

Vyšetření funkce fagocytů

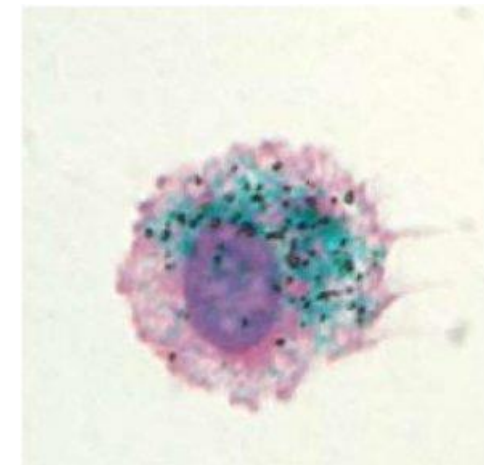
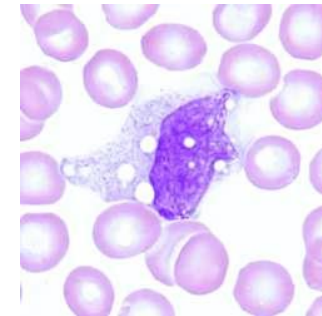
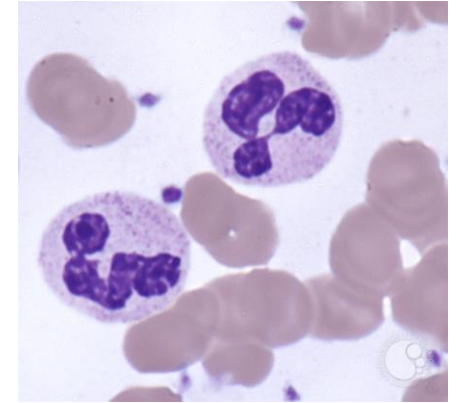
Mgr. Julie Štíhová

Bioanalytik jarní semestr 2021

Výkonné buňky nespecifické imunity

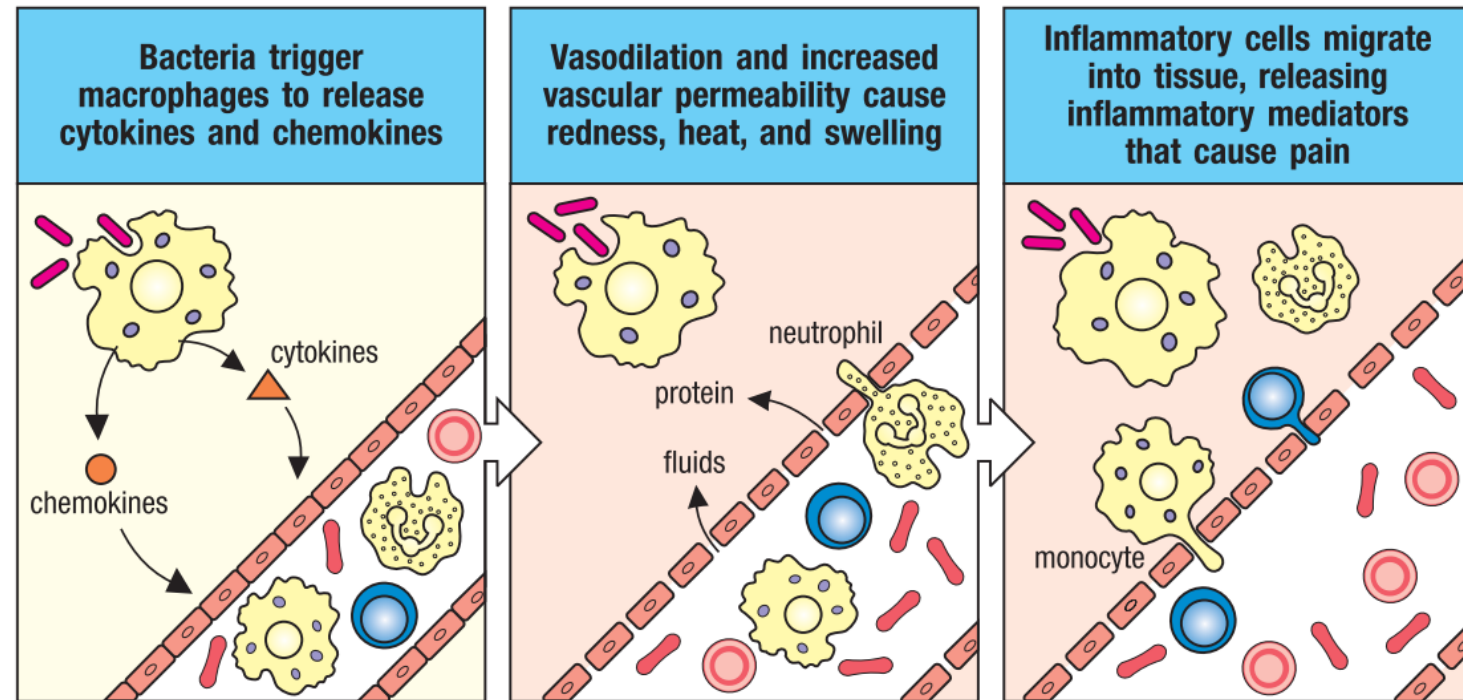
Profesionální fagocyty

- ▶ Neutrofilní granulocyty
 - ▶ Tvoří 50 – 70 % z WBC
 - ▶ Nízká fagocytární aktivita – „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

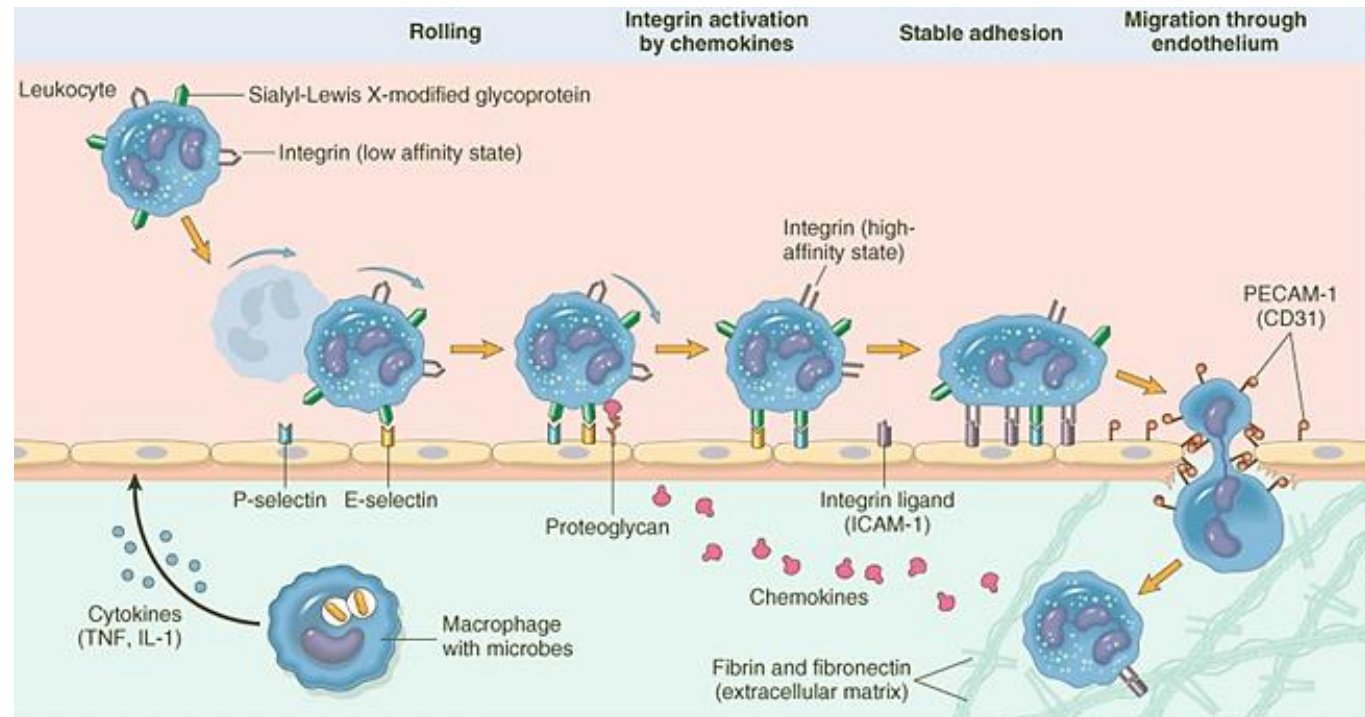
- ▶ Poranění tkání → aktivace makrofágů
- ▶ Produkce prozánětlivých cytokinů a chemokinů
- ▶ Rozvoj zánětu, lákání neutrofilů do místa infekce



Průnik do místa infekce

1. ADHEZE

- ▶ Endotelie – vlivem prozánětlivých cytokinů exprese adhezivních molekul
 - ▶ E a P selektiny - reverzibilní vazba – rolling



