

1 Fagocytóza a metody jejího sledování

Fagocytóza je jeden ze základních projevů živočišných buněk. V savčím mnohobuněčném organismu existuje celá řada buněk, u kterých je schopnost fagocytózy zachována. Ovšem pouze určitá skupina buněk 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 pouze zpracování a prezentaci antigenů (dendritické buňky, monocyty, makrofágy).

Proces fagocytózy se skládá z několika dílčích kroků

Krok fagocytózy	Metoda k jeho detekci
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 dílčí kroky (např. na pohlcení – MSHP test, nebo na degradaci - oxidativní vzplanutí) zatímco jiné metody jsou schopny monitorovat celý popsáný proces (baktericidní test z plné krve).

Pro průběh chemotaxe je nutný

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

V každém z těchto dílčích kroků může docházet k poruchám. Uvedené testy nás informují pouze o celkovém průběhu procesu a nelze s jejich pomocí určit, ve kterém konkrétním kroku je porucha.

Testy pro stanovení chemotaxe

Boydenova komůrka

Je založena na průchodu fagocytů přes nitrocelulózu membránu z jedné části nádoby do druhé, kde je umístěn chemoatraktant. Počet buněk, které vykazují pozitivní chemotaxi je možné kvantifikovat. Metoda byla hodně uplatňována před zhruba 30 lety. V současnosti se již nepoužívá pro velkou pracnost, variabilitu výsledků a poměrně malou výpovědní hodnotu.

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.

MSHP test

Slouží k detekci míry pohlcování (ingesce). Částice, které se v tomto testu používají jsou z hydroxyethylmetakrylátu. Jsou hydrofilní, mají nízký negativní náboj, proto mají minimální nespecifické adheze na buňky a vzájemně neagregují. Pro stanovení 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 ke dnu. Ze suspenze 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 1 buňkou.

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

Výhody a nevýhody: jednoduchost, nutná zkušenost s vyhodnocováním, krev musí být čerstvá (do 2 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 stádia nádorových onemocnění nebo těžké imunodeficence. Nízkou schopnost fagocytózy mají také prekursorů 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 sledování účinnosti léčby kolonie stimulujícími faktory (GM-CSF).

Baktericidní test

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

Vyhodnocení

U velkých mikroorganismů (*C. albicans*) lze test vyhodnocovat mikroskopicky po obarvení (s využitím trypanové modři). Hodnotí se množství usmrcených (obarvených) mikroorganismů. Před vlastním hodnocením je třeba leukocyty lyzovat.

U malých mikroorganismů (*S. aureus*) se využívá hodnocení na kultivačních půdách. Bakterie se po proběhlé reakci vysadí na živnou půdu a ty, které přežily vytvoří kolonie, které se počítají.

Výhody a nevýhody: metoda je náročná na práci a těžko standardizovatelná, je opět potřeba čerstvá krev, antikoagulancia, neustálé třepání, pro kultivace mikrobů je nutné zázemí mikrobiologické laboratoře. Při pasážování mikroorganismu dochází ke snižování jeho virulence a změnách antigenních vlastností, proto je obtížné srovnání jednotlivých stanovení.

Detekce oxidativního vzplanutí:

NBT test

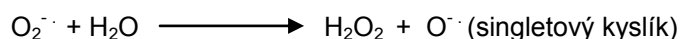
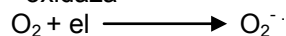
Při stanovení se využívá substrát NBT – nitroblue-tetrazolium chlorid. Detekce oxidačního metabolismu je založena na redukci bezbarvé tetrazoliové soli (NBT) na barevný formazán. NBT vstupuje do buněk a po jejich aktivaci se vlivem oxidačních pochodů ve vakuole nebo na membránách buněk redukuje na barevnou 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, v tomto případě se pracuje na mikrotitračních deskách. Metodu lze kombinovat se sledováním ingesce MSH partikulí a zjistit tak, zda buňky, které fagocytují, jsou schopny tvořit kyslíkové radikály cestou oxidativního vzplanutí.

Výhody a nevýhody: Metoda je levná, nenáročná. Krev musí být podobně jako u ostatních metod detekce fagocytózy zpracována do dvou hodin po odběru.

Chemiluminiscence

Tato metoda je nejvhodnější pro kvantitativní hodnocení oxidativního vzplanutí. Klíčovým enzymem je NADPH oxidáza v membráně fagocytů, která přenáší elektron na molekulový kyslík, čímž se tvoří superoxidový radikál:

NADPH
oxidáza



Během těchto procesů vznikají elektronově excitované stavy, které emitují fotony. Při chemiluminiscenčním stanovení dochází k oxidaci molekul luminoforu (luminol, izoluminol nebo lucigenin). Ten je uveden do excitovaného stavu a následně vyžáří energii v podobě světla, které je detekováno přístrojem – luminometrem.

