

ÚLOHA 5: Stanovení fagocytárních schopností leukocytů in vitro metodou chemiluminiscence

Princip

Fagocyty, především neutrofilů 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⁻ 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 vyžádat 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 phorbolmyristát acetát (PMA) nebo škrob. 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. Dobře reprodukovatelná metoda. 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] – 3-aminophthalhydrazid ($M = 177,16$)
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. Zředit přidáním 500 μ l HBSS do zkumavky s OZP.
3. Hanks ballanced salt sollution (HBSS, Hanksův roztok) pH 7,4 množství 225 ml.
4. Tůrkův roztok pro barvení leukocytů
5. Komerčně dodávaná souprava na barvení krevních nátěrů – Leukodif.

Vzorek: Heparinizovaná myší krev.

(30 µl/st.)

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 mikrojampky) nebo mikrotitrační destička.



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]				
		Jamka	HBSS	Luminol	ředěná plná krev	Aktivátor
Spontánní	Blank S	A	275	25	-	-
		B	275	25	-	-
	Vzorek	C	25	25	250	-
		D	25	25	250	-
Aktivovaná	Blank OZP	E	250	25	-	25
		F	250	25	-	25
	Vzorek	G	-	25	250	25
		H	-	25	250	25

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. Aktivátor se nanáší až POSLEDNÍ u přístroje, aby došlo k zachycení začátku reakce.

		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
5. Mezitím spočítáme počet leukocytů a krevní diferenciál v krvi před separací:
- Počet leukocytů určíme v Bürkerově komůrce po obarvení Tůrkovým roztokem (1 : 20).
 - Krevní diferenciál z krevního nátěru po obarvení Leukodifem - viz obecné postupy.

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.

Vytvořte podobnou tabulku, ve které uvedete jen průměrné hodnoty z duplikátů či triplikátů. Pomocí známé koncentrace leukocytů a krevního diferenciálu přepočítejte naměřený chemiluminiscenční signál na počet fagocytů (uvádí se chemiluminiscence na 10^6 fagocytů). Mezi fagocyty patří hlavně neutrofily a monocyty. K výpočtu budete také potřebovat objem plné krve v jamce (kolik ředění krve je v jamce a jaké je ředění. Z těchto hodnot získáte absolutní počet fagocytů v jamce.

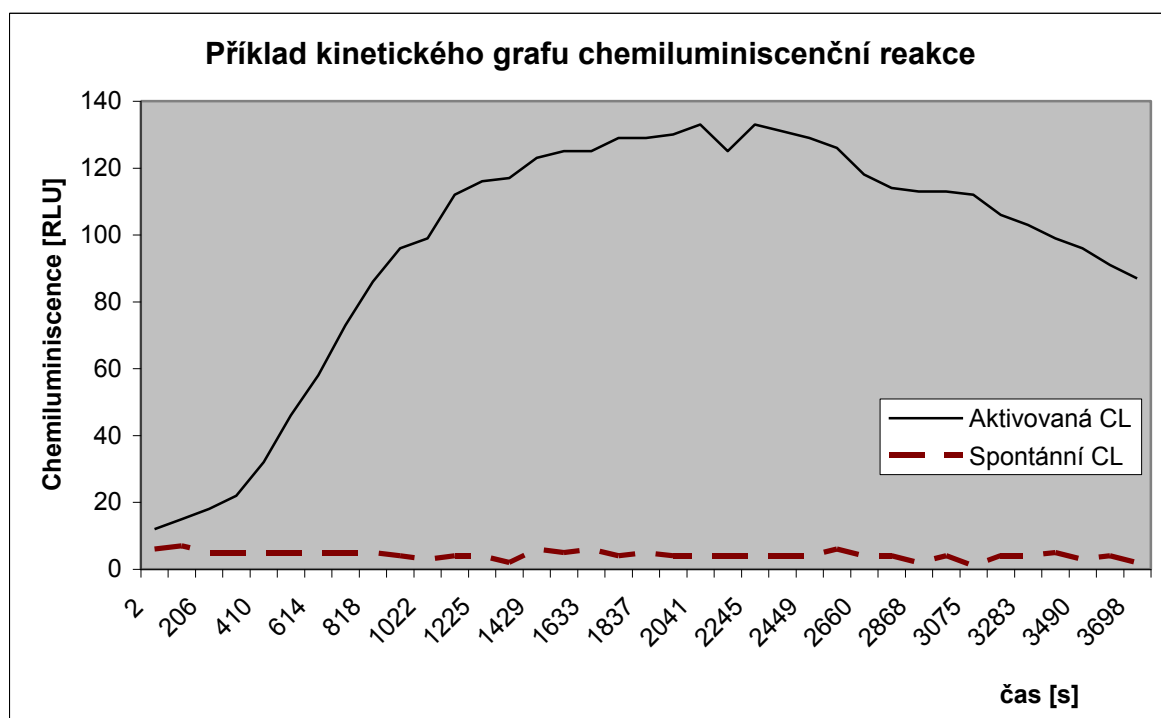
Výstup

Jako výstup uveďte do tabulky následující údaje pro každý vzorek – přepočítáno na milion fagocytů:

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

Nezapomeňte, že pracujete v duplikátech, takže je třeba vytvořit průměr ze dvou jamek téhož vzorku. Hodnoty také nezapomeňte převést na milion fagocytů.

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.