem pro tvorbu dalšího vysoce reaktivního člena kyslíkových radikálů – **hydroxilového radikálu** (OH<sup>·</sup>).



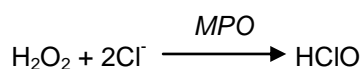
Hydroxilový radikál je velmi silný oxidant. Reakce, které na uvedeném oxidačně redukčním principu vedou k jeho vzniku, se nazývají **Fentonova reakce** a **Haber-Weisova reakce**. Podstatou Fentonovy reakce je dekompozice peroxidu vodíku v přítomnosti  $\text{Fe}^{2+}$  iontů.



Haber-Weisova reakce je založena na interakci peroxidu vodíku se superoxidovým aniontem katalyzované železnatými ionty.



Enzym **myeloperoxidáza** (MPO) je přítomen v azurofilních granulích neutrofilů a patří do skupiny peroxidáz - tedy enzymů, jejichž substrátem je peroxid. MPO katalyzuje tzv. myeloperoxidázovou reakci.



V živých systémech je však průběh složitější, vznikají i jiné produkty, než uvedená kyselina chlorná, a jako halogenidové anionty se mohou uplatňovat kromě chloru i  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ . Kyselina chlorná je považována za silný oxidant (pro představu: je to substance obsažená v přípravku SAVO).

Všechny uvedené látky působí jako oxidanty. Chemiluminiscenční analýza je založena na reakci **luminoforu** (**luminol**, izoluminol nebo lucigenin) s těmito oxidanty, zejména s peroxidem vodíku. Při reakci dochází k oxidaci luminolu na nestabilní meziprodukt, který vyzařuje energii v podobě modrého světla. Konečným produktem vzniklým z luminolu je aminoftalát. Vzniklé světlo je okem nepozorovatelné, ale je ho možné detekovat na speciálním přístroji – luminometru. Míra produkce světla je přímo úměrná produkci RKM a přímo úměrná intenzitě fagocytózy.

Vzorky pro CL analýzu se vyšetřují vždy v paralelkách, stanovení je vysoce citlivé. Lze hodnotit jednak **spontánní**, tak **aktivovanou CL**. Spontánní nás informuje o „klidové“ produkci RKM. V případě aktivované do vzorku přidáme nějakou substanci, kterou fagocyty pohlcují. Tak vlastně napodobujeme stav, který v organismu nastává při vniknutí cizorodých částic. Použitou substanci označujeme jako **aktivátor fagocytózy**. Mohou to být různé látky jako

- *bakteriální suspenze*
- *škrobové částice*
- *zymosan*, což je složka buněčných stěn kvasinek
- *phorbolmyristát acetát* (PMA), což je látka, která se zapojuje do procesu přenosu signálu uvnitř neutrofilu. Aktivuje přímo proteinkinázu C a dále pak NADPH oxidázu.

Některé aktivátory (nejčastěji zymosan) se mohou před použitím ještě tzv. **opsonizovat**, což znamená, že se na jeho povrch naváží opsoniny ze séra (protilátky přes  $F_{ab}$  fragment a C3 složka komplementu). Tato úprava usnadní rozpoznání a navázání částice na fagocyty a tím se zesílí CL signál. Hovoříme potom o opsonizovaném zymosanu (**OZP**). Aktivovaná CL lépe odráží potenciál fagocytů likvidovat patogeny.

Měření CL odpovědi trvá zpravidla jednu hodinu a výsledkem je CL křivka, která má za fyziologických podmínek tvar charakteristický pro použitý vzorek (plná krev, izolované fagocyty, buňky z in vitro kultur – např. HL-60) a pro příslušný aktivátor, který byl použit. 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 (peak time) u jednotlivých vzorků.

**Výhody:** CL metoda dovede zachytit širší spektrum poruch (včetně deficitů myeloperoxidázy), než ostatní metody používané při studiu fagocytózy včetně NBT testu. Touto metodou lze sledovat i zvýšené hodnoty oxidativního vzplanutí, které mohou být nebezpečné. Při těchto stavech bývá zvýšena i spontánní CL. Dobře reprodukovatelná metoda.