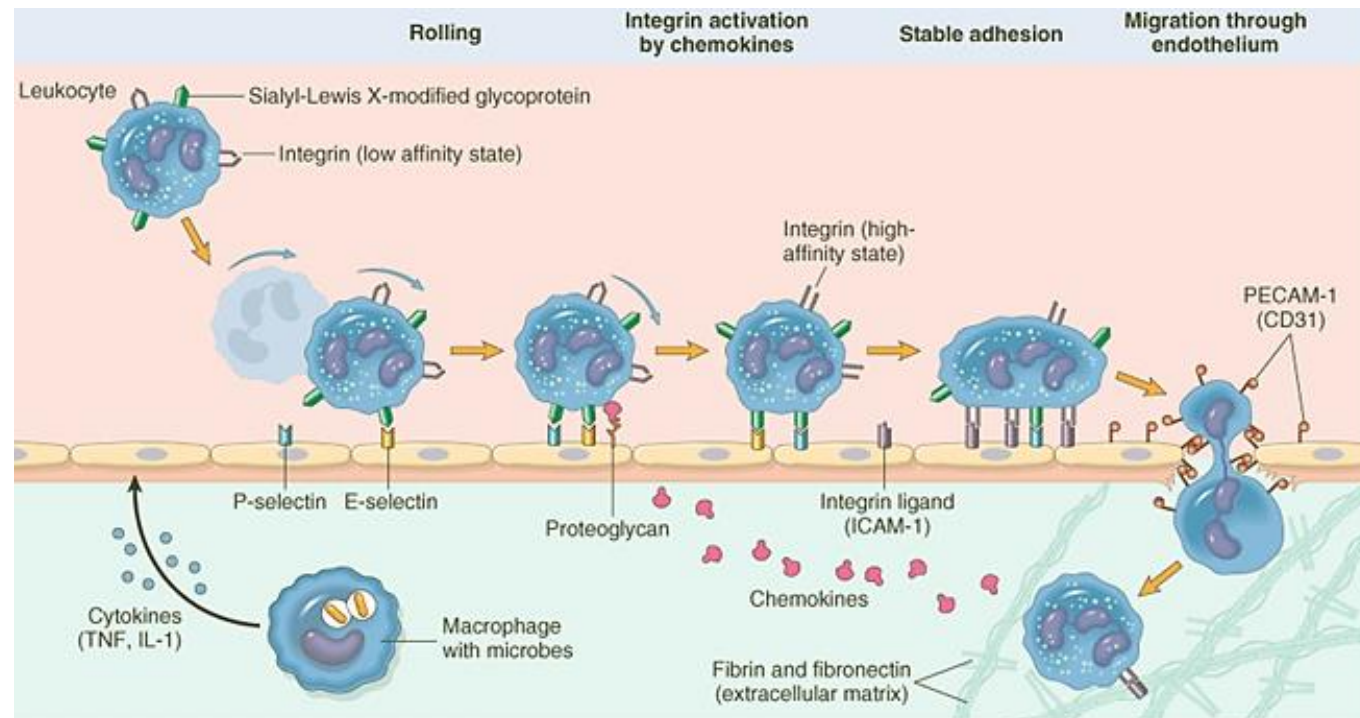
Průnik do místa infekce

2. Extravazace

- ▶ Pokud při rollingu přetrvává zánětlivý signál, následuje ireverzibilní vazba na endoteliální stěnu – LFA na povrchu neutrofilu se váží na endoteliální integriny – VCAM, ICAM → ireverzibilní vazba na endotel

3. Diapedéza

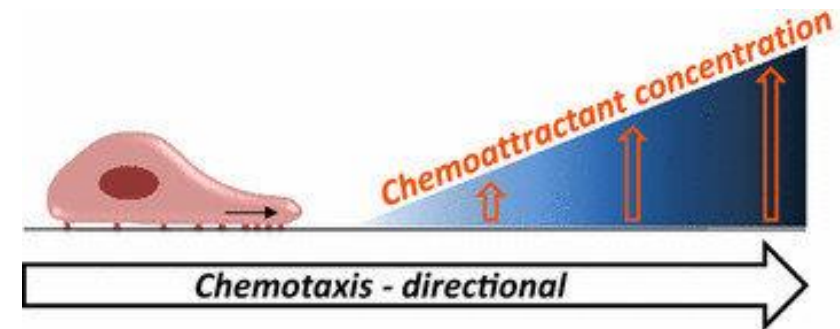
- ▶ Prostup skrze endotelie
- ▶ PECAM, JAM, CD99
- ▶ Transcelulární
- ▶ Paracelulární



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 receptory neutrofilního granulocytu
- ▶ 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:
 - ▶ Ingesce – fagosom
 - ▶ **Digesce -splynutí fagosomu s lysozomy – konečná degradace**
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku nezávislé
 - ▶ Mechanismy zabíjení na kyslíku závislé

