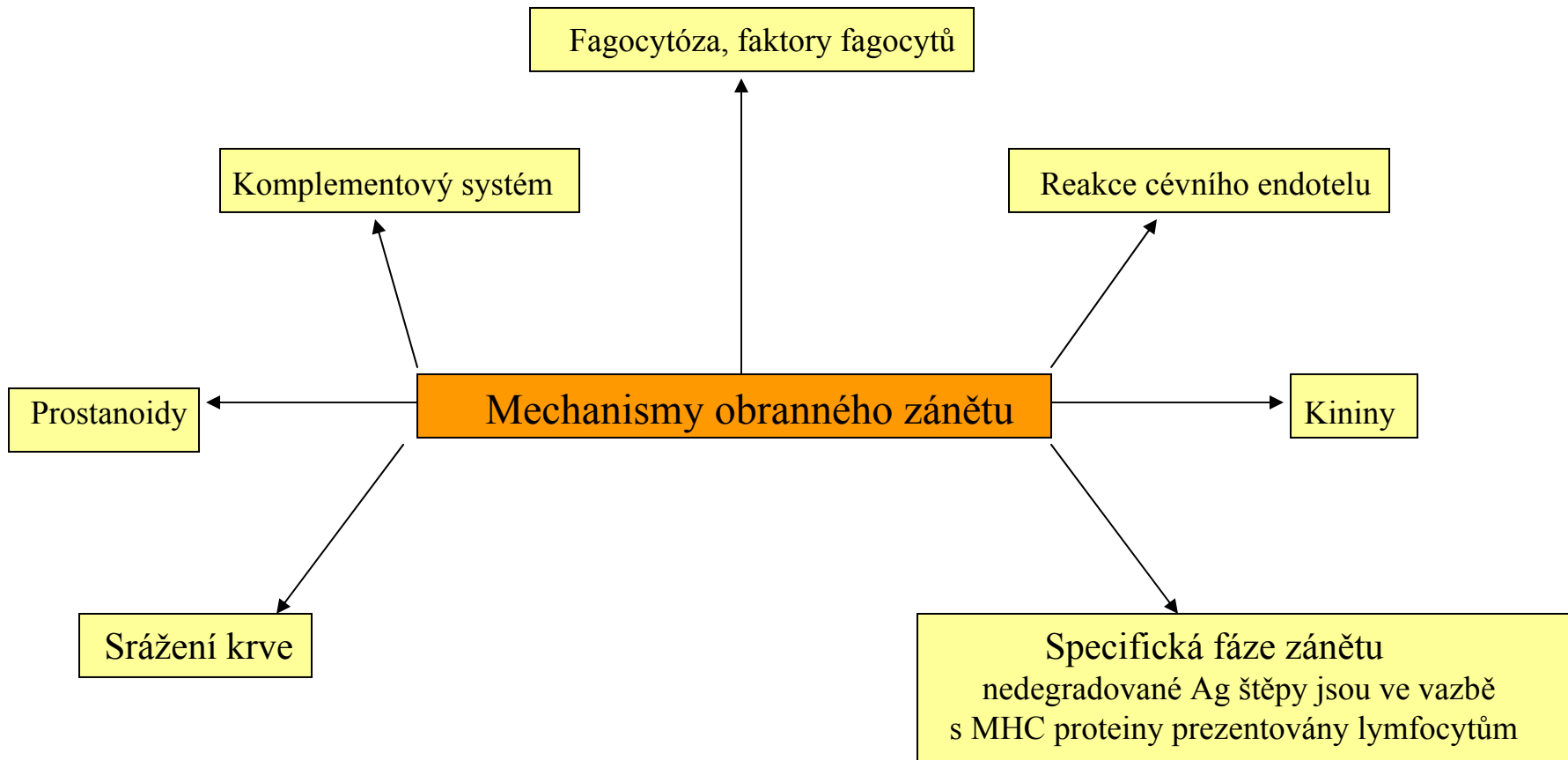
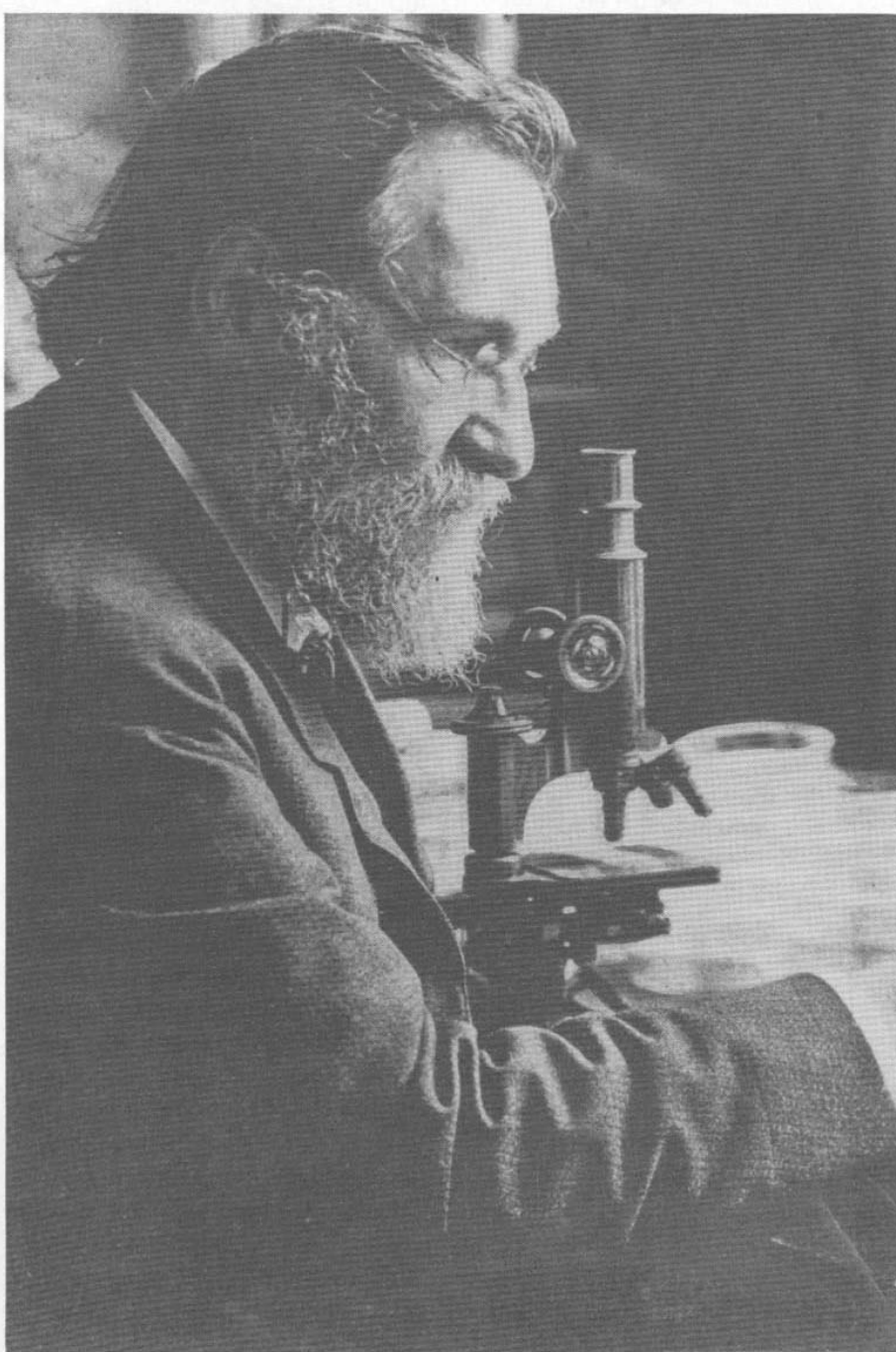


Fagocyty





Elie Metchnikoff (Courtesy National Library of Medicine)

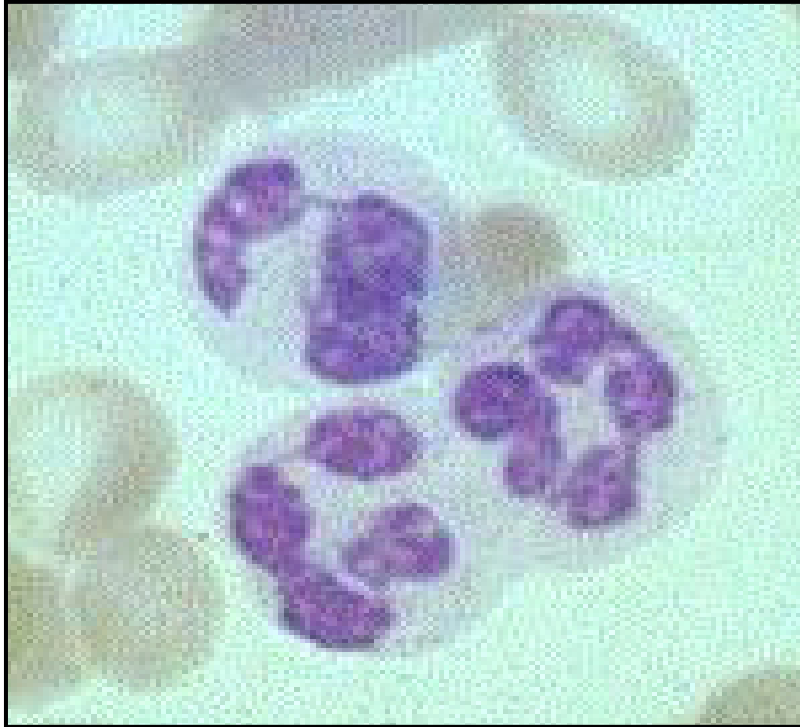
Ilja Mečnikov

Fagocyty larev mořské
hvězdice obklopily třísku;
phagocytóza & digesce
bakterií MΦs & PMNS →
poprvé použit pojem **fagocyt**:
Původ z řeckých slov
phagein – jíst
cytos – buňka

Buněčná podstata imunity

Nobelova cena 1908

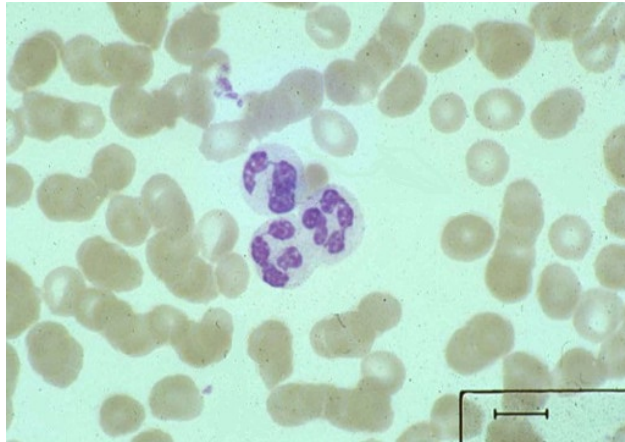
Neutrofily



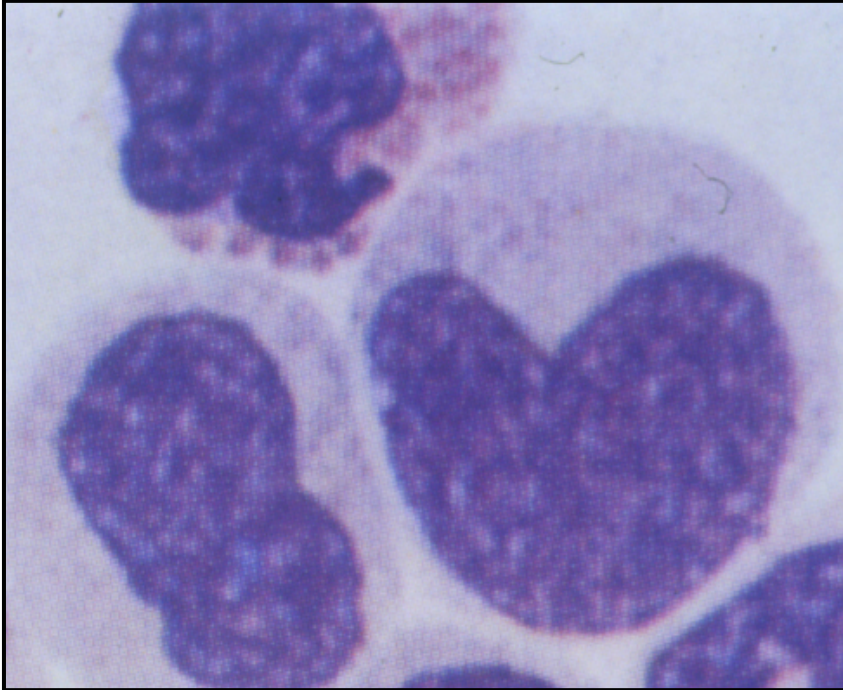
- phagocytóza, intracelulární zabíjení, zánět, poškození tkání
- charakteristické jádro
- granula a CD66 membránový marker
- krátce žijící, v nadbytku v krvi, chybí ve zdravé tkáni