**Nevýhody:** CL aktivitu je nutné měřit do dvou hodin po odebrání krve, to je bohužel v terénu těžko dosažitelné. Krev musí být nesrážlivá, přičemž se musí počítat s tím, že antikoagulancia mohou mírně zhášet CL vyvazováním vápenatých iontů. Při delším skladování krve dochází k její aktivaci kontaktem s povrchy zkumavek apod. a výsledek stanovení může být tímto zkreslený. Měření trvá poměrně dlouho – jednu hodinu. Výsledek je nutno většinou přepočítat na počet buněk ve vzorku nebo dát do vzorku již známý počet buněk. To je nutné, abychom mohli jednotlivé vzorky vzájemně porovnávat (*pozor: vysoký signál nemusí nutně znamenat zvýšenou produkci RKM jednotlivých buněk, může být způsoben vyšším počtem fagocytů ve vzorku*). Vzhledem k tomu, že luminometry nepatří k běžnému vybavení klinických laboratoří, je tato metoda využívána spíše jen ve výzkumu nebo v rámci speciálních vyšetření deficitů fagocytózy.

*Pozn.:* Popsaný mechanismus tvorby RKM, který je nezbytně nutný pro likvidaci patogenů, se však může za určitých patologických okolností obrátit proti vlastnímu organismu a poškozovat vlastní buňky a tkáň. Potom hovoříme o tzv. **oxidativním poškození tkání**. I v tomto případě hrají roli hlavních producentů kyslíkových radikálů neutrofilové buňky, které mají schopnost pronikat v místě zánětu do tkání a to i ve velkém množství a zde tyto agresivní metabolity kyslíku uvolňovat.

### 5.3.2 NBT test

Při stanovení se využívá substrát NBT (nitroblue-tetrazolium chlorid). Detekce oxidačního metabolismu je založena na redukcí bezbarvé tetrazoliové soli (NBT) na barevný formazán. NBT vstupuje do buněk a po jejich aktivaci se vlivem oxidačních pochodů ve vakuole nebo na membránách buněk redukuje na barevnou formu – tmavě modrý formazán. Touto metodou se prokazuje hlavně schopnost fagocytů tvořit kyslíkové radikály aktivací NADPH oxidázy. Reakci lze vyhodnocovat odečítáním v optickém mikroskopu, kdy se hodnotí procento pozitivních buněk, tedy těch, které obsahují tmavě modré skvrny formazánu. Další možností je spektrofotometrické hodnocení intenzity vzniklého zbarvení. Metodu lze kombinovat se sledováním ingesce MSH partikulí a zjistit tak, zda buňky, které fagocytují, jsou schopny tvořit kyslíkové radikály cestou oxidativního vzplanutí.

**Výhody:** Metoda je levná, nenáročná.

**Nevýhody:** Krev musí být podobně jako u ostatních metod detekce fagocytózy zpracována do dvou hodin po odběru.

## 5.4 TESTY PRO STANOVENÍ CELKOVÉHO PRŮBĚHU FAGOCYTÓZY

### 5.4.1 Baktericidní test

Test zachycuje všechny fáze fagocytózy. Princip je stejný jako u MSHP, pouze místo částic se využívá živého patogenu (*Candida albicans*, *Stafylococcus aureus*). Test se provádí v plné krvi nebo na izolovaných granulocytech. Jelikož fagocyt využívá více mikrobicidních faktorů, není možno případný defekt fagocytózy v buňce přesně lokalizovat.

**Vyhodnocení:** U velkých mikroorganismů (*C. albicans*) lze test vyhodnocovat mikroskopicky po obarvení např. trypanovou modří. Hodnotí se množství usmrcených (obarvených) mikroorganismů. Před vlastním hodnocením je třeba leukocyty zlyzovat. U malých mikroorganismů (*S. aureus*) se využívá hodnocení na kultivačních půdách. Baktérie se po proběhnutí reakce vysadí na živnou půdu a ty, které přežily, vytvoří kolonie. Ve výsledku se tedy hodnotí počet vzniklých bakteriálních kolonií.

**Výhody:** Vyhodnocení celkového průběhu fagocytózy pomocí přirozených patogenů.

**Nevýhody:** Metoda je náročná na práci a těžko standardizovatelná. Je opět potřeba čerstvá krev, antikoagulancia a neustálé třepání. Pro kultivace mikrobu je nutné zázemí mikrobiologické laboratoře. Při pasážování mikroorganismu navíc dochází ke snižování jeho virulence a změnám antigenních vlastností, což je příčinou obtížné srovnatelnosti jednotlivých stanovení.