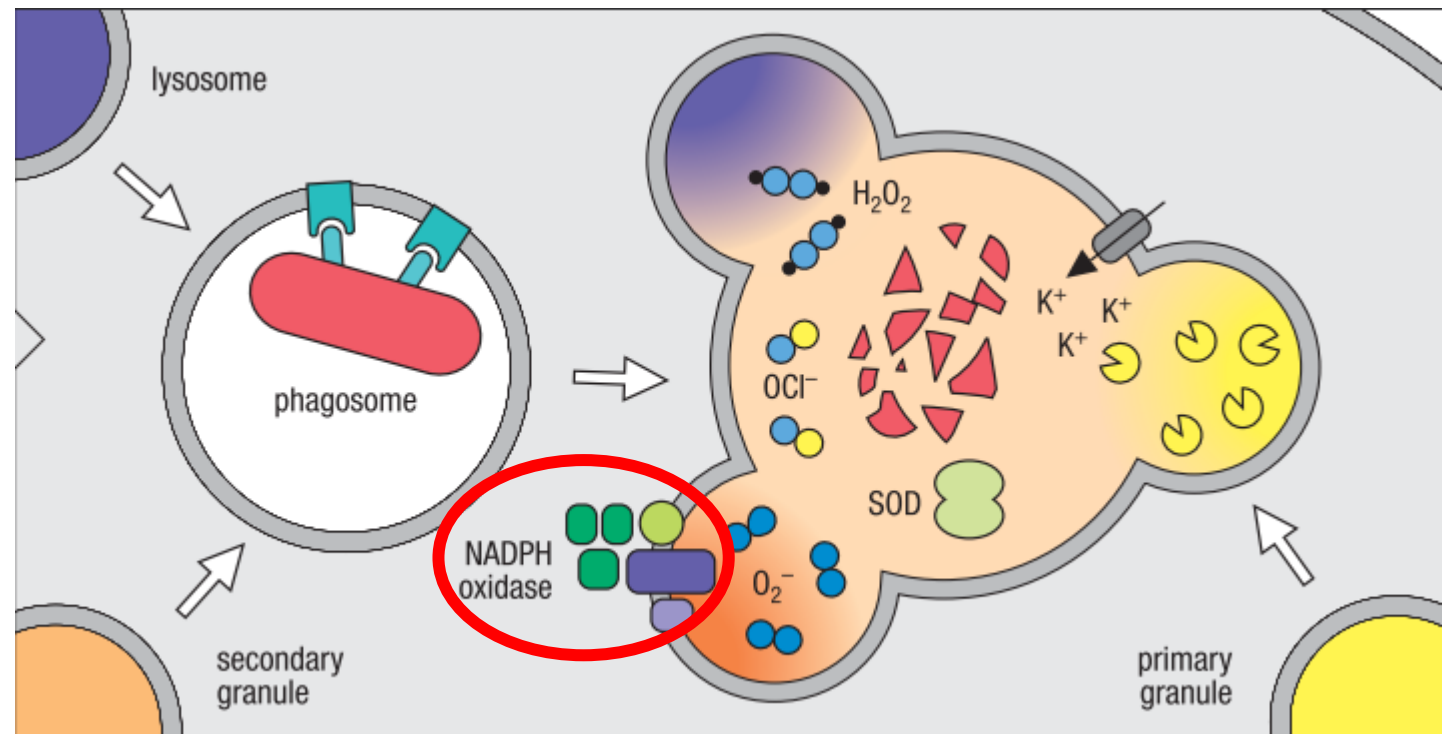


Mechanismy zabíjení na O₂ nezávislé

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

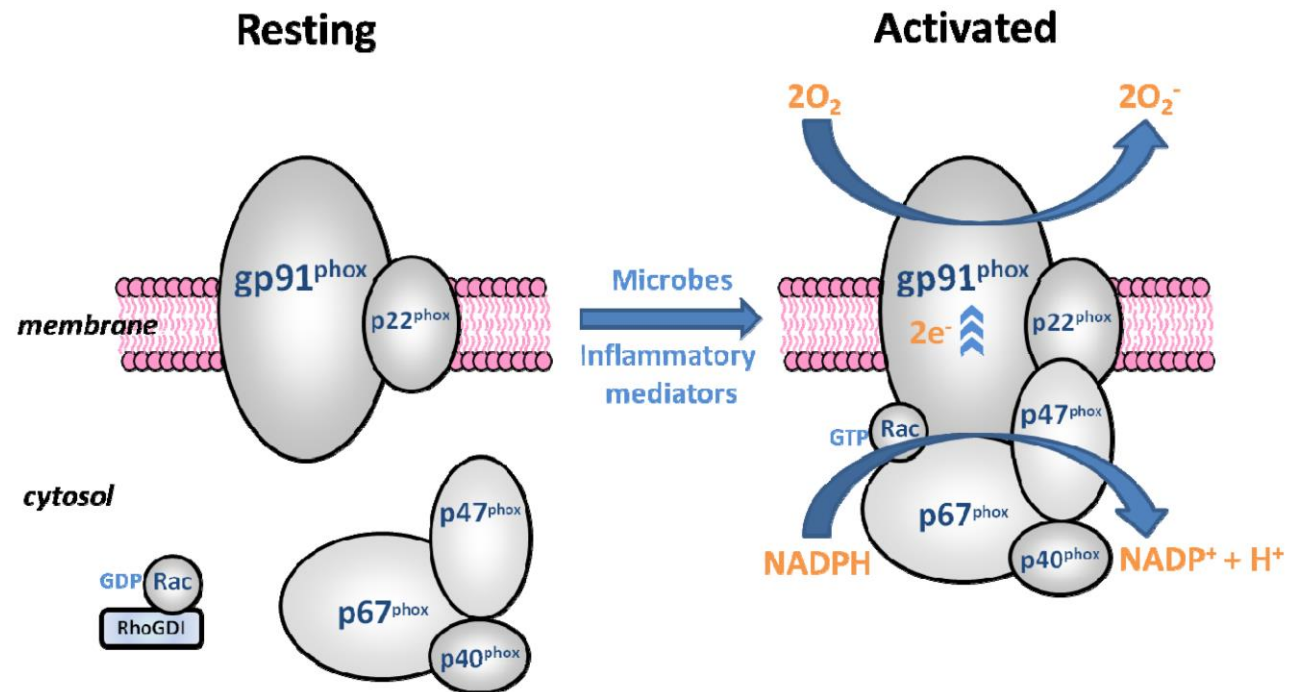
Mechanismy zabíjení na O₂ závislé

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

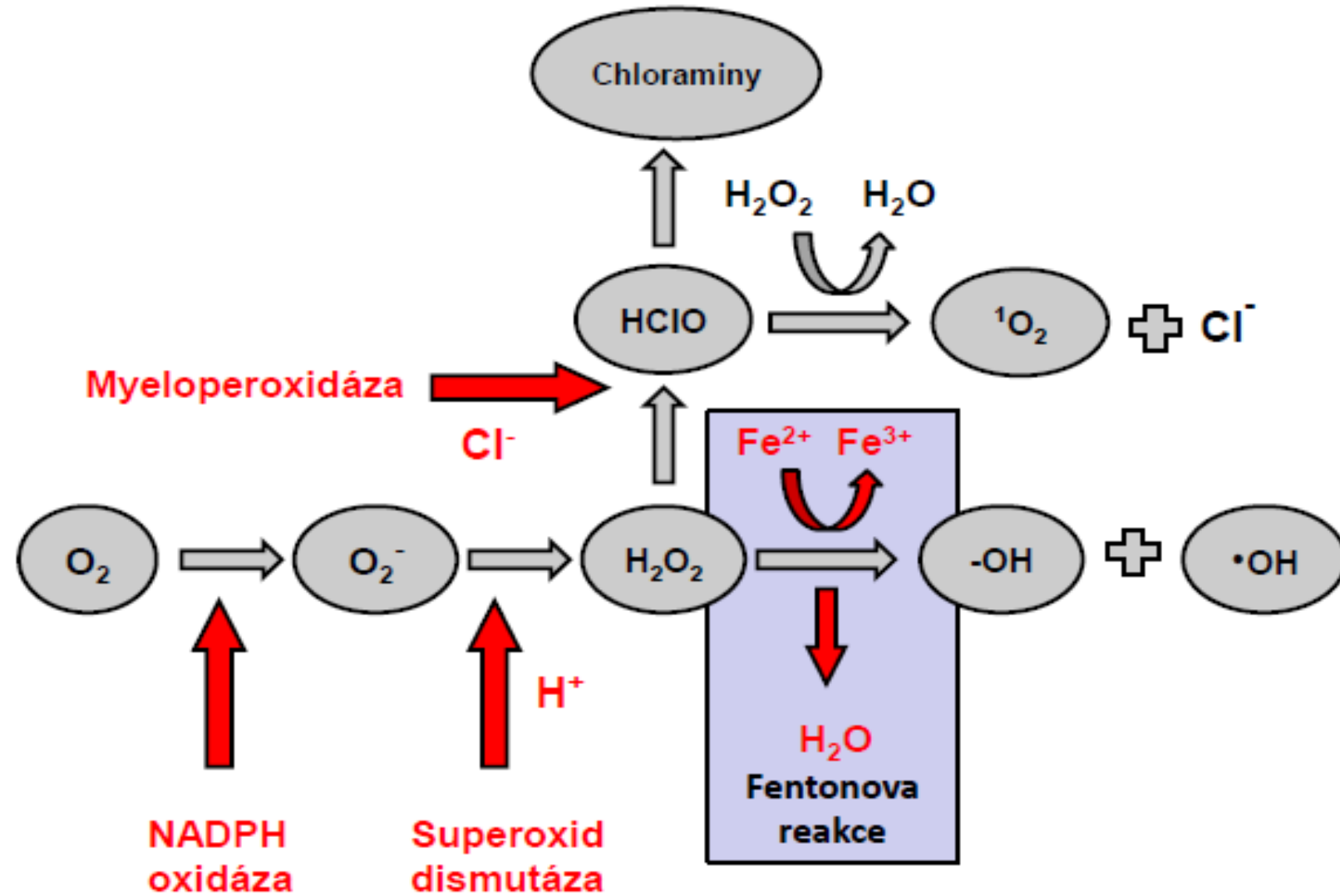


NADPH oxidáza

- ▶ Intracelulární lokalizace - membrány
- ▶ 6 podjednotek (2 v membráně fagolysosomů, 4 v cytosolu)
- ▶ Aktivace – signální kaskáda spuštěná receptory – fosforylace podjednotek

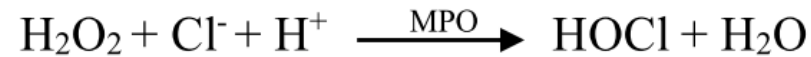


NADPH oxidáza

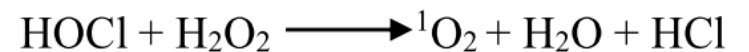


Myeloperoxidáza

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



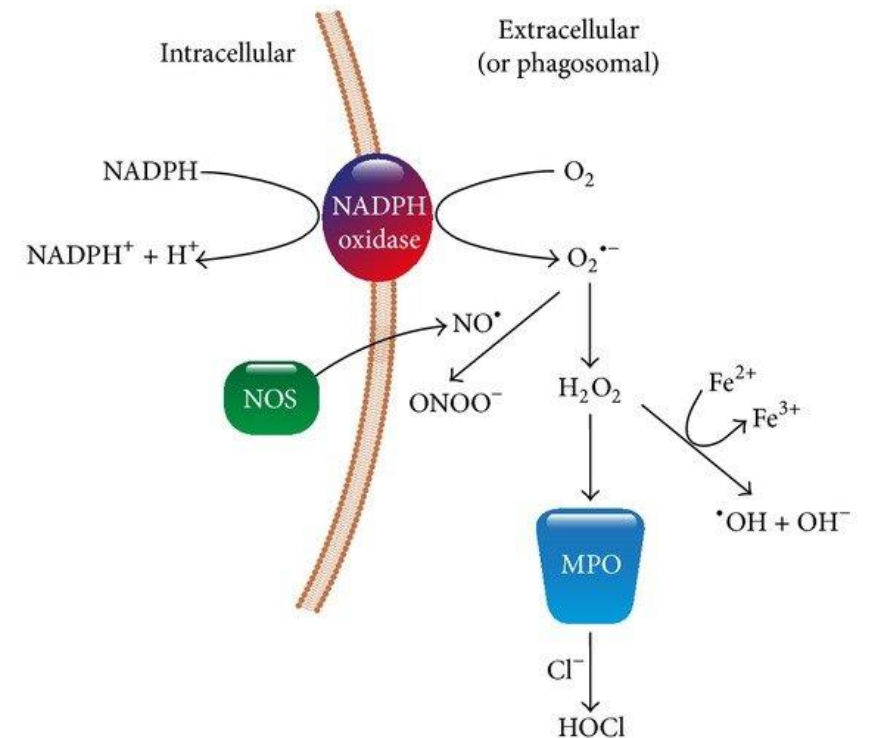
- Kyselina chlorná může být substrátem dalších reakcí, při kterých vzniká hydroxylový radikál a signletový kyslík – lipoperoxidace membrán → smrt fagocytující buňky



iNOS

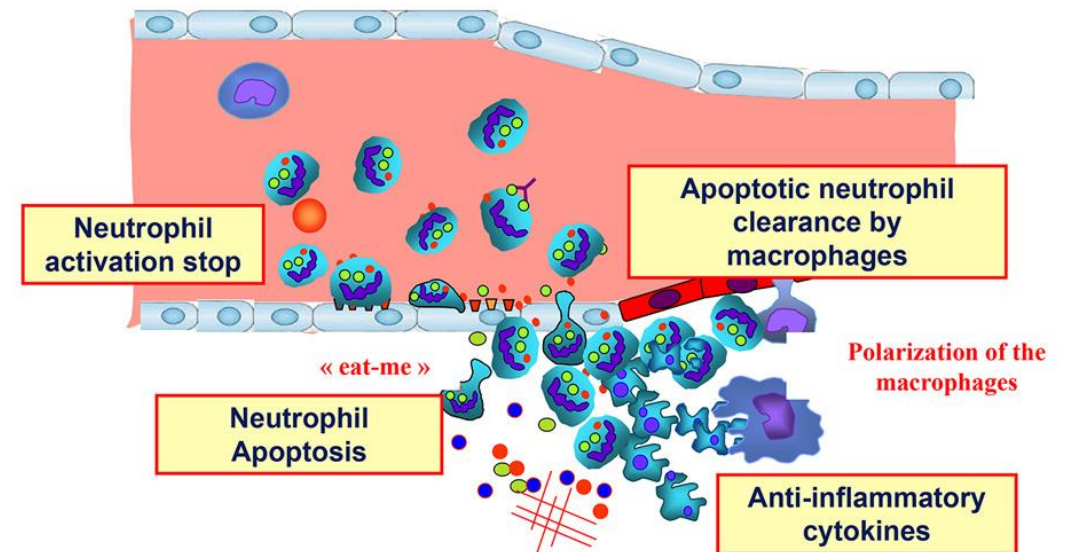
inducibilní syntáza oxidu dusnatého

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



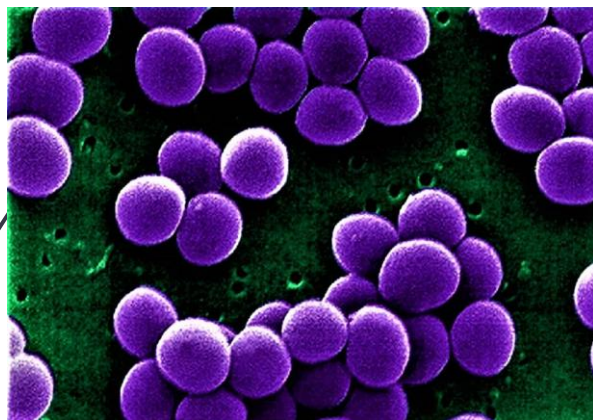
Závěrečná fáze fagocytózy

- ▶ 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)