Polymorfonukleární leukocyty (PMNs)

- *40-65% všech leukocytů ($3-5 \times 10^3 / \mu\text{l}$ krve)
- *první obranná linie v boji proti patogenním mikroorganismům
- *chemotaxe
- *fagocytóza
- *generování RMK a RMD
- *degranulace



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

	Monocyty/makrofágy	Neutrofilly
Morfologie	Velké mononukleární buňky s granulární cytoplasmou	Malé buňky s „multi-lobed“ jádrem a neutrálními cytoplasmatickými granulemi
Lokalizace	Krev/tkáně	Krev – odvod do místa infekce
Po zabití bakterie	Migrují do lokálních lymf. uzlin	Umírají na místě apoptózou (zbytek je zlikvidován makrofágy)
Prezentace antigenu	Mohou prezentovat Ag (MHC 2. třídy upregulované IFN γ)	Nemohou prezentovat Ag (neexprimují MHC 2. třídy)

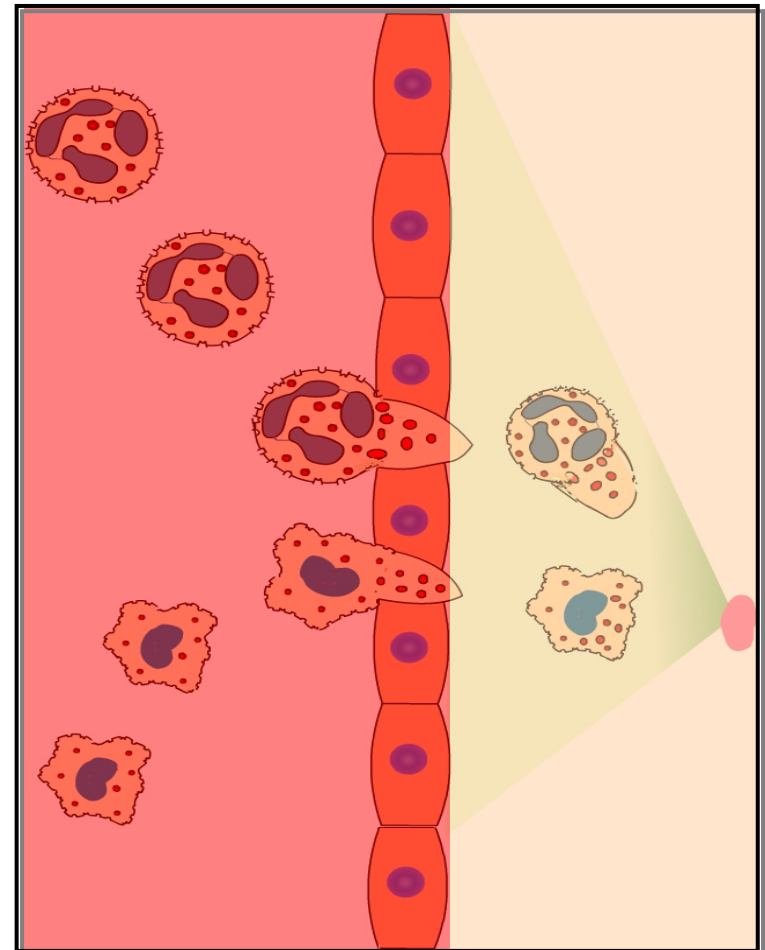
Aktivace fagocytů v zánětu

◆ SOS signály

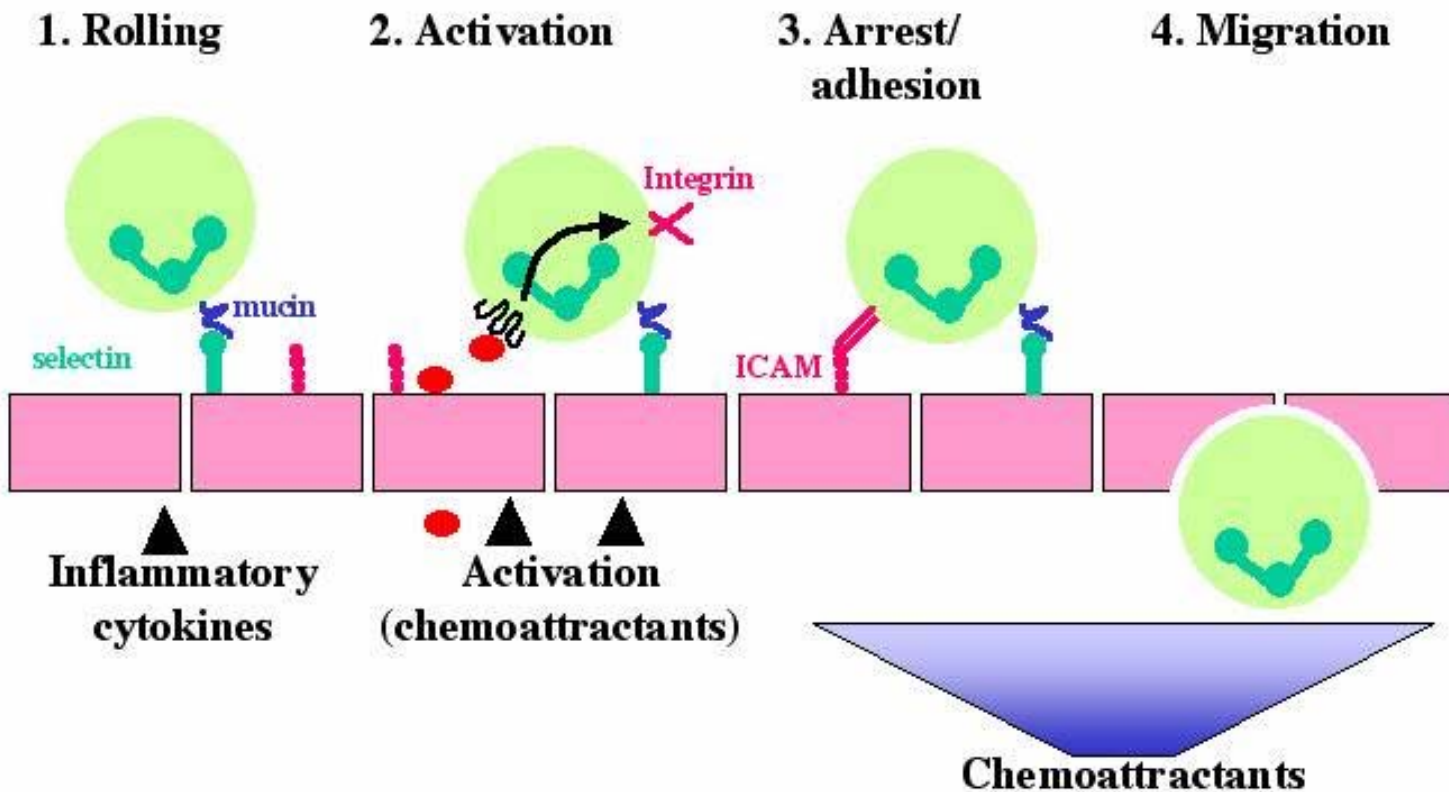
- N-fMLP
- Peptidy z kaskády srážení krve
- PGs, LTs, PAF
- Komplement
- Prozánětlivé cytokiny

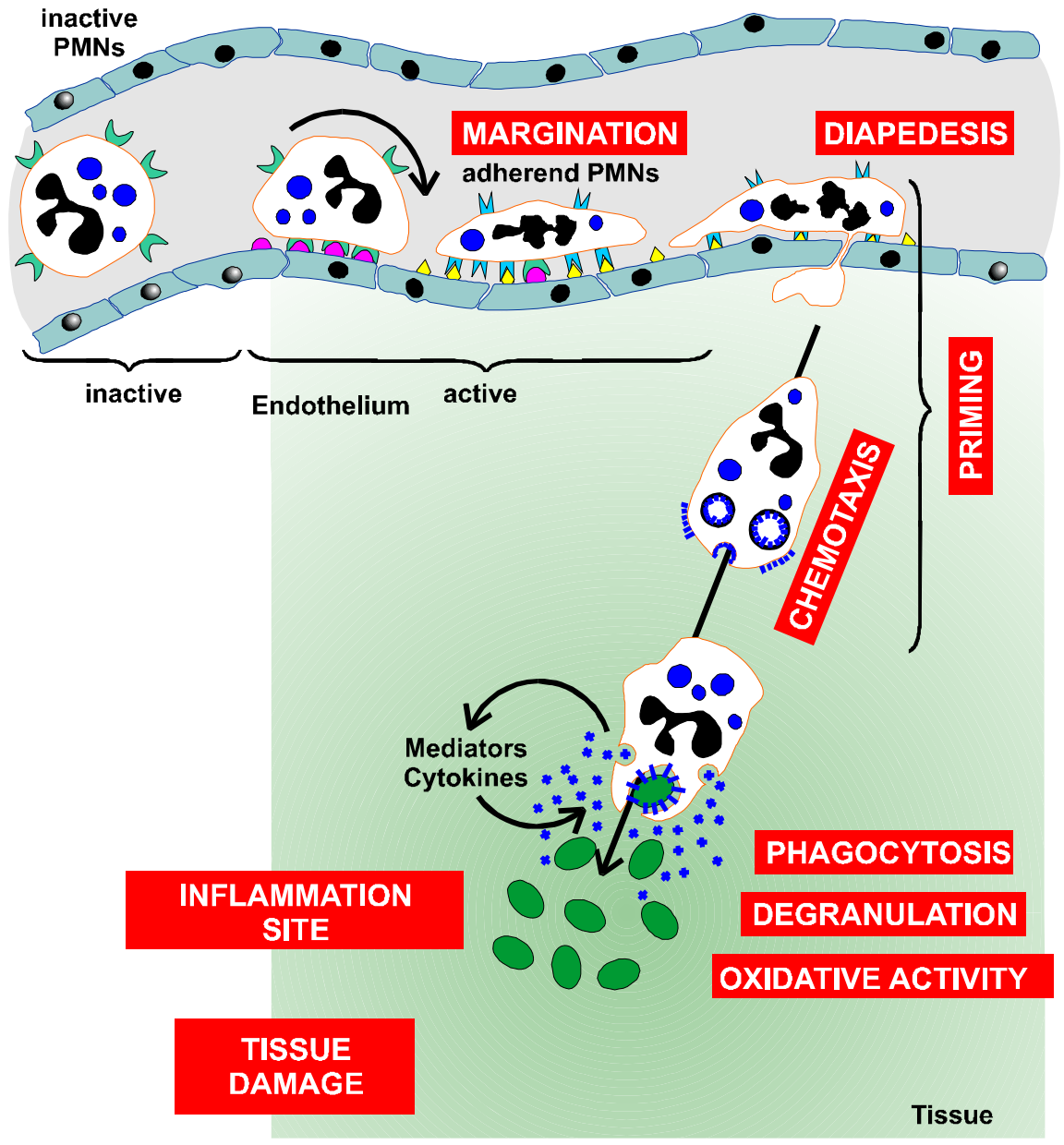
◆ Odpověď fagocytů

- chemotaxe
- adherence
- diapedéza
- aktivace
- fagocytóza a zabití

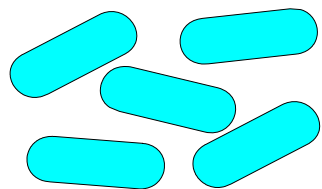


Jak neutrofily dosáhnou místa infekce ?