## ÚLOHA 4: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů in vitro za pomoci hydrofilních partikulí (MSHP)

### Princip

Inkubujeme-li krev se speciálními mikročásticemi, dochází k nespecifické imunitní reakci – pohlcování částic fagocytujícími buňkami. Po inkubaci se z krve zhotoví krevní nátěr, který se obarví kyselými a zásaditými barvivy a vyhodnocuje se pod světelným mikroskopem. K testu je zapotřebí plná krev, která je čerstvá a obsahuje vitální buňky označované jako profesionální fagocyty (neutrofilny, eozinofily, monocyty). Částice, které se používají k tomuto stanovení, jsou komerčně dodávané a označují se jako **mikrosférické hydrofilní partikule (MSH partikule, MSHP)**. Jedná se o malé kuličky z hydroxyethylmetakrylátu o velikosti 1  $\mu\text{m}$ , které jsou při vyhodnocování ve světelném mikroskopu dobře pozorovatelné uvnitř fagozomů profesionálních fagocytů. Sleduje se počet buněk, které fagocytovaly, a také počet částic v jednotlivých fagocytujících buňkách.

### Chemikálie a roztoky

- komerčně dodávaná souprava MSHP: *obsahuje partikule v množství 600 000/ $\mu\text{l}$  destilované vody a fosfátový pufr (PBS)*
- komerčně dodávaná souprava na barvení krevních nátěrů – Leukodif

### Měření vzorek

- heparinovaná myší krev

*Pozn.: Při stanovení fagocytózy u člověka nemá koncentrace heparinu překročit 10 U/ml plné krve. Myší krev však vykazuje vyšší schopnost koagulace než lidská, proto ve cvičení budeme používat vyšší koncentraci heparinu a to 50 U/ml.*

### Přístroje a pomůcky

Inkubátor na 37 °C s možností třepání, podložní sklíčka.

### Postup

1. Společně si ve skupině připravíme do mikrozkušavky směs MSH partikulí s PBS (1 : 1)  
*500  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku partikulí + 500  $\mu\text{l}$  PBS → důkladně protřepejte*
2. Každý zvlášť si do mikrozkušavky připravíme:  
*15  $\mu\text{l}$  ředěné suspenze MSHP z prvního kroku + 30  $\mu\text{l}$  heparinované myší krve*
3. Vzorky inkubujeme při 37 °C po dobu 30 minut. Nemáme-li třepačku, vzorky alespoň 2x během inkubace mírně protřepejeme.
4. Připravíme krevní nátěry z krve inkubované s MSHP (postup najdete v sekci Obecné laboratorní postupy - viz str. X). Nátěr vytvoříme z 5  $\mu\text{l}$  reakční směsi napipetovaných na sklíčko a po zaschnutí jej obarvíme komerční sadou Leukodif.
5. Nabarvené roztěry pozorujeme pod světelným mikroskopem při zvětšení 1000x (imerzní objektiv + imerzní olej).

## Hodnocení

Vyhodnotíme krevní diferenciál ze 100 buněk (způsob vyhodnocení krevního diferenciálu naleznete v sekci Obecné laboratorní postupy – viz str. X). Během počítání buněk si zaznamenáváme jednotlivé typy leukocytů do tabulky včetně počtu zfagocytovaných partikulí. Z krevního diferenciálu určíme procentuální zastoupení fagocytů (sečteme neutrofilů, eosinofilů a monocytů).

## Výstup

Základním výstupem této metody je hodnota udávající počet buněk, které byly schopné fagocytózy (tzv. **pozitivní buňky**). Za pozitivní se obvykle považují buňky, které zfagocytovaly tři a více partikulí. V případě nízké míry fagocytózy partikulí můžeme započítat mezi pozitivní všechny buňky s alespoň jednou zfagocytovanou částicí.

Z hodnoty pozitivních buněk dále vypočítáme:

1) **Fagocytární aktivita** udává procento leukocytů schopných fagocytózy. Jako vstupní hodnoty uvádějte buď absolutní počet buněk (např. 40 pozitivních buněk a 82 fagocytů) nebo relativní počty v procentech (např. 40 % pozitivních buněk ze všech leukocytů a 82 % fagocytů ze všech leukocytů).

$$\text{fagocytární aktivita} = \frac{\text{počet pozitivních buněk} \cdot 100}{\text{celkový počet fagocytů}}$$

2) **Fagocytární index** udávající průměrný počet částic připadajících na fagocytující buňku.

$$\text{fagocytární index} = \frac{\text{počet fagocytovaných částic}}{\text{počet fagocytujících buněk}}$$