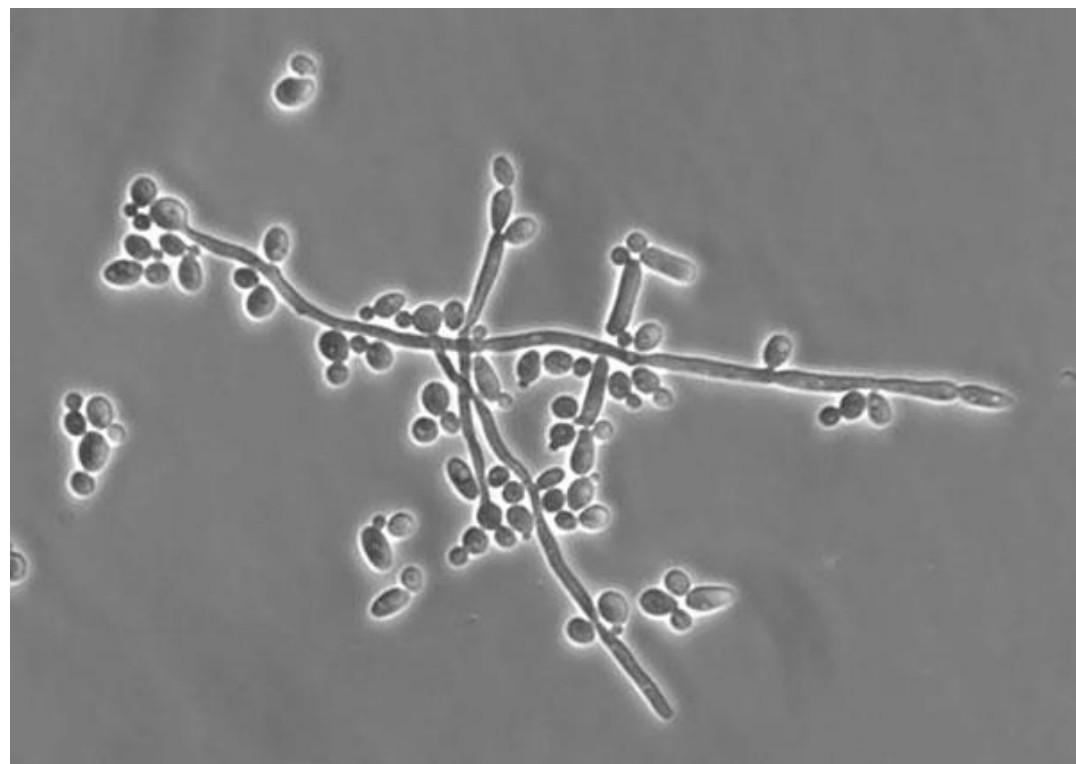


Fagocytózou to někdy nekončí

- ▶ Jak se fagocyty podílejí na eliminaci patogenů, které nemohou být díky své velikosti nebo agresivitě zfagocytovány?



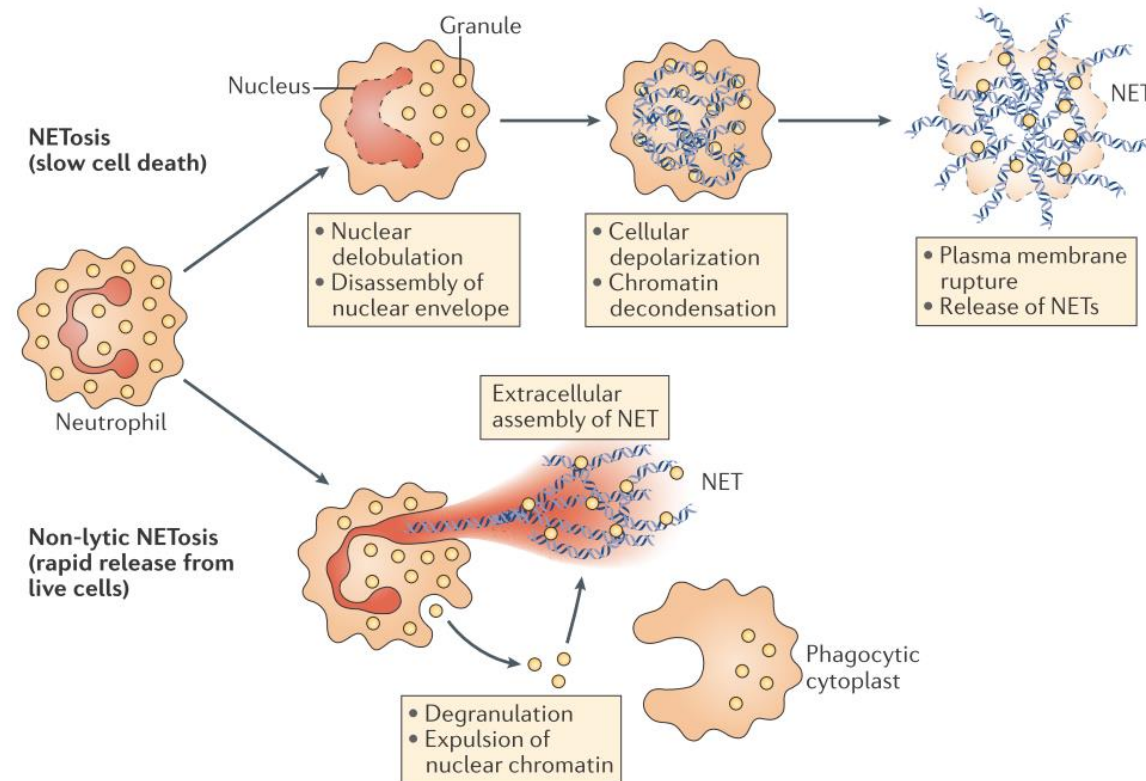
Staphylococcus aureus



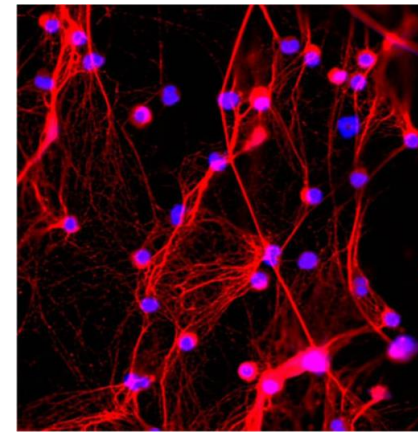
Pseudomycelia *Candida albicans*

NETóza

- Nový typ buněčné smrti
- Reaktivní kyslíkové mediátory tvořené NADPH oxidázou jsou druhými posly
- Dochází k citrulinaci histonů, 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 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
 - Podezření z účasti na imunitně podmíněné trombóze

Vyšetření fagocytózy

► Adheze

- Cytometrická detekce CD11b/CD18 – deficit – LAD syndrom

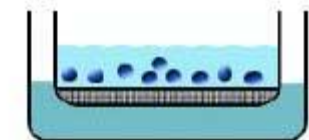
► Chemotaxe

► Boydenova komůrka

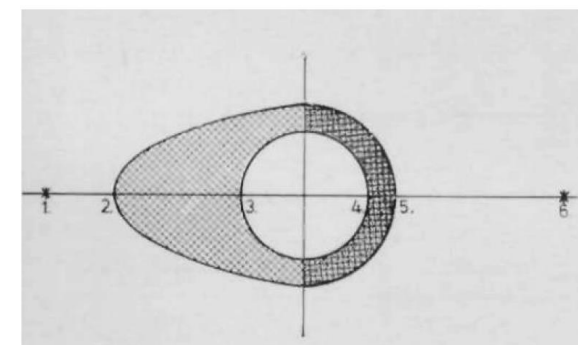
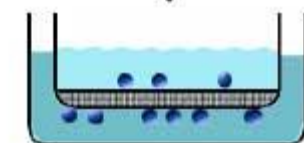
- migrace fagocytů v nádobce skrze membránu s velmi malými pózy ve směru chemotaktického gradientu
- Počítání buněk které pronikly na druhou stranu membrány

► Migrace pod agarózou

- Do agarózového gelu se vyříznou 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



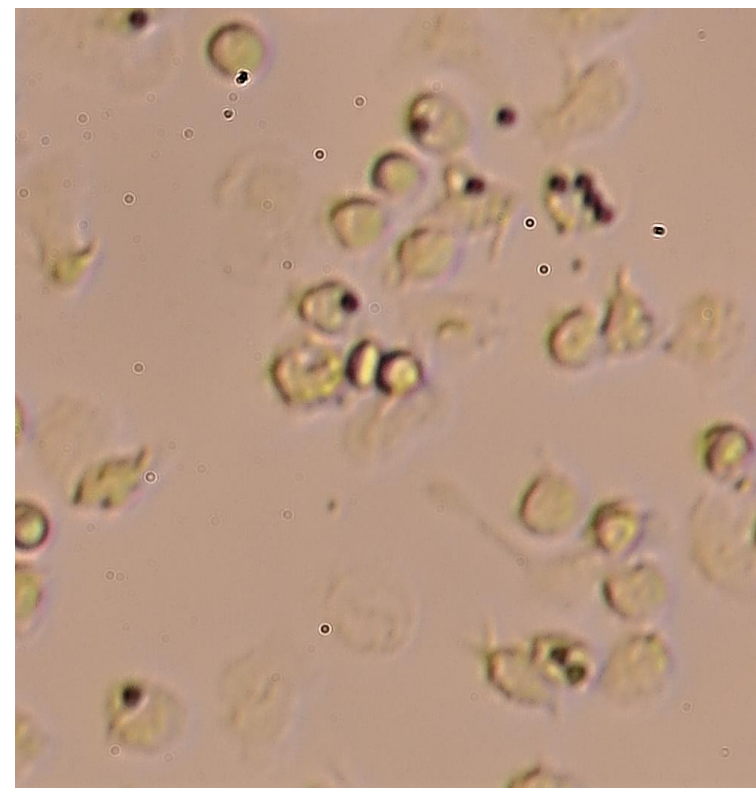
24-72 hours



Vyšetření fagocytózy

► 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 oxidačního vzplanutí

▶ INT/NBT test

- ▶ Inkubace krve s 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
- ▶ Hodnocení počtu pozitivních buněk (obsahují barevná granula)