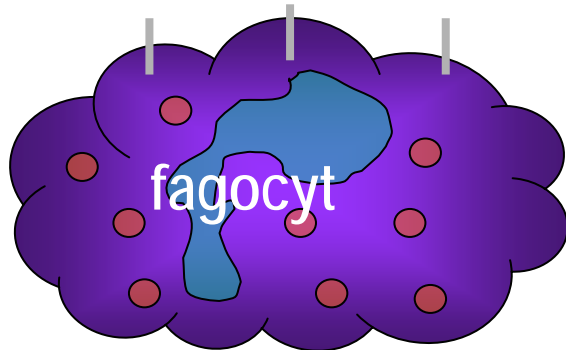




Opsonizace

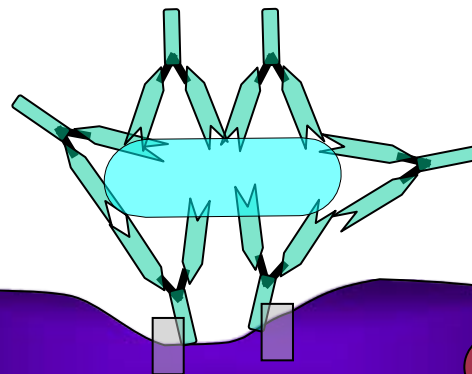


Extracelulární bakterie

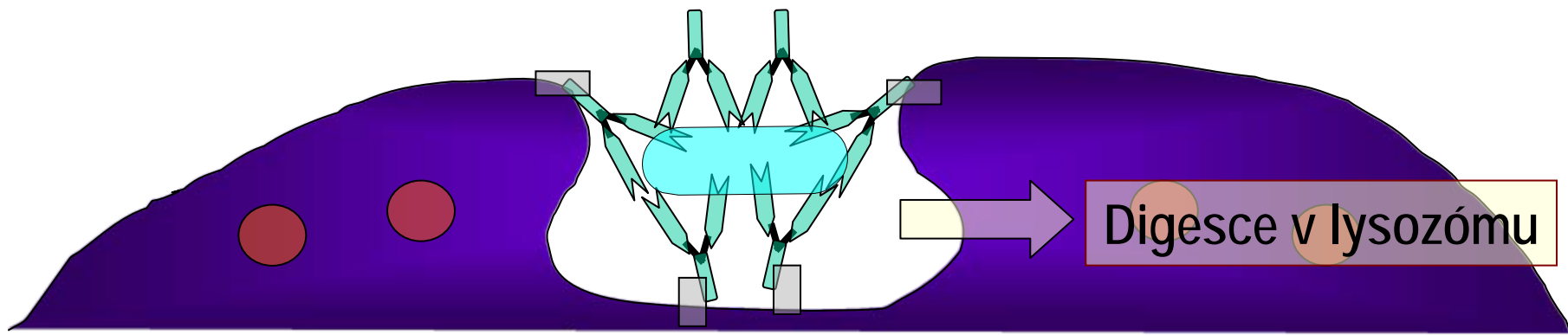


fagocyt

Opsonizace (Ab, C)

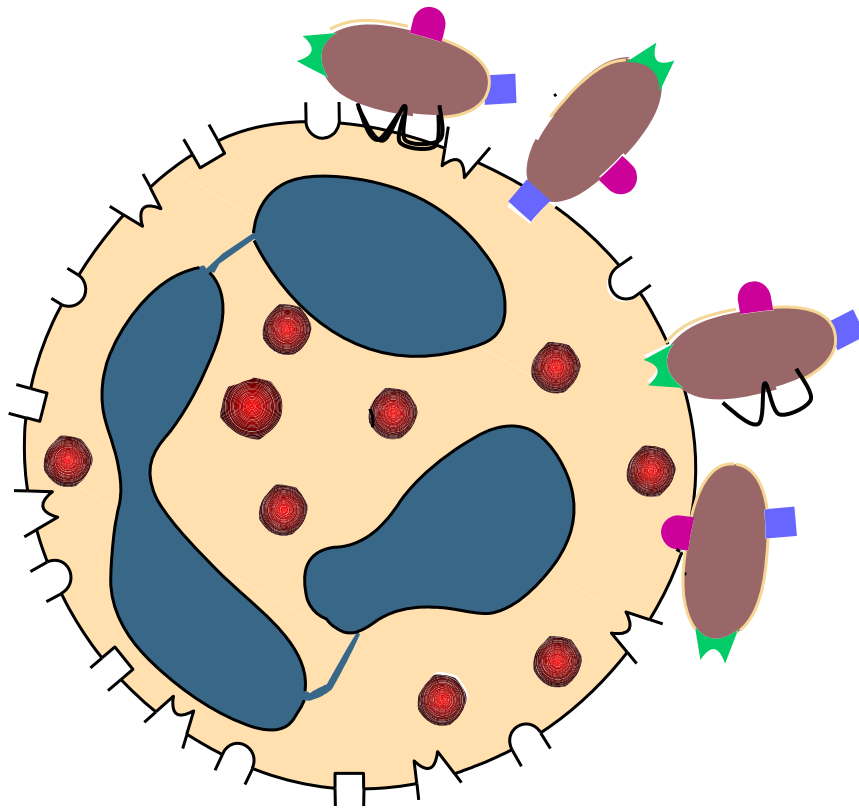


Ingesce fagocytem (Fc receptory, CR)



Digesce v lysozómu

Iniciace fagocytózy



Adheze cestou

U ScavengerR

□ IgG FcR

W CR

V Toll-like R

Zabíječské mechanismy fagocytů

Class of mechanism	Specific products
Acidification	pH= \sim 3.5–4.0, bacteriostatic or bactericidal
Toxic oxygen-derived products	Superoxide O_2^- , hydrogen peroxide H_2O_2 , singlet oxygen $^1O_2^*$, hydroxyl radical OH^* , hypohalite OCl^-
Toxic nitrogen oxides	Nitric oxide NO
Antimicrobial peptides	Defensins and cationic proteins
Enzymes	Lysozyme—dissolves cell walls of some Gram-positive bacteria. Acid hydrolases—further digest bacteria
Competitors	Lactoferrin (binds Fe) and vitamin B ₁₂ -binding protein

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

Charakteristika granulí neutrofilů

primární granula

azurofilní; charakteristické pro mladé neutrofilly

Obsahují: neutrální proteasy
- **cathepsin G, elastasa, proteinasa 3**

lysozym, defensiny, proteázy, fosfolipasů A2 a **myeloperoxidasu**

sekundární granula

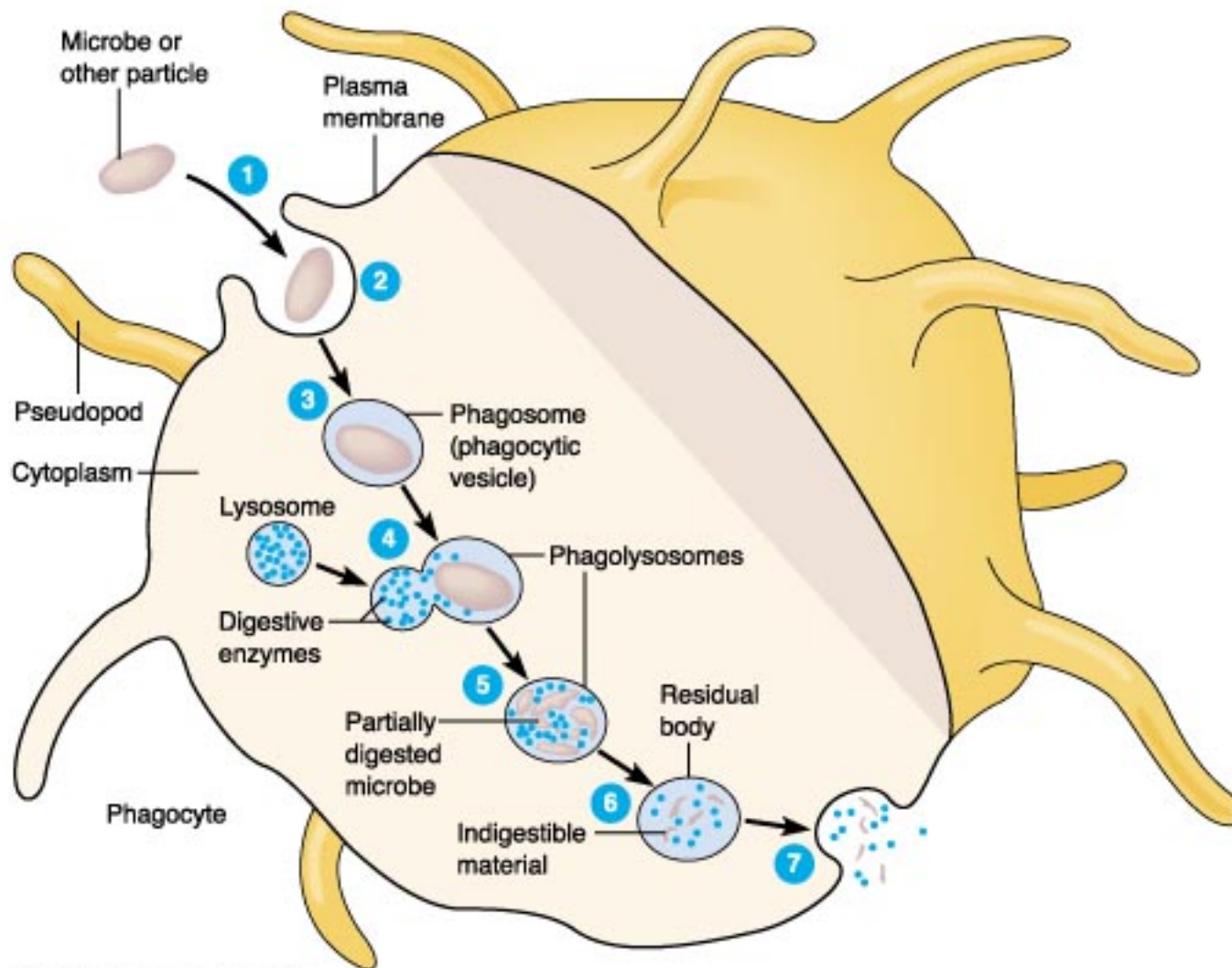
specifické pro zralé neutrofilly

obsahují lysozym, NADPH oxidasa, **laktoferrin, elastasa, kolagenasa**

Terciární granula – na předním konci migrujících fagocytů –
gelatinasa (destrukce membrán)

Lysozomy – obsahují kyselé hydrolasy

Sekreční váčky – reservoir membránových komponent



- 1** Chemotaxis and adherence of microbe to phagocyte.
- 2** Ingestion of microbe by phagocyte.
- 3** Formation of a phagosome.
- 4** Fusion of the phagosome with a lysosome to form a phagolysosome.
- 5** Digestion of ingested microbe by enzymes.
- 6** Formation of residual body containing indigestible material.
- 7** Discharge of waste materials.