*Pozn.: Celkový počet fagocytů představuje všechny buňky schopné fagocytózy, tedy součet neutrofilů, eosinofilů a monocytů. Počet fagocytovaných částic zde znamená celkový počet všech partikulí nalezených uvnitř všech buněk schopných fagocytózy a počet fagocytujících buněk je množství buněk, které pohltily nějakou částici.*

## ÚLOHA 5: Stanovení fagocytární aktivity pomocí škrobových částic

### Princip

Inkubujeme-li krev se suspenzí rýžového škrobu, dochází k nespecifické imunitní reakci – pohlcování škrobových částic krevními fagocyty. Po inkubaci se z krve zhotoví krevní nátěr, který se obarví kyselými a zásaditými barvivy a vyhodnocuje se pod světelným mikroskopem. Částice škrobu se nebarví, můžeme je však celkem dobře pozorovat jako prosvětlená místa v obarvené fagocytující buňce. Jelikož jsou částice v porovnání s buňkami dost velké, bývá v jedné fagocytující buňce obvykle jedna pohlcená částice, pouze výjimečně víc.

Tato metoda je jak přístrojově tak časově nenáročná a také levná. Samotné stanovení fagocytární aktivity trvá přibližně hodinu (30 min inkubace + 30 min vyhodnocení).

### Chemikálie a roztoky

- suspenze škrobových částic – 75 mg rýžového škrobu smícháme se 750 µl fyziologického roztoku a centrifugujeme jednu minutu při nízkých otáčkách, přičemž sedimentují částice, které jsou příliš velké pro účely stanovení fagocytózy. Vzniklý supernatant odpipetujeme a podrobíme druhé centrifugaci, jejímž účelem je zkoncentrování škrobové suspenze. Pro stanovení fagocytární aktivity používáme pelet vzniklý po druhé centrifugaci. Suspenze škrobových částic bude již připravena vyučujícími.
- komerčně dodávaná souprava na barvení krevních nátěrů – Leukodif

## Měřený vzorek

- heparinizovaná myší krev

## Přístroje a pomůcky

Inkubátor na 37 °C s možností třepání, podložní sklíčka.

## Postup

1. Společně si ve skupině připravíme do mikrozkušavky směs škrobu a krve (kapilární krev pro tento účel odebíráme do hematokritových kapilárek):  
*30 µl škrobové suspenze + 120 µl heparinizované krve → mírně protřepejte*
2. Vzorky inkubujeme při 37 °C po dobu 30 minut. Nemáme-li třepačku, vzorky alespoň 2x během inkubace mírně protřepeme.
3. Připravíme krevní nátěry z krve inkubované se škrobovými částicemi (postup najdete v sekci Obecné laboratorní postupy - viz str. X). Nátěr vytvoříme z 5 µl reakční směsi napipetovaných na sklíčko. Snažíme se malou špičkou odebrat vzorek z vrstvičky ležící těsně nad spodní masou erytrocytů, ve které lze očekávat nejvíce leukocytů. Po zaschnutí nátěr obarvení komerční sadou Leukodif.
4. Nabarvené roztěry pozorujeme pod světelným mikroskopem při zvětšení 1000x (imerzní objektiv + imerzní olej).

## Hodnocení

Vyhodnotíme krevní diferenciál ze 100 buněk (způsob vyhodnocení krevního diferenciálu naleznete v sekci Obecné laboratorní postupy – viz str. X). Během počítání buněk si zaznamenáváme jednotlivé typy leukocytů do tabulky a u **fagocytů (neutrofilů, monocytů, eozinofilů)** zaznamenáme i to, zda fagocytoval nebo ne.

## Výstup

Základním výstupem této metody je hodnota udávající počet buněk, které byly schopné fagocytózy (tzv. **pozitivní buňky**). Za pozitivní považujeme buňky, které zfagocytovaly aspoň jednu škrobovou částici.