▶ Chemiluminiscence

- ▶ Stimulace buněk (PMA, fMLP, bakterie, zymosan)
- ▶ Přídavek chemiluminiscenční látky – vlivem oxidačního vzplanutí dochází k oxidaci chemiluminiscenční sondy* → emise fotonů → přístroj luminometr → počítání záblesků
- ▶ Vzhledem k výsledku (počty záblesků) je nutno znát absolutní počet granulocytů u pacienta → výsledky se musí přepočítat na počet buněk v reakci!
- ▶ *Luminol, isoluminol

Burst test (BTT)

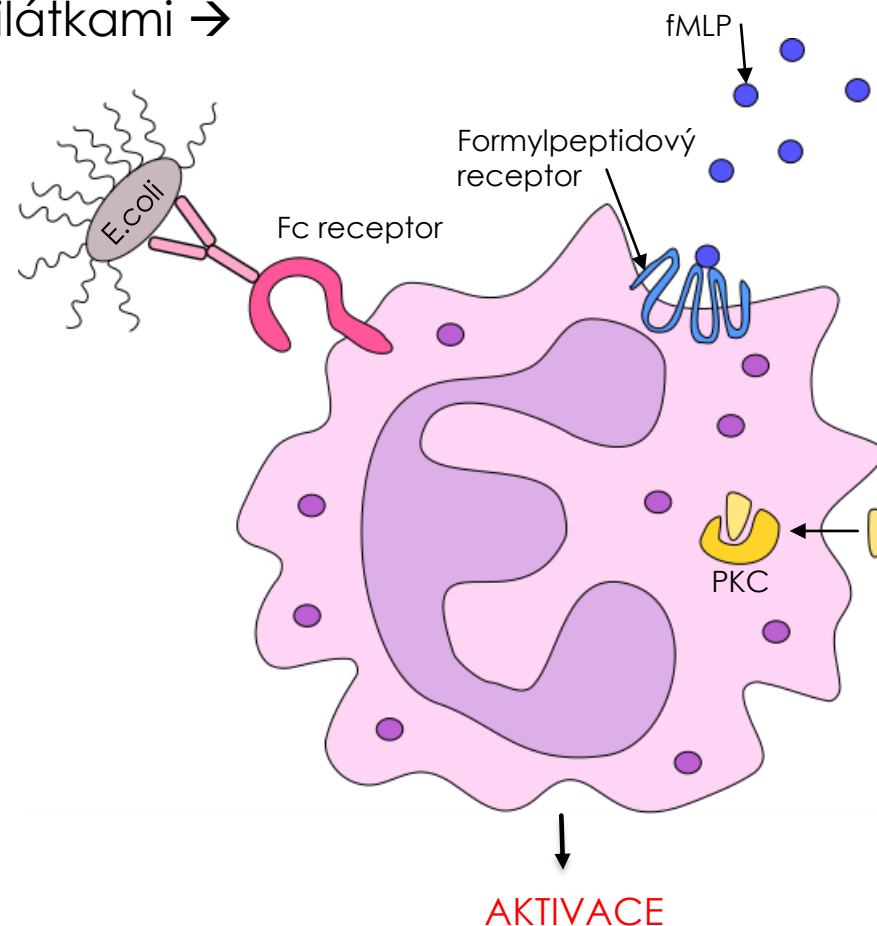
- ▶ Detekce oxidačního vzplanutí v **granulocytech** a monocytech pomocí průtokové cytometrie
- ▶ Princip – Produkty oxidačního vzplanutí oxidují fluorescenční barvivo
- ▶ Funkční test
- ▶ Odběr krve do heparinu
- ▶ Nejsou stanoveny konkrétní referenční meze
- ▶ **Nutno se vzorkem pacienta vždy zpracovat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

Burst test (BTT)

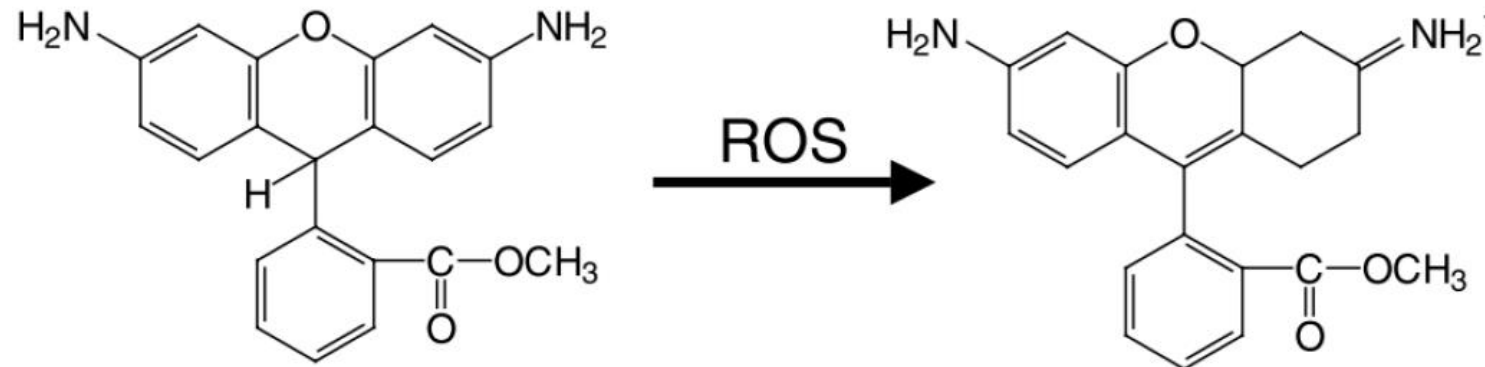
➤ Krok 1: Stimulace fagocytů

- **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

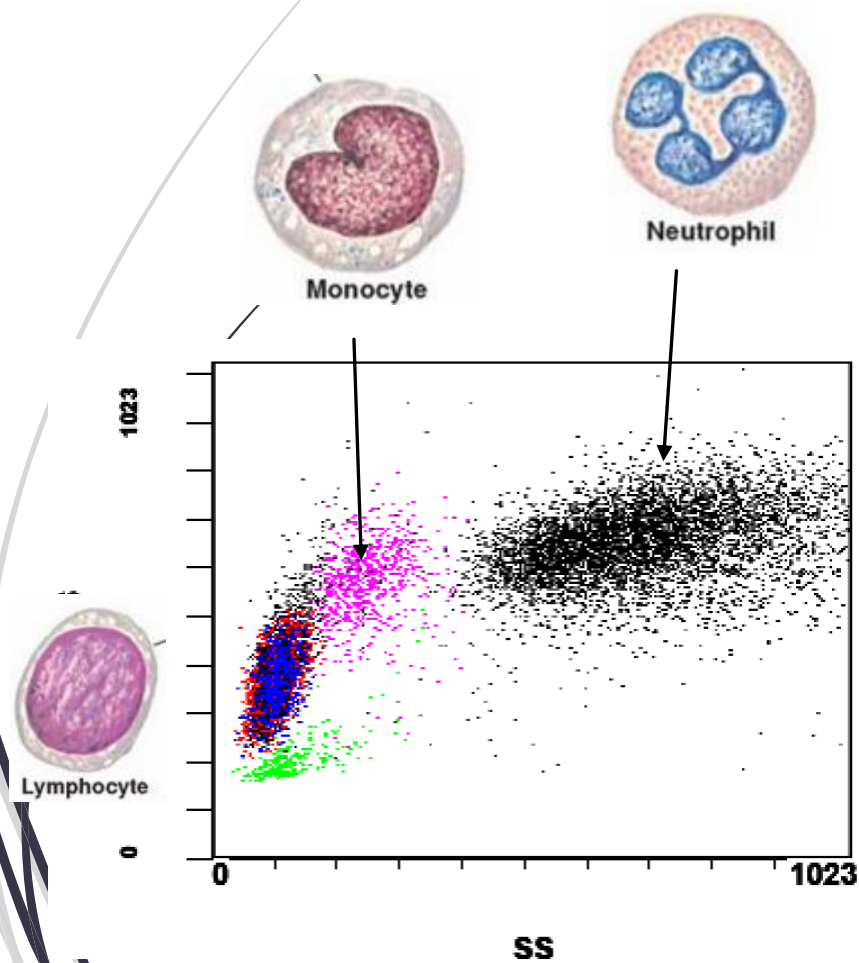
Burst test (BTT)

➤ 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

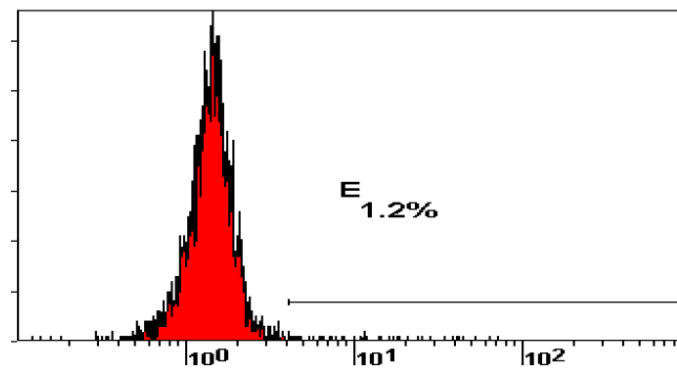


Burst test (BTT) – hodnocení



BEZ STIMULACE

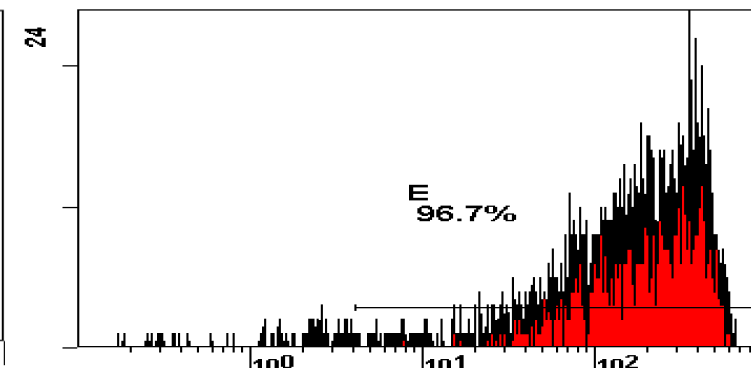
(1):Z0021459.LMD FL1 LOG A



NEGATIVNI K.