(a) Phases of phagocytosis

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Annu. Rev. Immunol. 2005. 23:197–223
doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
Copyright © 2005 by Annual Reviews. All rights reserved

HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES

Anthony W. Segal

*Center for Molecular Medicine, University College London, London WC1E 6JJ,
United Kingdom; email: t.segal@ucl.ac.uk*

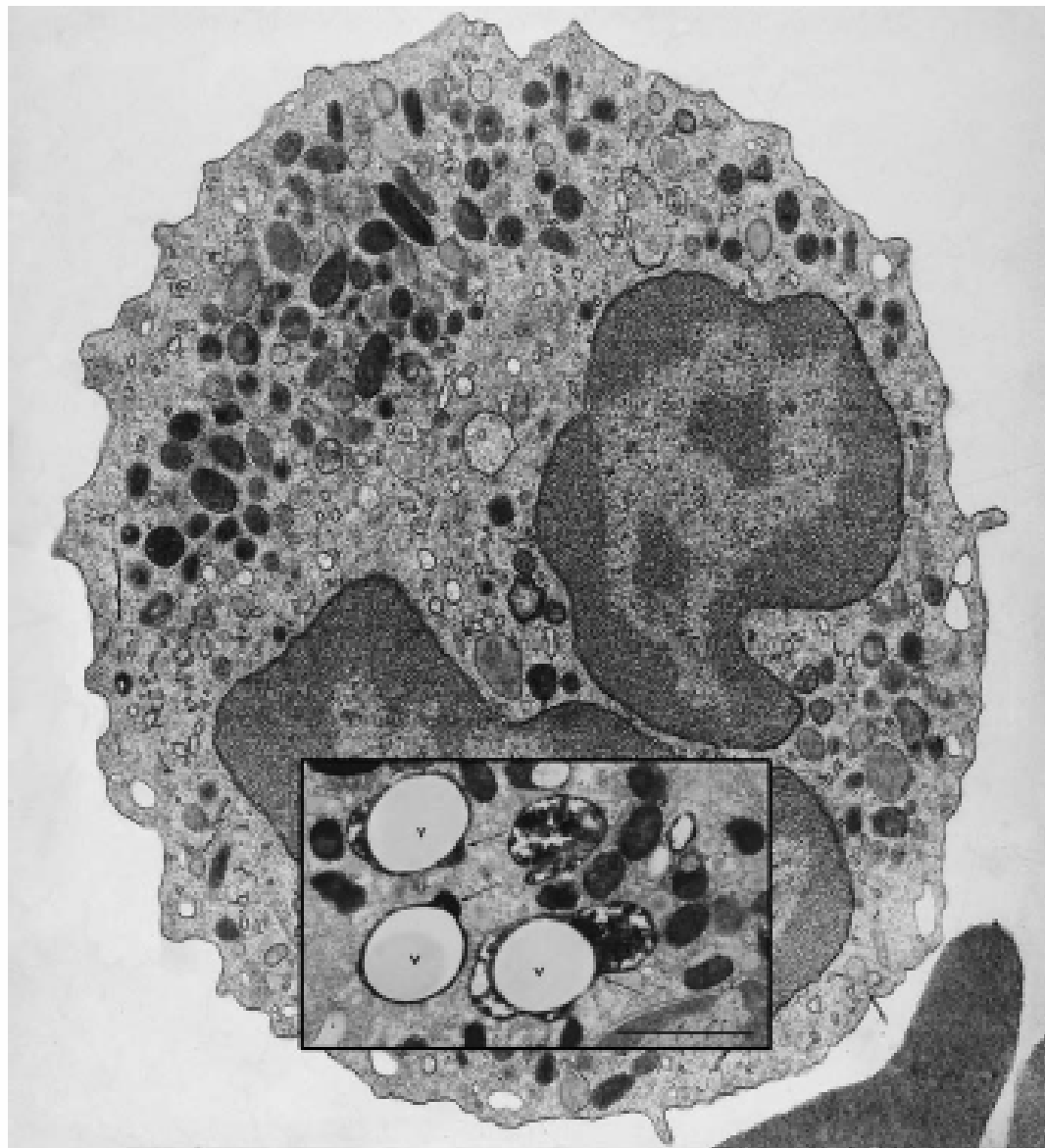
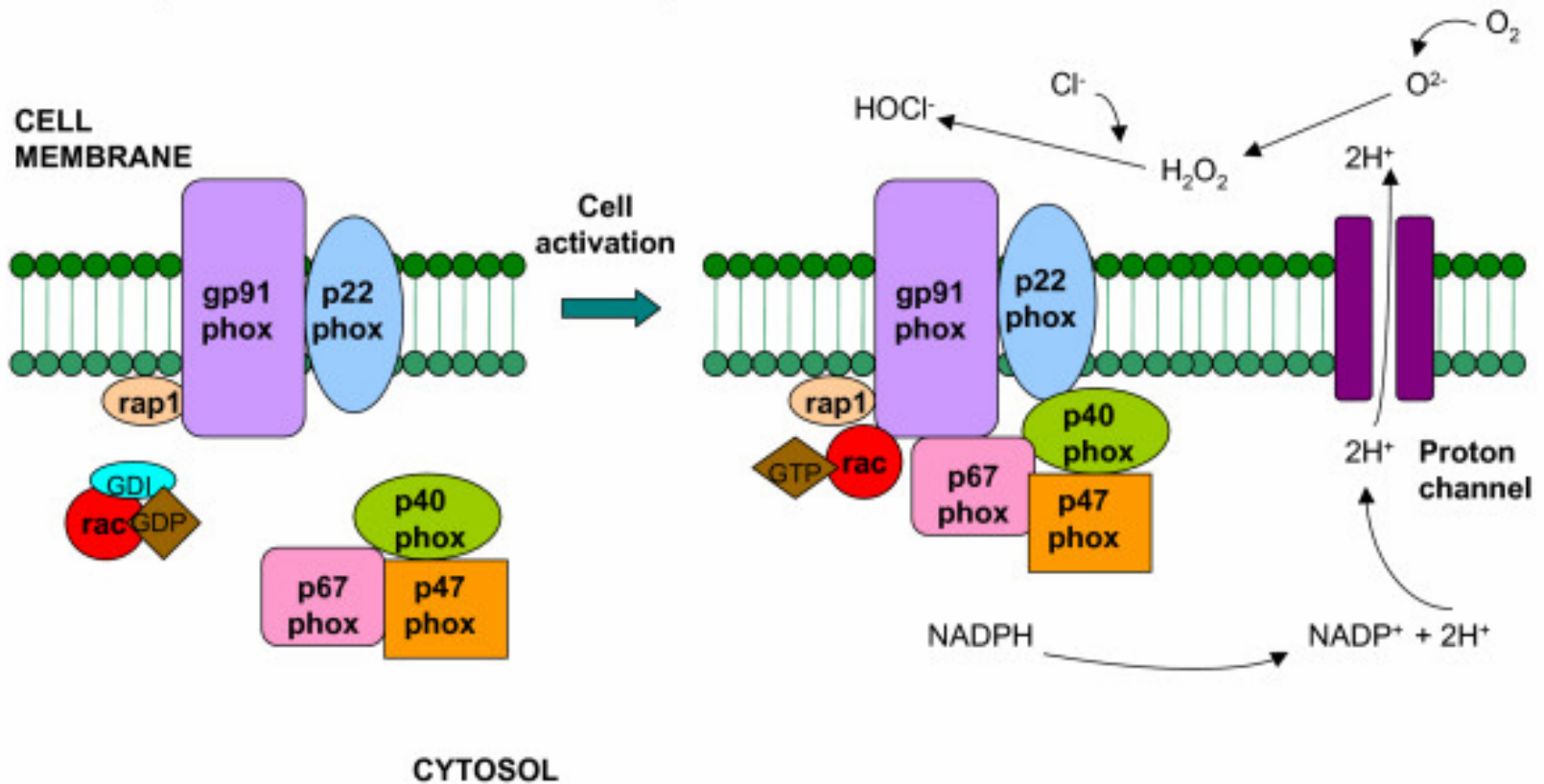
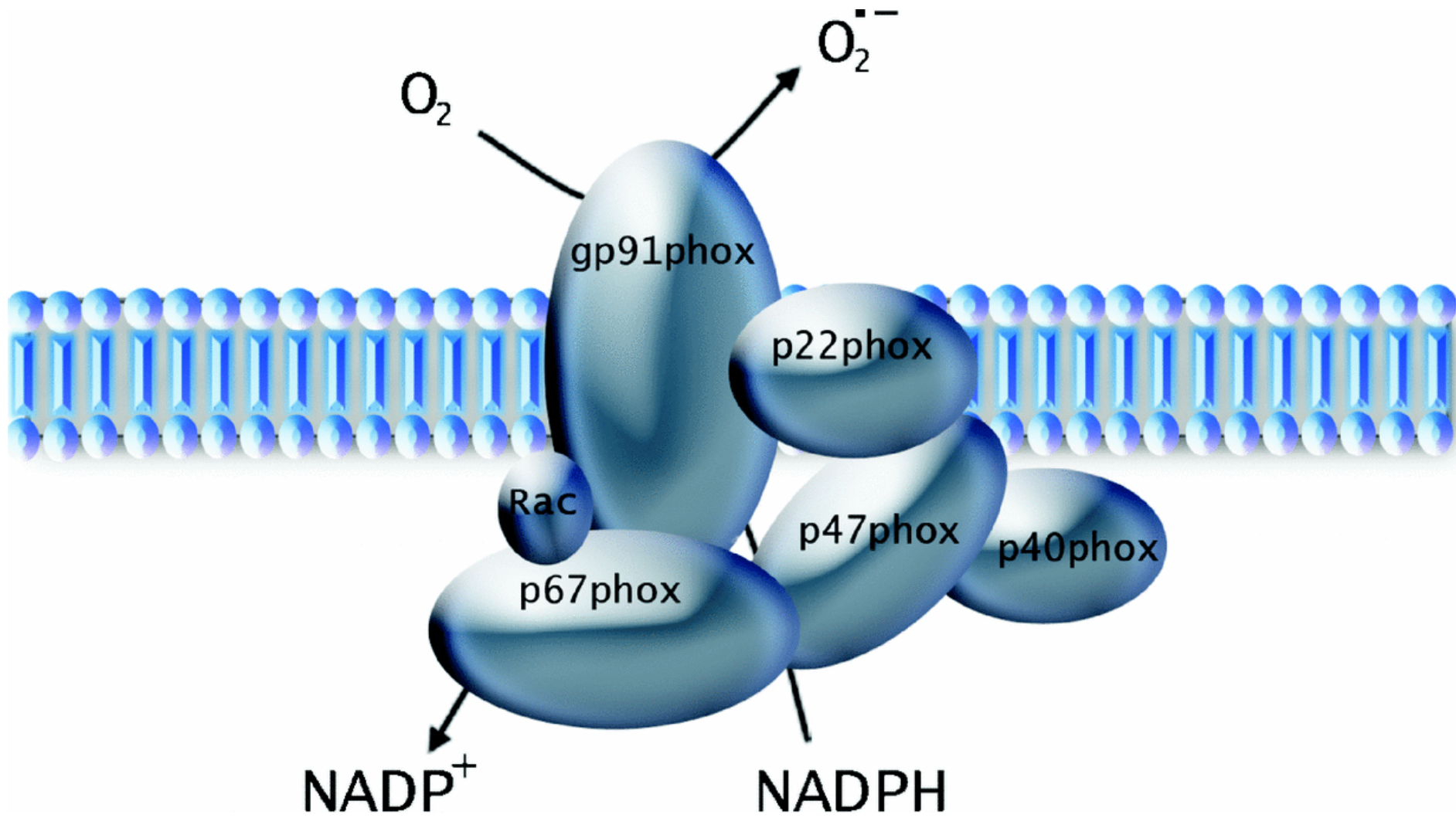


Figure 1 Transmission electron micrograph of a human neutrophil. Inset is an image taken from a neutrophil 20 s after the phagocytosis of latex particles opsonized with IgG (V, vacuole). The section was stained for myeloperoxidase (MPO) to reveal the electron-dense product in the azurophil granules, some of which can be seen degranulating into the phagocytic vacuole (arrows). Bar = 1 μ m. (Figure from 17.)