Z hodnoty pozitivních buněk dále vypočítáme:

**Fagocytární aktivitu** udávající procento leukocytů schopných fagocytózy. Jako vstupní hodnoty uvádějte absolutní počet buněk (např. 40 pozitivních buněk a 82 fagocytů).

$$\text{fagocytární aktivita} = \frac{\text{počet pozitivních buněk} * 100}{\text{celkový počet fagocytů}}$$

*Pozn.: Celkový počet fagocytů představuje všechny buňky schopné fagocytózy, tedy součet neutrofilů, eozinofilů a monocytů.*

## ÚLOHA 6: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů in vitro metodou chemiluminiscence

### Princip

Fagocyty především neutrofilů reagují na stimulační podnět oxidativním vzplanutím, při kterém se tvoří reaktivní kyslíkové metabolity (RKM). Tyto radikály představují velmi silný baktericidní mechanismus fagocytů. Chemiluminiscence (CL) je záření, které je emitované látkami během jejich návratu z excitovaných hladin. CL lze obecně vyjádřit vztahem

*luminofor + energie → přirozeně nestabilní excitovaný luminofor → luminofor + světlo (425 nm)*

V tomto vztahu si lze luminofor představit jako jakoukoli látku, která je schopna během návratu z excitovaného do základního stavu vyzařovat světelné kvantum. K excitaci luminoforu dochází v našem případě prostřednictvím RKM. Jelikož je přirozená CL fagocytů velmi nízká, používá se pro účely diagnostiky specifických luminoforů, jako je např. luminol, jejichž schopnost CL je mnohonásobně vyšší. K měření CL slouží přístroje zvané luminometry. Výsledkem měření je hodnota vzniklého světelného kvanta, která je přímo úměrná míře fagocytózy.

### Měřený vzorek

- **heparinizovaná myší krev.** Je lepší využít menších množství plné krve (vysoké ředění v jamce), protože hemoglobin z erytrocytů zhasí CL. Heparin ve vyšších koncentracích také tlumí chemiluminiscenci, ovšem pro naše účely je vliv heparinu zanedbatelný. Použijeme proto heparin v koncentraci obvyklé pro myší krev – 50 U/ml krve.

### Chemikálie a roztoky

- Hanks Balanced Salt Solution (**HBSS**, Hanksův roztok) pH 7,4
- zásobní roztok **OZP** (5 mg/ml). Pozn.: Před použitím je nutno jej 2x zředit HBSS tak, aby pracovní roztok měl koncentraci 2,5 mg/ml. Ředíte přidáním 500  $\mu$ l HBSS do zkumavky se zásobním roztokem OZP.
- 0,01 M zásobní roztok **luminolu** (3-aminophthalhydrazid;  $M_r = 177,16$ )
- **Türkův roztok** pro barvení leukocytů

### Přístroje a pomůcky

- Bürkerova komůrka
- luminometr
- šablona s jednorázovými stripy (plastové mikrojamky – obr. 5.1) nebo mikrotitrační destička. Pro měření CL je nezbytné použít jamky vyrobené z neprůsvitného materiálu, aby nedocházelo k interferenci signálů z jednotlivých paralelních měření.



Obr. 5.1: Jamky pro měření CL.

### Postup

1. Pro počítání leukocytů si připravíme do zkumavky směs Türkova roztoku s plnou krví. Türkův roztok barví jádra leukocytů a lyzuje erytrocyty. Pro myší krev jej používáme v ředění 1 : 20.  
10  $\mu$ l krve + 190  $\mu$ l Türkova roztoku



2. Společně naředíme OZP na pracovní koncentraci 2,5 mg/ml:  
500  $\mu$ l zásobního roztoku OZP + 500  $\mu$ l HBSS

3. Pipetujeme na desku v pořadí dle následujícího schématu (zleva doprava – viz poslední řádek):

	Jamka	[ $\mu$ l]			
		HBSS	Luminol	Plná krev	Aktivátor
<b>Spontánní CL</b>	A	273	25	2	-
	B	273	25	2	-
<b>Aktivovaná CL</b>	C	248	25	2	25
	D	248	25	2	25

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

Tab.: Pořadí pipetování do jamek na mikrotitrační destičku. *Spontánní i aktivovaná CL budou měřeny v duplikátech, proto bude mít každý student ve výsledku celkem čtyři napipetované jamky. Čísla uvádějí pipetované objemy přímo do jednotlivých jamek. Jak je vidět místo aktivátoru se při měření spontánní CL přidává navíc stejný objem HBSS. Aktivátor se nanáší jako POSLEDNÍ až před vložení destičky do přístroje, abychom zachytili začátek reakce.*