STIMULACE PMA

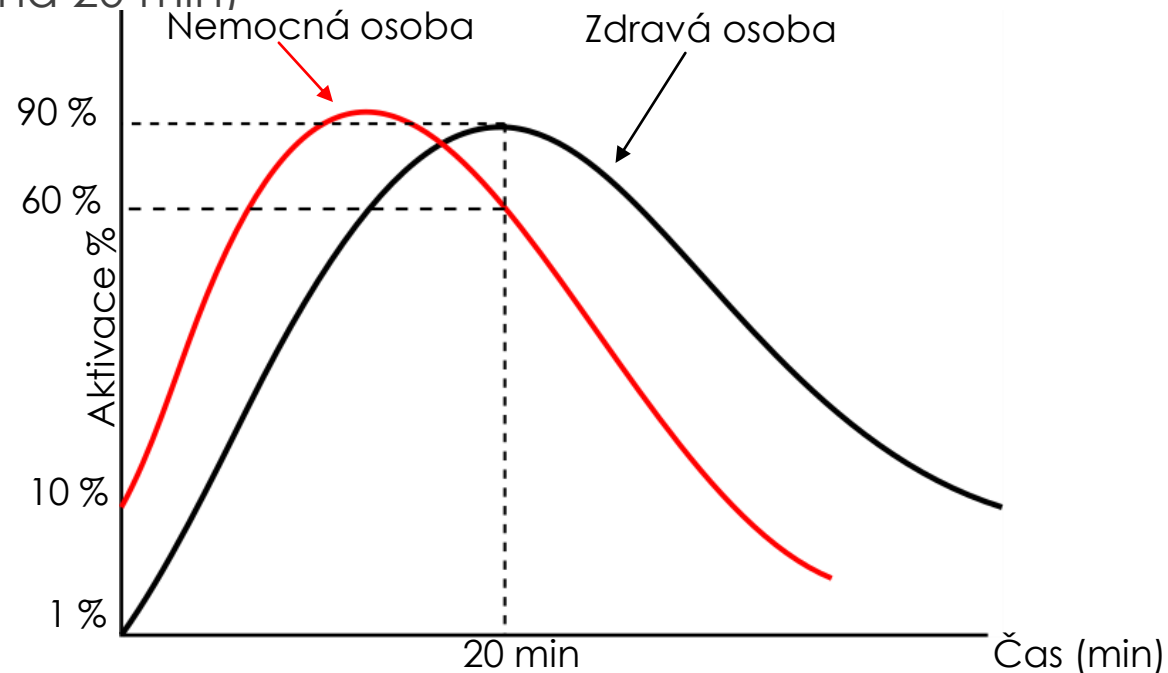
(4):Z0211867.LMD FL1 LOG A



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!

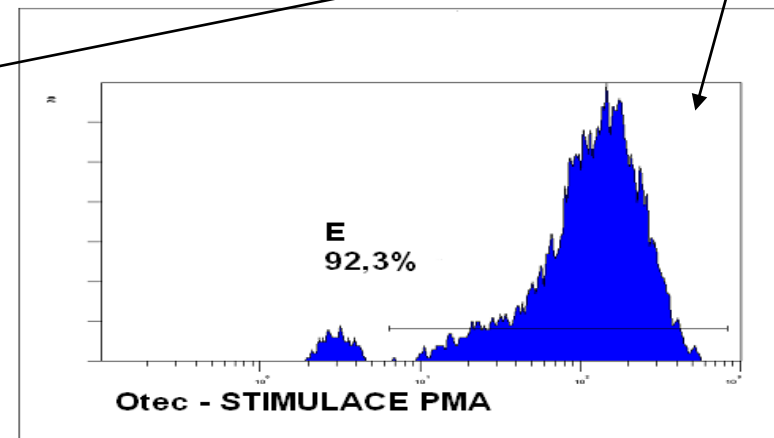
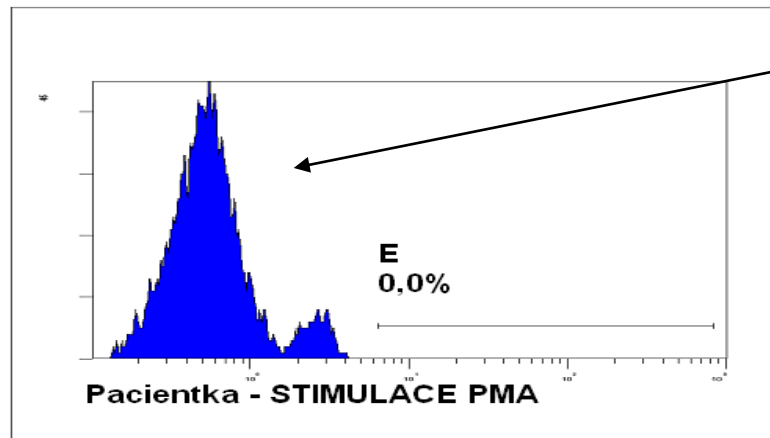
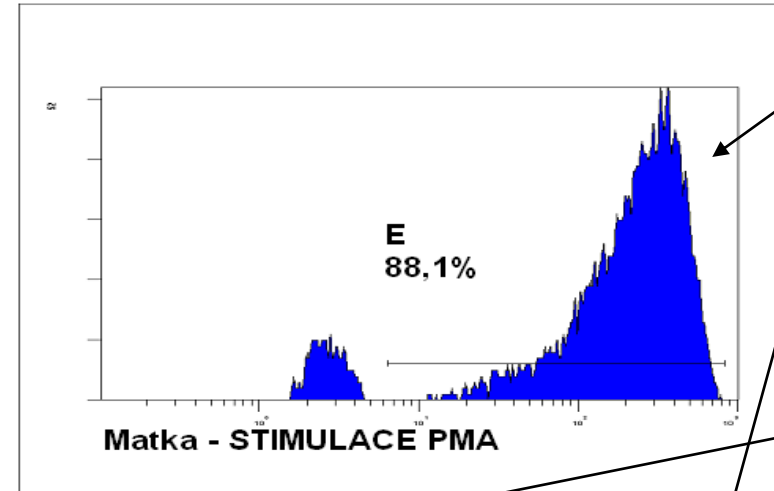
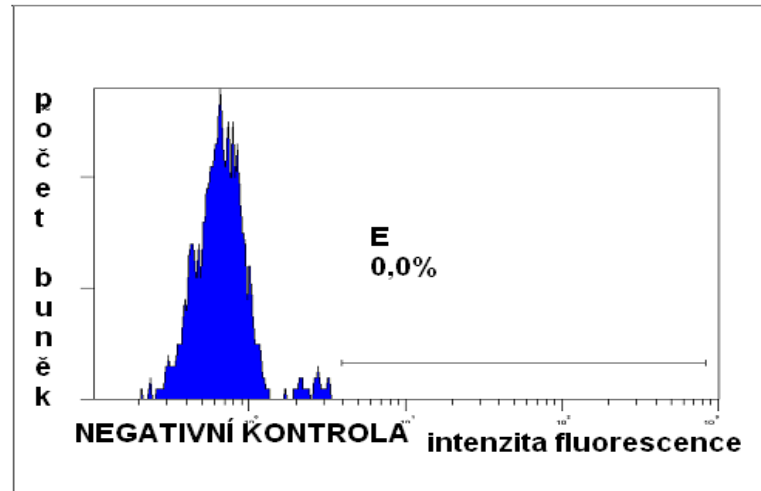
Chronická granulomatózní choroba (GCD)

- ▶ 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 (plísňě)
- ▶ Tvorba hlubokých abscesů (mohou působit útlak okolních tkání)
- ▶ Časný nástup choroby