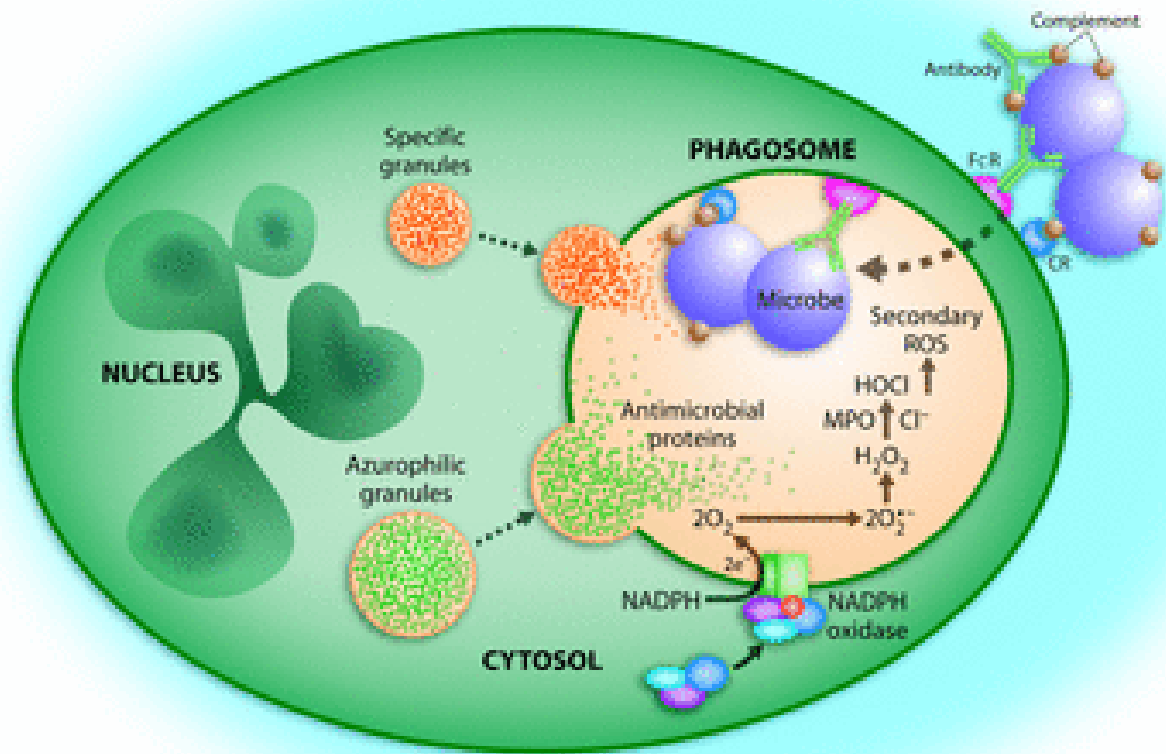
NADPH OXIDASE ACTIVATION

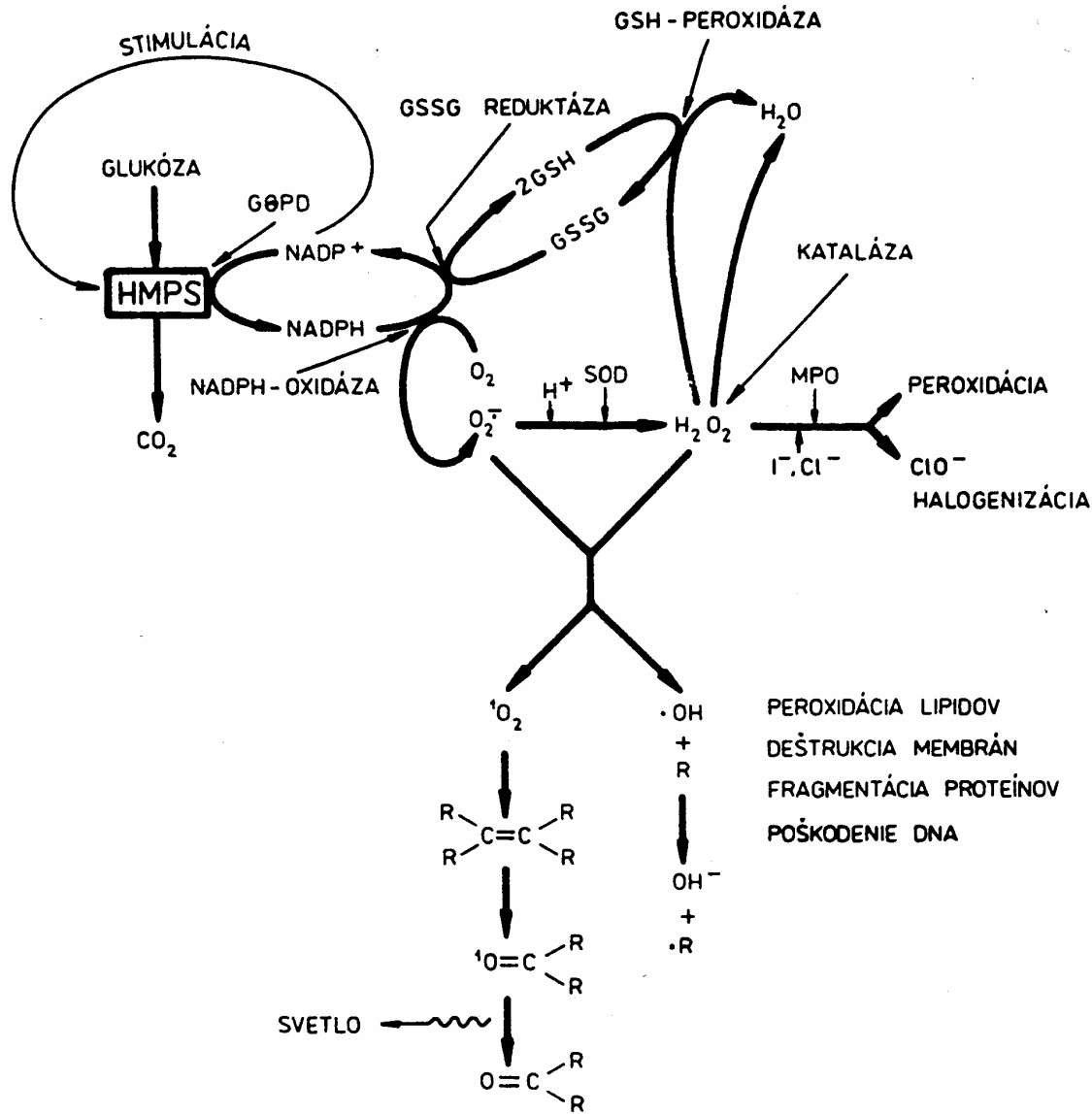


Schematic representation of the NADPH oxidase enzyme. The integral membrane of the phagocyte consists of two subunits: p22phox and gp91phox which respectively produce the smaller and larger chain of the cytochrome-b558. Two cytosolic subunits: p67phox and p47phox; a p40phox accessory protein and a Rac-GTP binding protein then translocate to the cell membrane upon cell activation to form the NADPH oxidase complex which generates a respiratory burst. Superoxide can react to form hydrogen peroxide and hypochlorous acid, which together participate in bacterial killing.



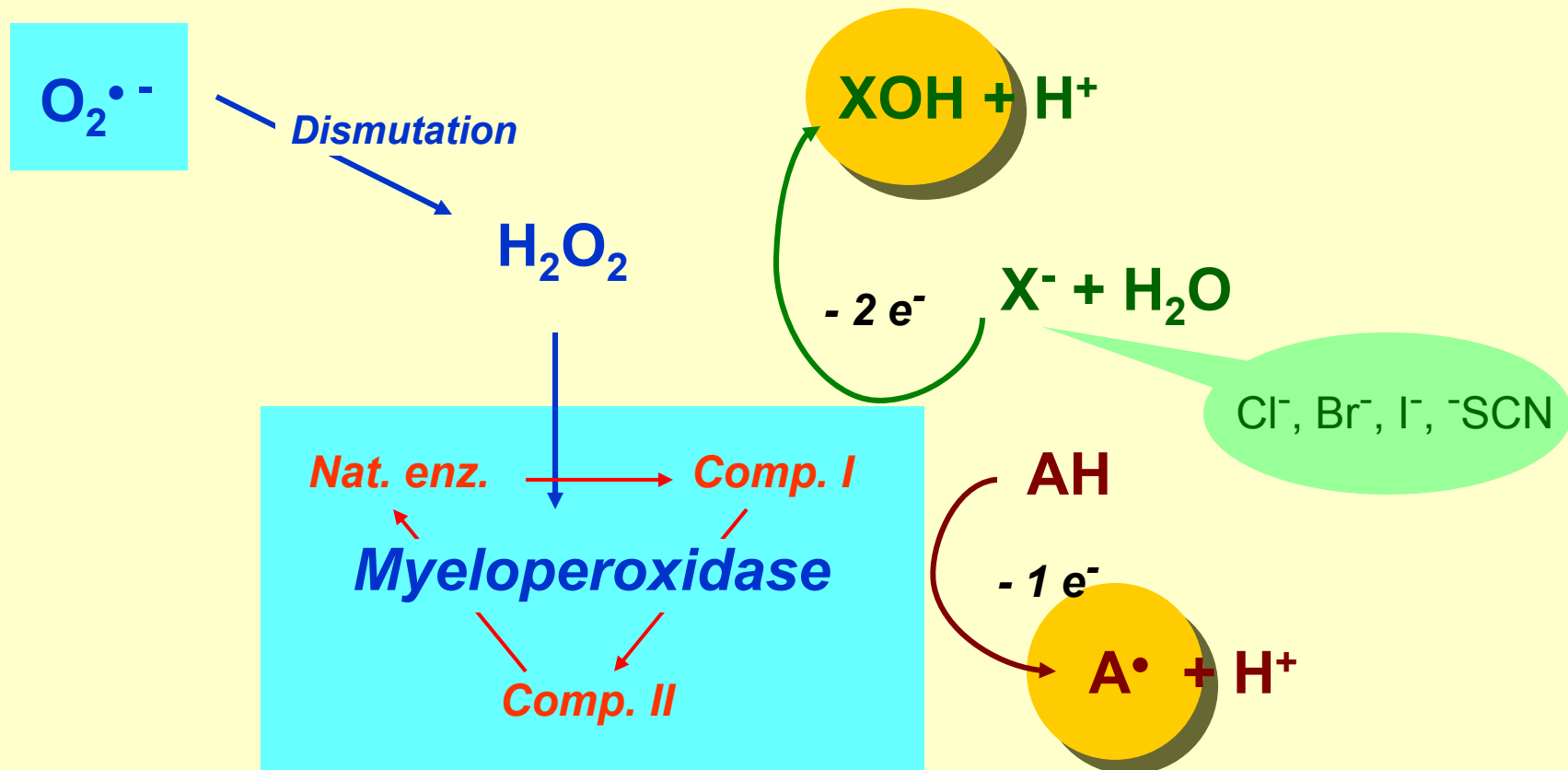
The classical NADPH oxidase comprises a membrane-bound gp91^{phox}/p22^{phox} heterodimer and other subunits (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} and Rac) which associate with this complex in the activated enzyme. The NADPH-binding domain is predicted to be on one side of the membrane, whereas O₂⁻ generation is predicted to occur on the other. The oxidase may be located on the plasma membrane or on intracellular membranes depending upon the cell type.