Vzorky se vyšetřují vždy v paralelkách, stanovení je vysoce citlivé. Lze hodnotit jednak spontánní CL, kdy se nepřidává aktivátor a aby vzorky měly stejný objem a tedy i koncentraci reakčních

složek, přidává se místo aktivátoru médium. Dále se stanovuje aktivovaná CL, kdy jako aktivátorů se používá např. PMA – phorbolmyristát acetát, který aktivuje přímo proteinkinázu C a dále pak NADPH oxidázu. Dalším používaným aktivátorem je suspenze mikroorganismů, škrobových částic nebo Zymosanu, což je složka kvasinkových buněčných stěn.

Měření trvá zpravidla jednu hodinu a výsledkem je CL křivka, která má za fyziologických podmínek tvar charakteristický pro použitý vzorek (plná krev, izolované buňky) a zejména pro typ použitého aktivátoru.

Výhody a nevýhody: CL aktivitu je nutné změřit do dvou hodin po odebrání krve, krev musí být nesrážlivá, přičemž se musí počítat s tím, že antikoagulancia mohou zhaset chemiluminiscenci. Měření trvá poměrně dlouho – 1 hodinu. Výsledek je nutno většinou přepočítat na počet buněk ve vzorku, nebo dát do vzorku již známý počet buněk. Vzhledem k tomu, že luminometry nepatří k běžnému vybavení imunologických laboratoří, je tato metoda využívána spíše jen ve výzkumu nebo v rámci speciálních vyšetření deficitů fagocytózy. Dovede totiž zachytit širší spektrum poruch včetně deficitů myeloperoxidázy, než testy NBT.

Touto metodou lze sledovat i zvýšení hodnoty oxidativního vzplanutí, které mohou být nebezpečné. Vlivem vyšší produkce kyslíkových radikálů může docházet k tzv. oxidativnímu poškození buněk a tkání vlastního organismu. Při těchto stavech bývá zvýšena i spontánní chemiluminiscence.

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

Princip

Inkubujeme-li krev se speciálními mikročásticemi, dochází k jejich pohlcování fagocytujícími buňkami, což je ukázka nespecifické imunitní reakce. Po inkubaci se z krve zhotoví krevní nátěr, který se obarví kyselými a zásaditými barvami 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 μm a při vyhodnocení výsledku ve světelném mikroskopu jsou pozorovatelné uvnitř fagosomů profesionálních fagocytů. Sleduje se počet buněk, které fagocytovaly, a také počet částic v jednotlivých buňkách.

Výhody a nevýhody

Přístrojově a časově nenáročná. Relativně rychlá (hodina inkubace + půl hodiny vyhodnocení). Levná metoda.

Chemikálie a roztoky

1. Komerčně dodávaná souprava MSHP

Obsahuje partikule v množství 600 000/ μl dest. vody a fosfátový pufr (PBS).

2. Komerčně dodávaná souprava na barvení krevních nátěrů – Leukodif.

Vzorek: Heparinizovaná myší krev

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 partikulí MSHP s PBS (1 : 1)
500 µl zásobního roztoku partikulí + 500 µl PBS > důkladně protřepáme
2. Každý zvlášť si do mikrozkušavky připravíme:
15 µl ředěné suspenze MSHP z kroku 1 + 30 µl heparinizované myší krve
3. Vzorky inkubujeme při 37 °C po dobu 30 minut. Nemáme-li třepačku, vzorky alespoň 2x během inkubace mírně protřepáme.
4. Připravíme krevní nátěry z krve inkubované s MSHP (postup najdete v sekci Obecné laboratorní postupy). Nátěr provedeme z 5 µl využitím pipety. Po zaschnutí obarvíme.
5. Pozorujeme pod světelným mikroskopem. Zvětšení 1000 x (imerzní objektiv – imerzní olej).

Hodnocení

Vyhodnotíme krevní diferenciál ze 100 buněk (způsob vyhodnocení krevního diferenciálu v sekci Obecné laboratorní postupy). 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, která udává počet buněk, které byly schopné fagocytózy tzv. buňky pozitivní. Za pozitivní se považují buňky, které zfagocytovaly 3 a více partikulí.

Z hodnoty pozitivních buněk vypočítáme:

1) **Fagocytární aktivitu**, která hovoří o procentu leukocytů schopných fagocytózy. Jednotky jsou %. Jako vstupní hodnoty uvádějte buď abso­lutní počet buněk (např. 40 pozitivních buněk a 82 fagocytů) nebo relativní v % (např. 40 % pozitivních buněk ze všech leukocytů a 82 % fagocytů ze všech leukocytů).

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

2) **Fagocytární index:**

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

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.