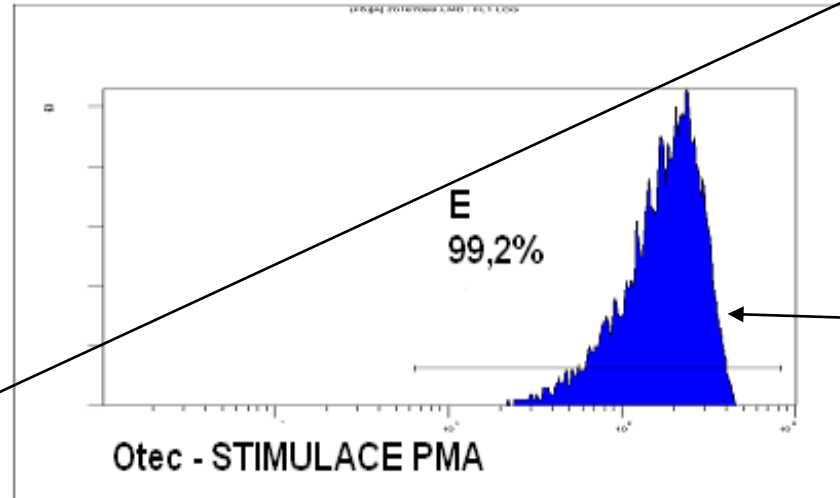
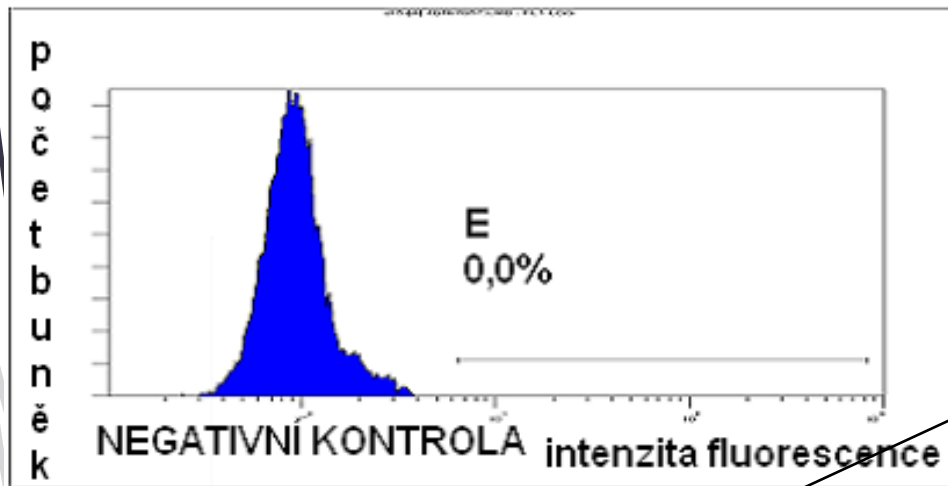
GCD

de-novo mutace – autosom. recesivní



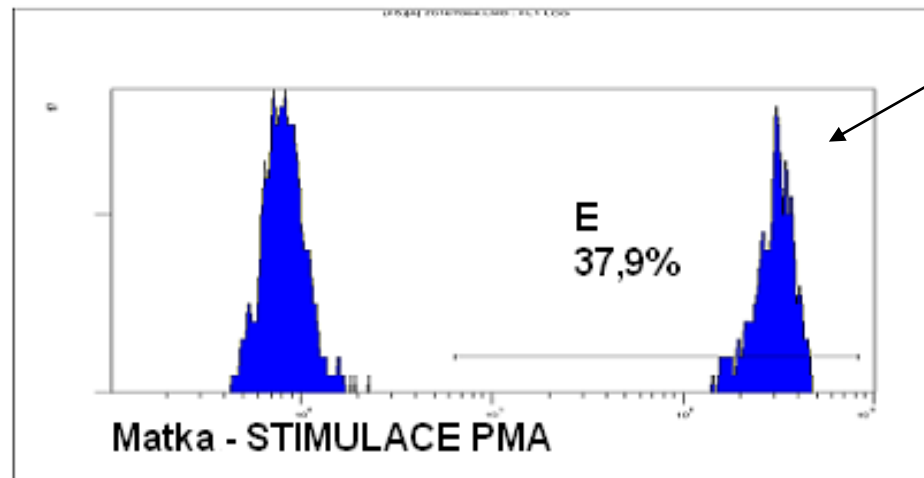
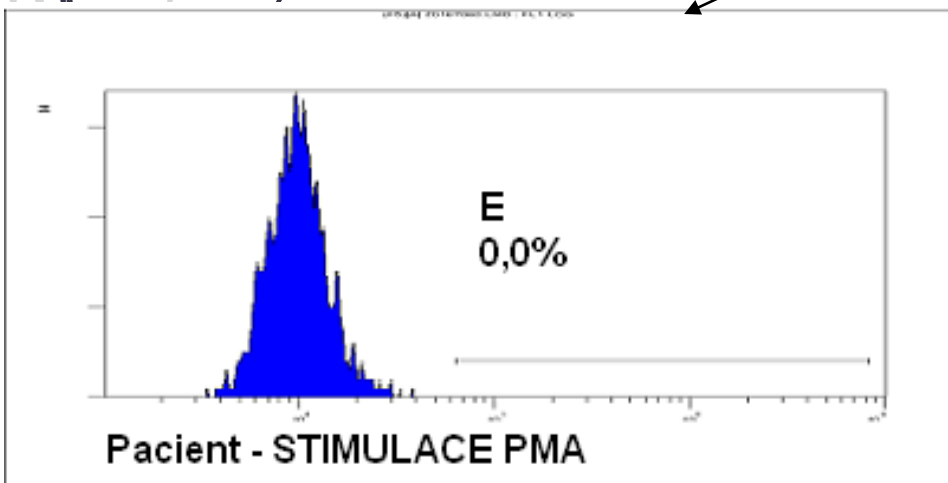
Matka i otec mají neporušenou aktivitu oxidačního vzplanutí fagocytů, zatímco jejich dítě (pacientka) po PMA vypadá shodně s negativní kontrolou

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



Myeloperoxidáza (MPO, MXX)

- Oxidoreduktáza
- Obsažena v granulích neutrofilů a monocytů
- Obsahuje hem – nazelenalé zbarvení sekretů s vyšším obsahem fagocytů
- Přeměňuje peroxid vodíku na kyselinu chlornou (až 50 krát toxičtější)

- NETóza - MPO obsažena v síti tvořené jaderným materiálem
- Negativní regulace pomocí syntézy NO – tvorba nitrosylových komplexů

Deficience myeloperoxidázy

► Deficience vrozená:

1. částečná - výskyt cca 1:2000
2. úplná - výskyt cca 1:4000

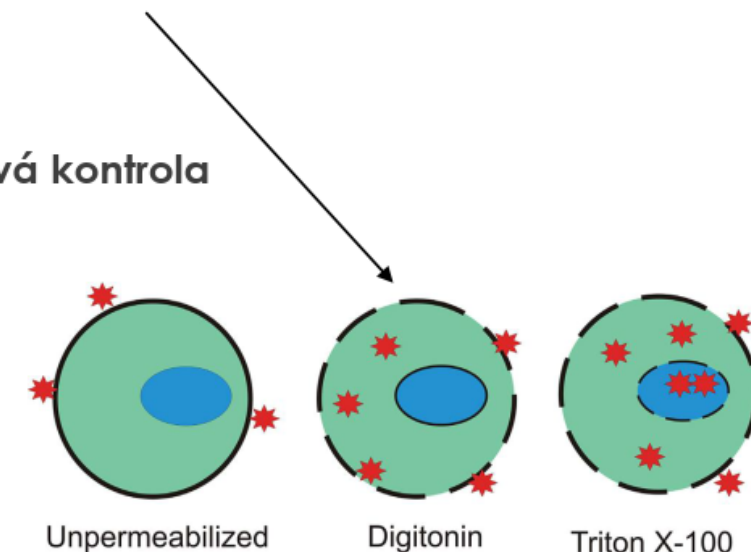
- Dědičnost - autosomálně recesivní
- Až 50% pacientů klinicky asymptomatických
- Závažný průběh nemoci – 5-10% postižených (časté infekce, zejména plísně)

► Deficience získaná:

- diabetes mellitus, těžké infekce, nedostatek železa, intoxikace olovem, diseminované tumory, některé leukemie