Obr. 155. Schéma respiračného vzplanutia fagocytov a tvorby toxických foriem kyslíka
HMPS -- hexózonofosfátový skrat, **G6PD** -- glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, **GSSG** a **GSH** -- redukovaná a oxidovaná forma glutationu, **NADPH** a **NADP⁺** -- redukovaná a oxidovaná forma nikotinamidadeninukleotid-fosfátu, **SOD** -- superoxid-dismutáza, **MPO** -- myeloperoxidáza, **O₂⁻** -- superoxidový aniónový radikál, **·OH** -- hydroxylový radikál, **¹O₂** -- singletový kyslík

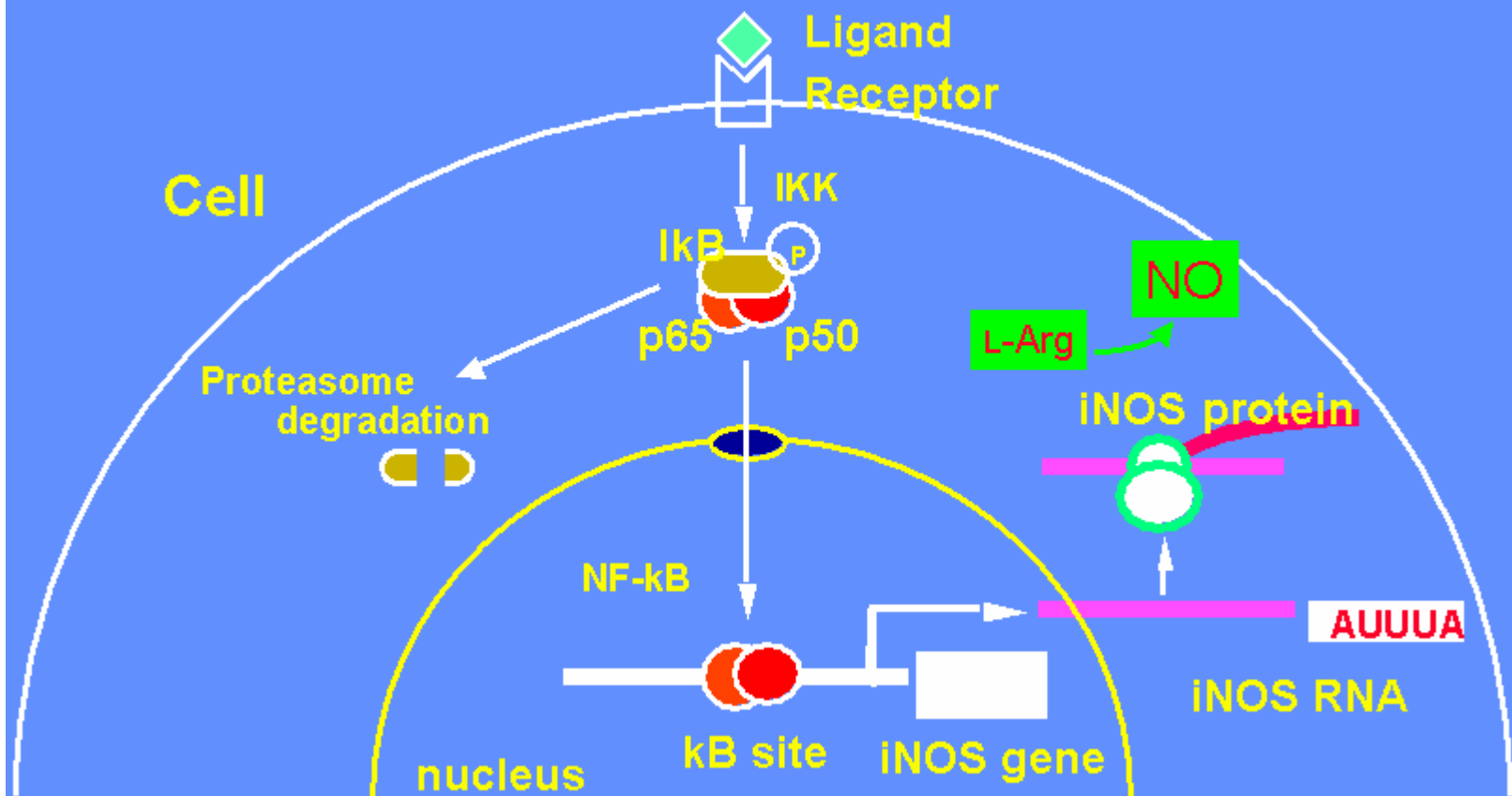
Oxidative activity



Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Reaktivní formy kyslíku			
Superoxid	$O_2 \cdot^-$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxylový radikál	$HO\cdot$	Kyselina chlorná	$HOCl$
Alkoxylový radikál	$RO\cdot$	Ozon	O_3
Peroxylový radikál	$ROO\cdot$	Singletový kyslík	1O_2
Reaktivní formy dusíku			
Oxid dusnatý	$NO\cdot$	Peroxynitrit	$ONOO^-$
Oxid dusičitý	$NO_2\cdot$	Dusitany	NO_2^-
		Dusičnany	NO_3^-
		Nitrosyl	NO^+

Regulation of iNOS Expression



Správná funkce fagocytů je pro organismus nezbytná

Deficience ve funkcích fagocytů = těžký průběh banálních infekcí.

Příklad: CGD – defektní NADPH oxidáza

Naopak hyperaktivace fagocytů – problémy:

poškození okolních buněk a tkání reaktivními metabolity a proteolytickými enzymy

Metody stanovení reaktivních metabolitů kyslíku fagocyty

Kolorimetrické metody

Stanovení spotřeby kyslíku

Elektronová paramagnetická rezonance

Luminometrické metody

Fluorescenční metody

Kolorimetrické metody

NBT test - princip metody spočívá v redukci žluté tetrazoliové soli (NBT) superoxidem na modrý produkt formazan.

Redukce cytochromu c – superoxidový anion redukuje bezbarvý oxidovaný (ferri-) cytochrom c na barevnou formu.

Stanovení spotřeby kyslíku

Metoda založená na detekci změny koncentrace kyslíku v médiu pomocí Clarkovy elektrody.

Je používána především k detekci intenzity respiračního vzplanutí.

Elektronová paramagnetická rezonance

Radikál reaguje s příslušnou próbou (tzv. spin-trapping).

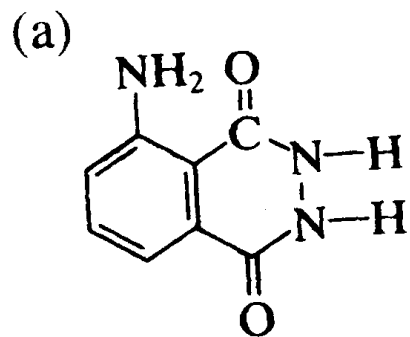
Následně jsou pomocí speciálního přístroje analyzována paramagnetická spektra.

Luminometrické metody

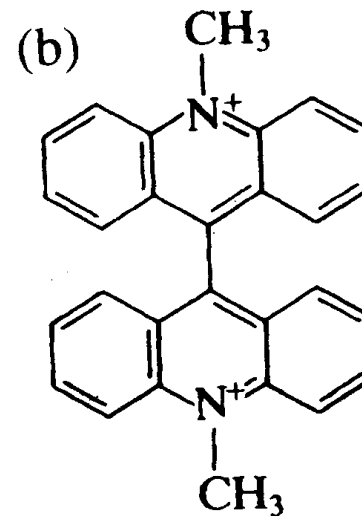
Luminometrické próby (luminofory) jsou oxidovány RMK
Při návratu do základního energetického stavu emitují fotony.
Jejich detekce je možná pomocí luminometrů nebo scintilačních
spektrofotometrů.

Nejčastěji používané luminofory:

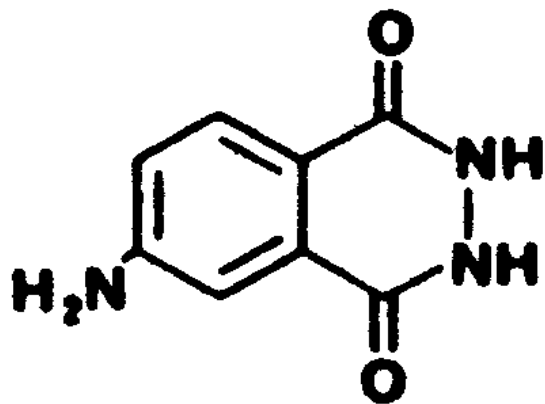
- Luminol
- Lucigenin
- Izoluminol
- Pholasin