4. Ihned po napipetování všech jamek měříme destičku na luminometru v režimu:

interval mezi jednotlivými měřeními: 90 s

počet měřících cyklů: 40 (přístroj změří desku 40x každých 90 s; celková doba měření je tedy 1 h)

teplota: 37 °C

bez třepání

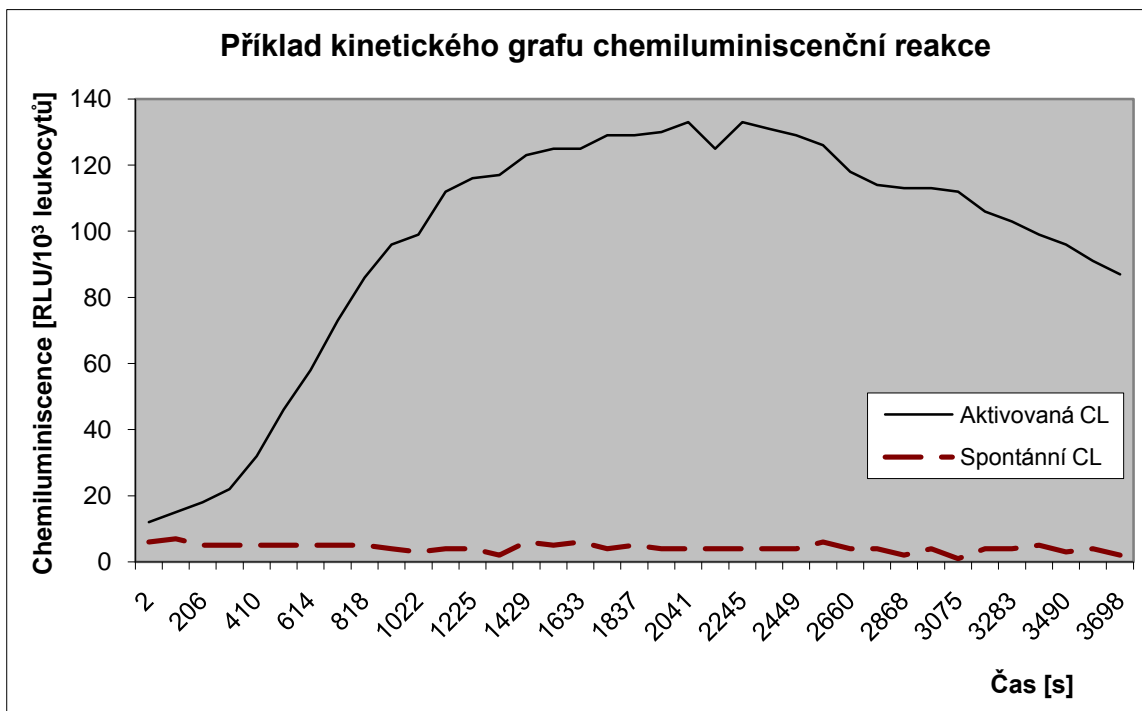
5. Během měření si spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky koncentraci leukocytů ve zkoumaném vzorku myší krve (viz Obecné laboratorní postupy – str. 11). Pro počítání buněk použijeme směs krve s Türkovým roztokem připravenou v kroku 1.

## Hodnocení a výstup

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.

Ze získaných výsledků vytvořte **zjednodušenou tabulku**, ve které uvedete jen průměrné hodnoty z duplikátů. Pomocí známé koncentrace leukocytů (získána v bodu 5 postupu) pak přepočítejte naměřený chemiluminiscenční signál na počet leukocytů. K výpočtu budete potřebovat faktické množství krve v jamce. CL se obvykle uvádí v RLU na  $10^3$  leukocytů.

Dále vytvořte ze získaných hodnot **graf kinetiky**, ve kterém bude znázorněn průběh CL v čase pomocí křivky. V grafu porovnejte spontánní a aktivovanou CL (viz obr. 5.2).



Obr. 5.2: Graf kinetiky spontánní a aktivované CL.

Jako výstup dále uveďte do závěrečné tabulky následující údaje:

1. **Maximum CL** (tzv. peak), kterého bylo v průběhu měření dosaženo. Peak se dá určit obvykle jen u aktivované CL. Pokud se však výrazný peak objevil i na křivce spontánní CL, uveďte jej v tabulce také. Hodnotu maxima CL uveďte v přepočtu na počet leukocytů!
2. **Čas** kdy bylo maxima CL dosaženo.
3. **Integrál** vyjadřující plochu pod kinetickými křivkami spontánní a aktivované CL. Také hodnoty integrálu je nutné vztáhnout na počet leukocytů.

*Pozn.: Hodnoty 1 a 2 vyčtete z vytvořeného grafu kinetiky. Integrál je počítán programem luminometru během samotného měření a najdete jej ve výstupních datech.*