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%**

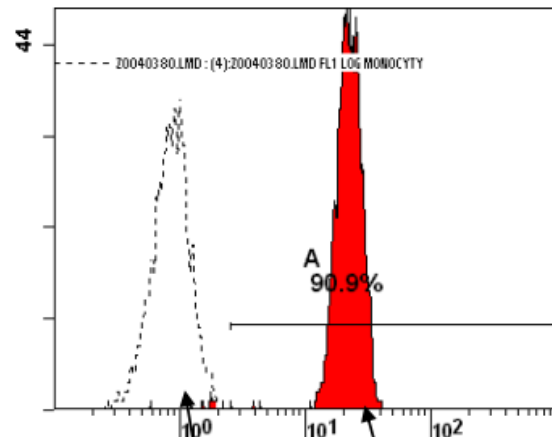


Deficit MPO

Exprese MPO - monocyty

ZDRAVÁ
KONTROLA

(6):Z0021369.LMD FL1 LOG MONOCYTY



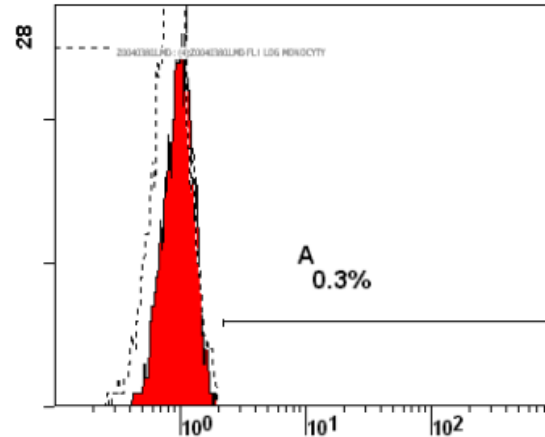
MPO FITC

Izotypová
kontrola

MPO pozitivní
monocyty

PACIENTKA

(5):Z0040381.LMD FL1 LOG MONOCYTY

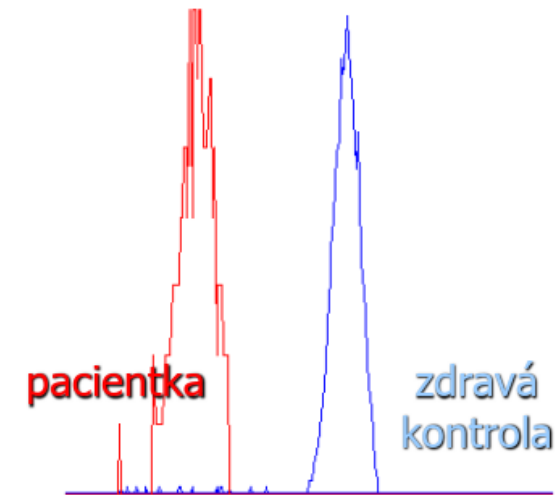


MPO FITC

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

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC
■ MPO FITC

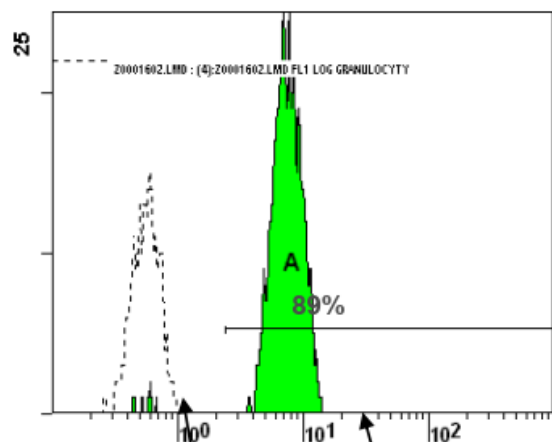


Deficit MPO

Exprese MPO - granulocyty

ZDRAVÁ
KONTROLA

(2):Z0019678.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY



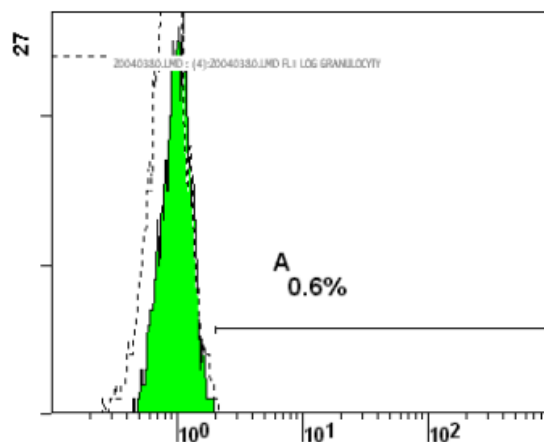
MPO FITC

Izotypová
kontrola

MPO pozitivní
granulocyty

PACIENTKA

(6):Z0040381.LMD FL1 LOG GRANULOCYTY

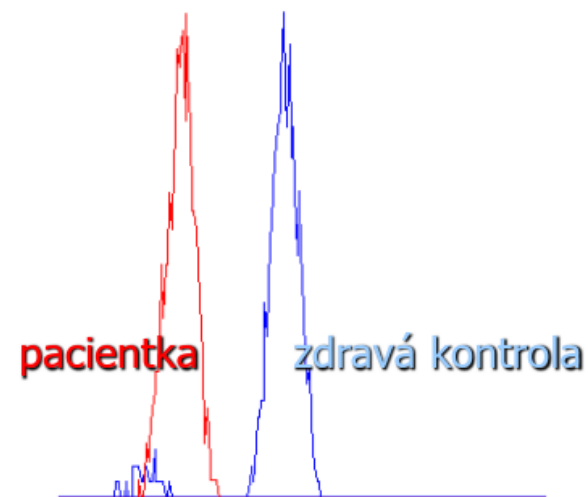


MPO FITC

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

SROVNÁNÍ

■ MPO FITC
■ MPO FITC



pacientka

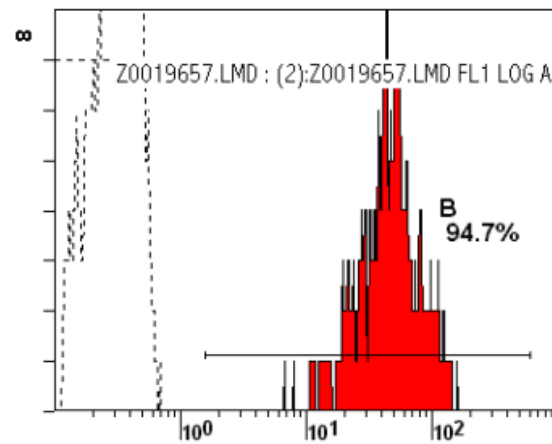
zdravá kontrola

Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

Burst Test - stimulace *E. coli*

ZDRAVÁ
KONTROLA

(3):Z0019658.LMD FL1 LOG A



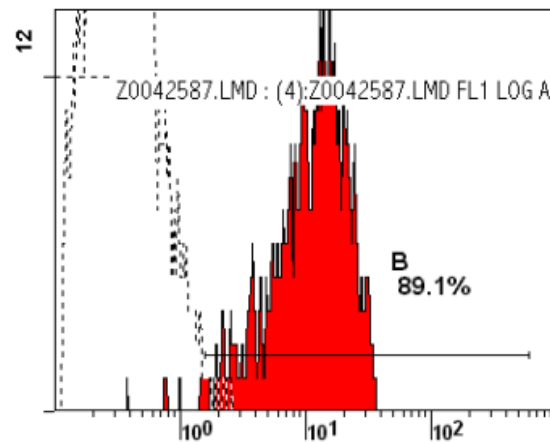
STIMULACE E.C.

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.

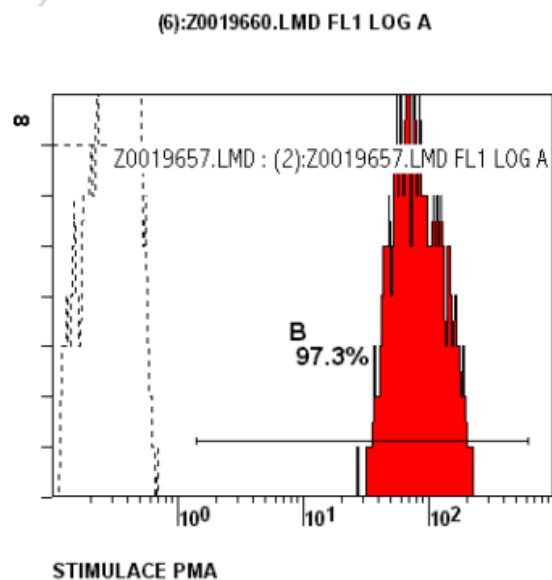


Fagocyty mají u pacientky nižší pozitivitu meanu intenzity fluorescence (posun píku doleva) na oxidační vzplanutí po stimulaci *E. coli* ve srovnání se zdravou kontrolou.

Deficit MPO lze poznat i na Burst Testu!

Burst test - stimulace PMA

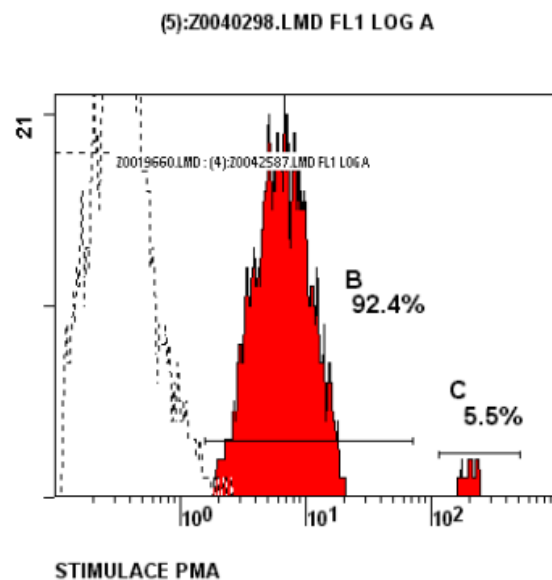
ZDRAVÁ KONTROLA



Počet aktivovaných
buněk: 97%

Stimulační index: 281

PACIENTKA

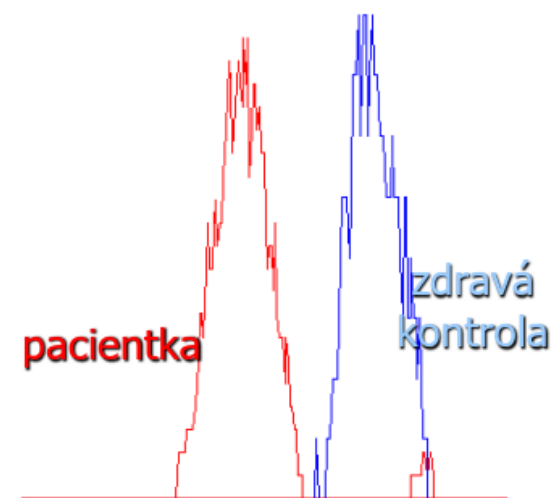


Počet aktivovaných buněk:
92% a 6%

Stimulační index: 23 a 201

SROVNÁNÍ

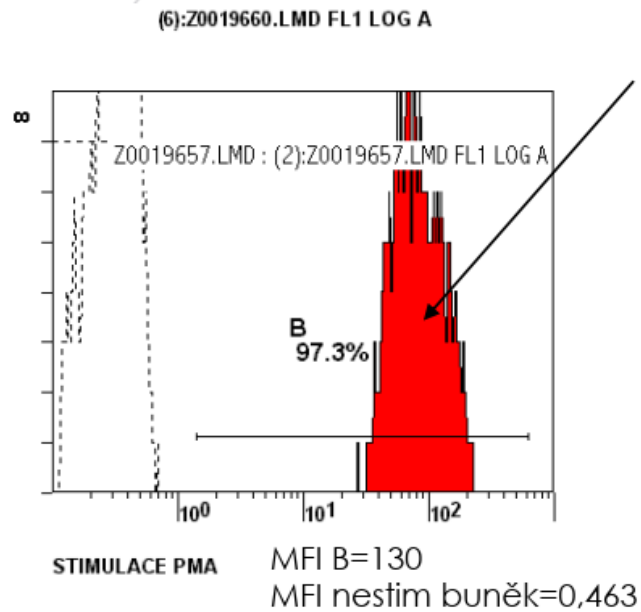
■ STIMULACE PMA
■ STIMULACE PMA



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