luminol



lucigenin

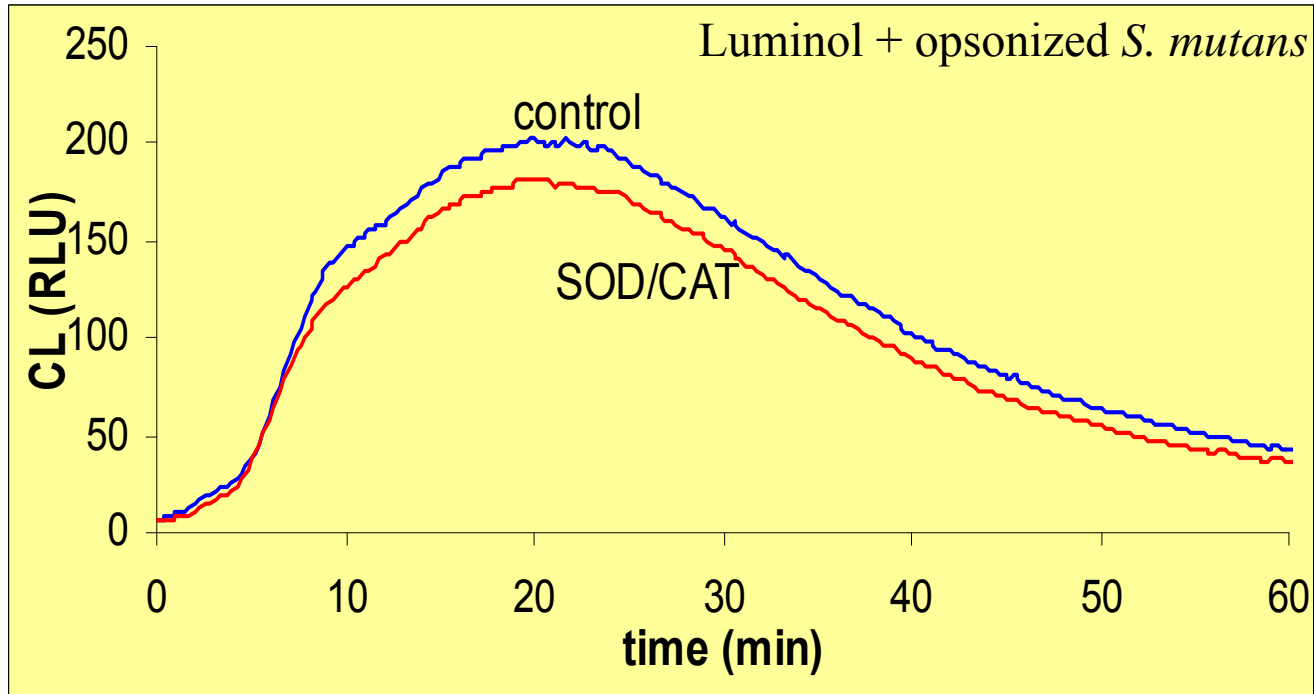
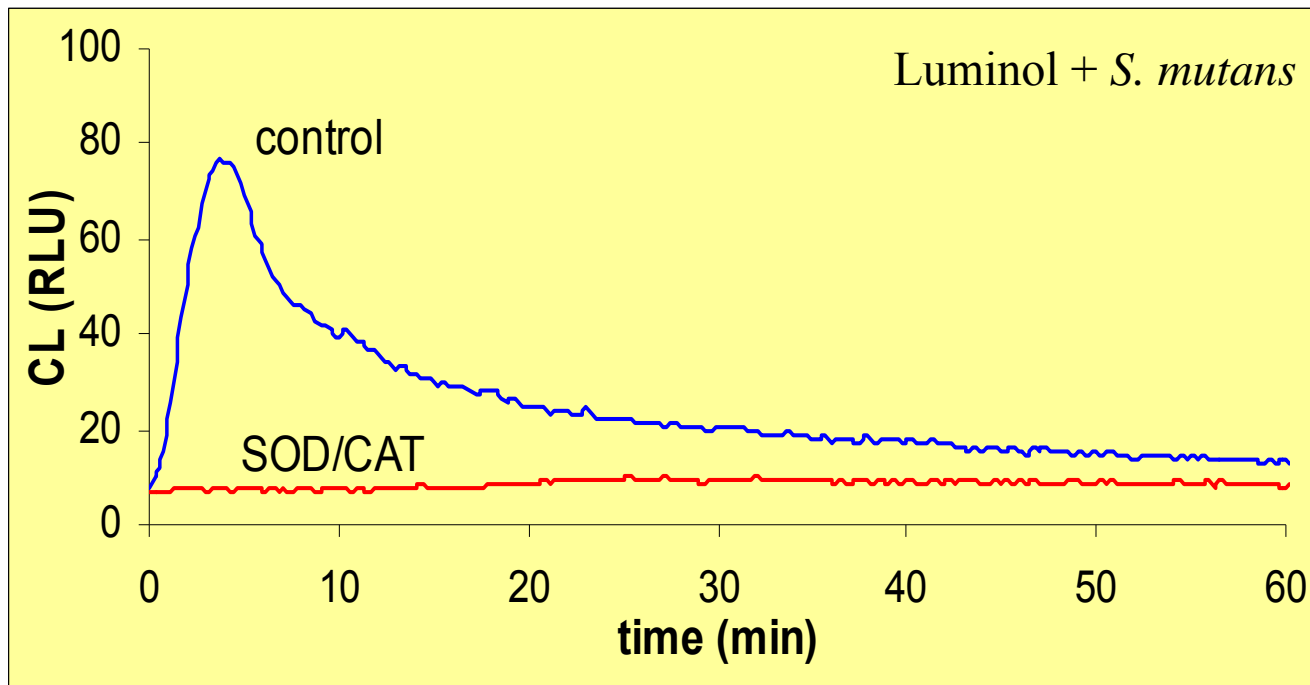


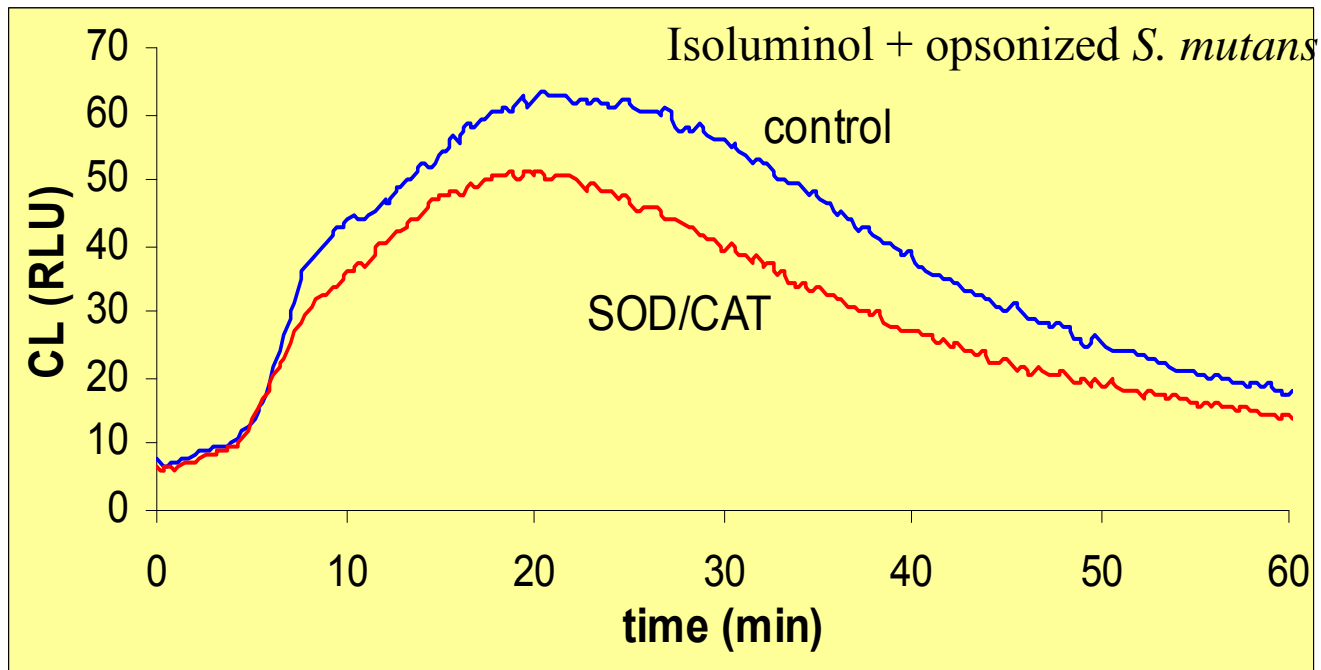
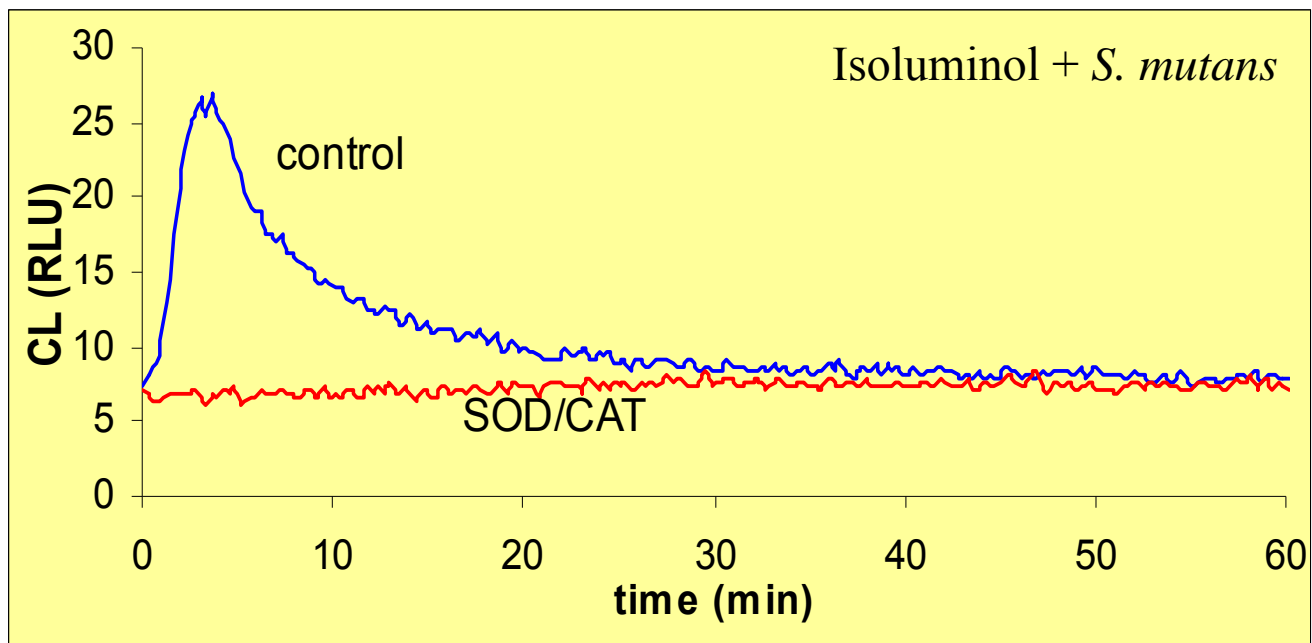
Izoluminol

PHOLASIN

**Photoprotein of the bioluminescent mollusc
Emits light in the presence of free radicals, oxidants
and oxidases**

Pholasin is isolated and purified by:
Knight Scientific Limited (UK)





Fluorescenční metody

Princip

Reakcí s RMK se původně nefluorescenční látky (tzv. fluorescenční próby) mění na látky fluorescenční. Tuto fluorescenci je možné detekovat pomocí:

- fluorimetru
- fluorescenčního mikroskopu
- konfokálního mikroskopu
- **flow cytometru**

Výhody detekce pomocí flow cytometru

- analýza velkého počtu buněk v krátkém čase (1000 buněk/sec)
- možnost současného hodnocení více buněčných populací v jednom vzorku
- hodnocení funkčních vlastností živých i fixovaných buněk

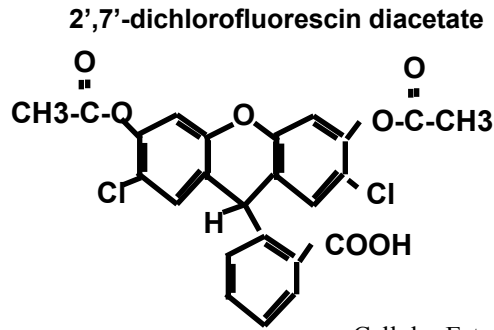
Příkladem **fluorescenčních prób** jsou:

dichlorofluorescein diacetate, dihydrorhodamin 123 nebo hydroethidin

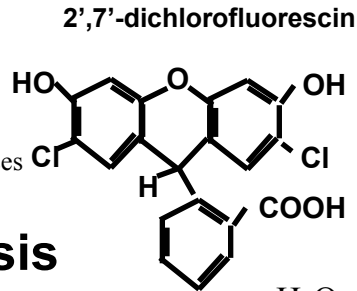
Fluorescent Indicators

How the assays work:

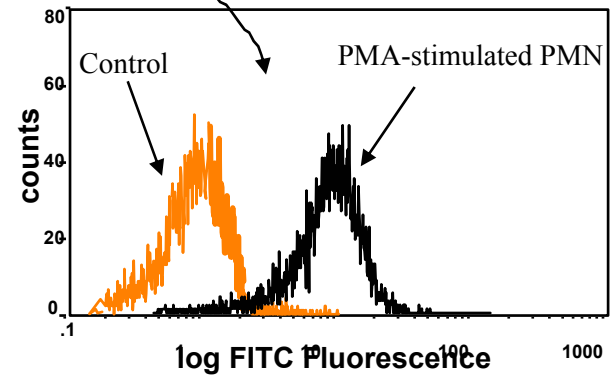
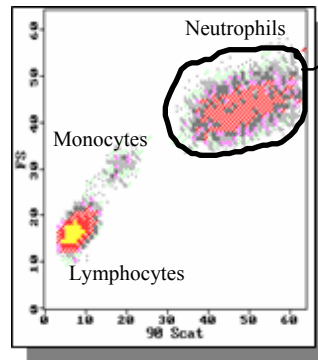
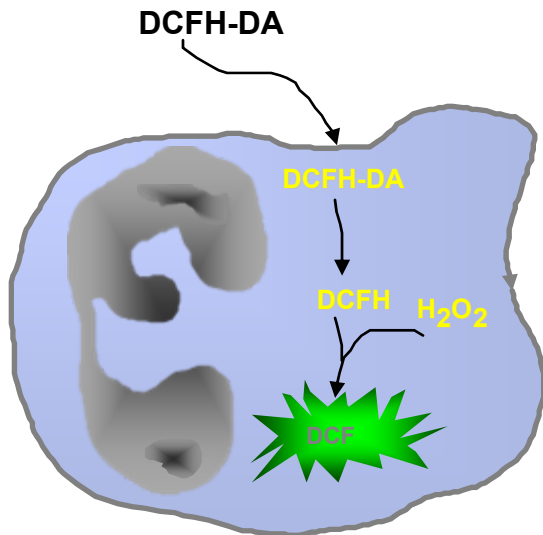
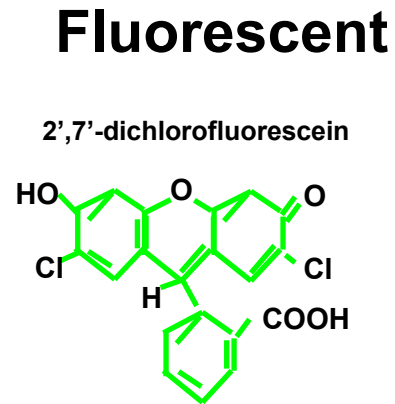
- **Superoxide:** Utilizes hydroethidine the sodium borohydride reduced derivative of EB
- **Hydrogen Peroxide:** DCFH-DA is freely permeable and enters the cell where cellular esterases hydrolyze the acetate moieties making a polar structure which remain in the cell. Oxidants (H_2O_2) oxidize the DCFH to fluorescent DCF
- **Nitric Oxide:** DCFH-DA can also be used as an indicator for nitric oxide in a manner similar to H_2O_2



Cellular Esterases
 \longrightarrow
Hydrolysis



H_2O_2
 \longrightarrow
Oxidation



Detekce NO

- cell-permeabilní fluorescenční indikátory (4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA)
- celková koncentrace nitrátů/nitritů
- aplikace NO donorů compounds, NO scavengerů, a guanylyl cyklázy
- NOS aktivita v buněčných homogenátech měřením enzymatické konverze argininu na citrulin během tvorby NO
- inhibitory NOS (L-NAME)
- aplikace protilátek k isoformám NOS (imunocytochemie, imunoblotting)
- exprese genu pro iNOS

Duo•18

Now records data directly from NOMKII, EVOMX, ISO2, pH electrodes and Ion Selective Electrodes!



ISO-NO Nitric Oxide Meter

(cable not included)



Micromanipulator M3301

NO Chamber

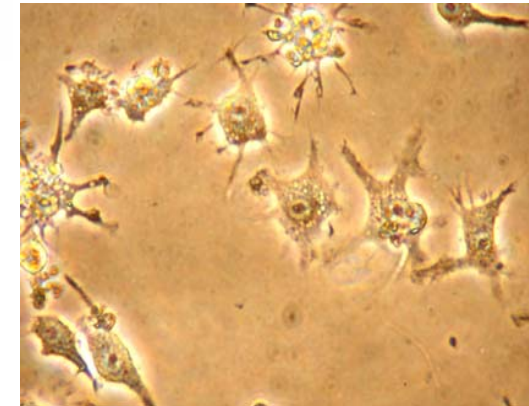
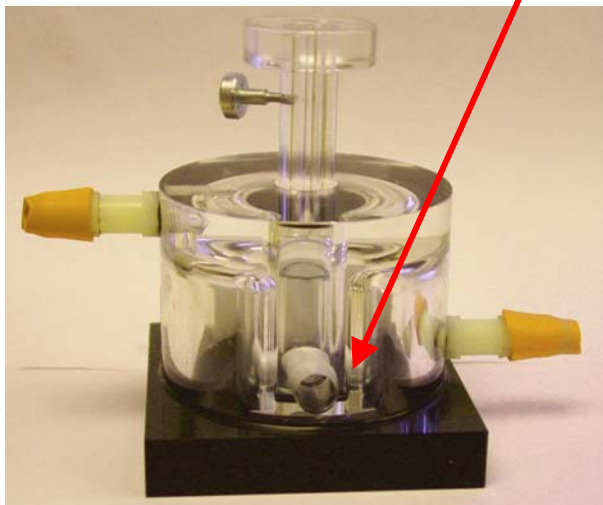
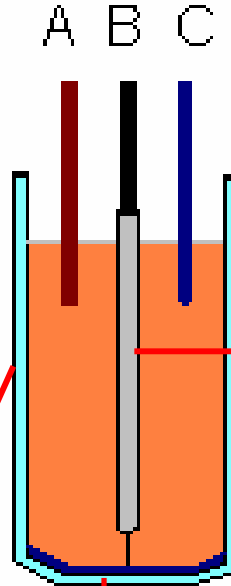
Magnetic Holding Device M10

Steel Base

Schéma experimentu:

1. RAW 264.7 vysadíme na kultivačnú miskú a kultivujeme v DMEM médiu v inkubátore pri 5% CO₂ a 37°C.
2. Počet buniek stanovujeme pomocou Coulter Countru (Coulter®, Coulter Electronics LTD, England)
3. Bunky o koncentrácii 1x10⁶/800 µl inkubujeme 60 min. v 800µl MEM média.
4. Následne do skúmaviek s adherovanými bunkami aplikujeme lipopolysacharid (LPS) – 5ng/ml.
5. Mikroskúmavku umiestnime do meracej komorky a snažíme sa umiestniť elektródu na dno, tesne až k povrchu buniek.
6. Zapojíme elektródu a spustíme meranie.
7. Po ukončení pokusu a odpojení elektródy odpipetujeme médium.
8. V médiu následne pomocou Griessovej metódy spektrofotometricky stanovujeme koncentráciu nitritov (NO₂-), ktoré sú jedným z koncových metabolitov NO.

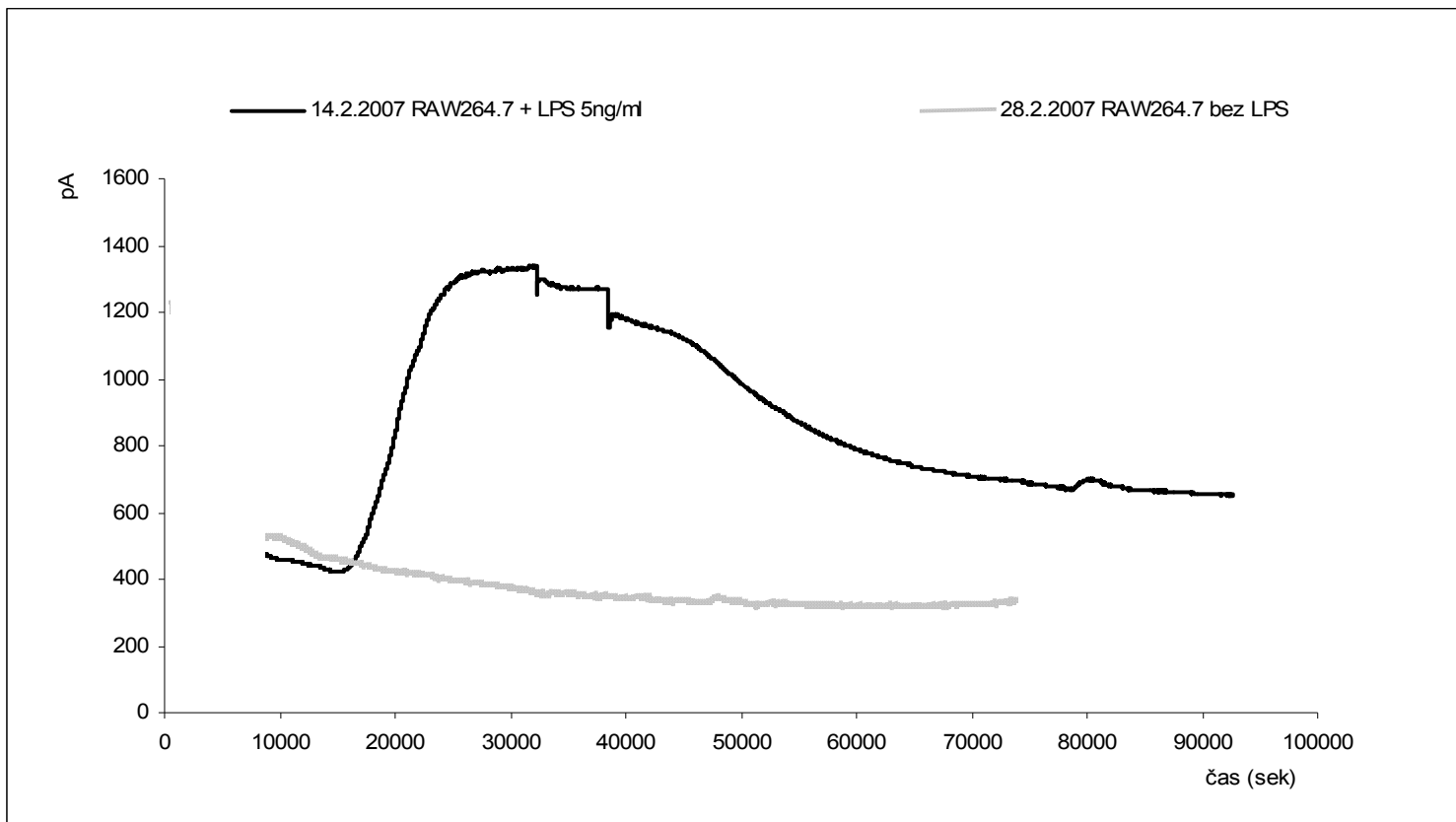
A - referenčná elektróda B - pracovná elektróda C – pomocná elektróda



RAW 264.7 (1x10⁶)

DMEM + 10% FBS (5% CO₂, 37°C).

MEM (NaHCO₃, stále pH)



Detekce NO

- permeabilní fluorescenční indikátory (4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA))

