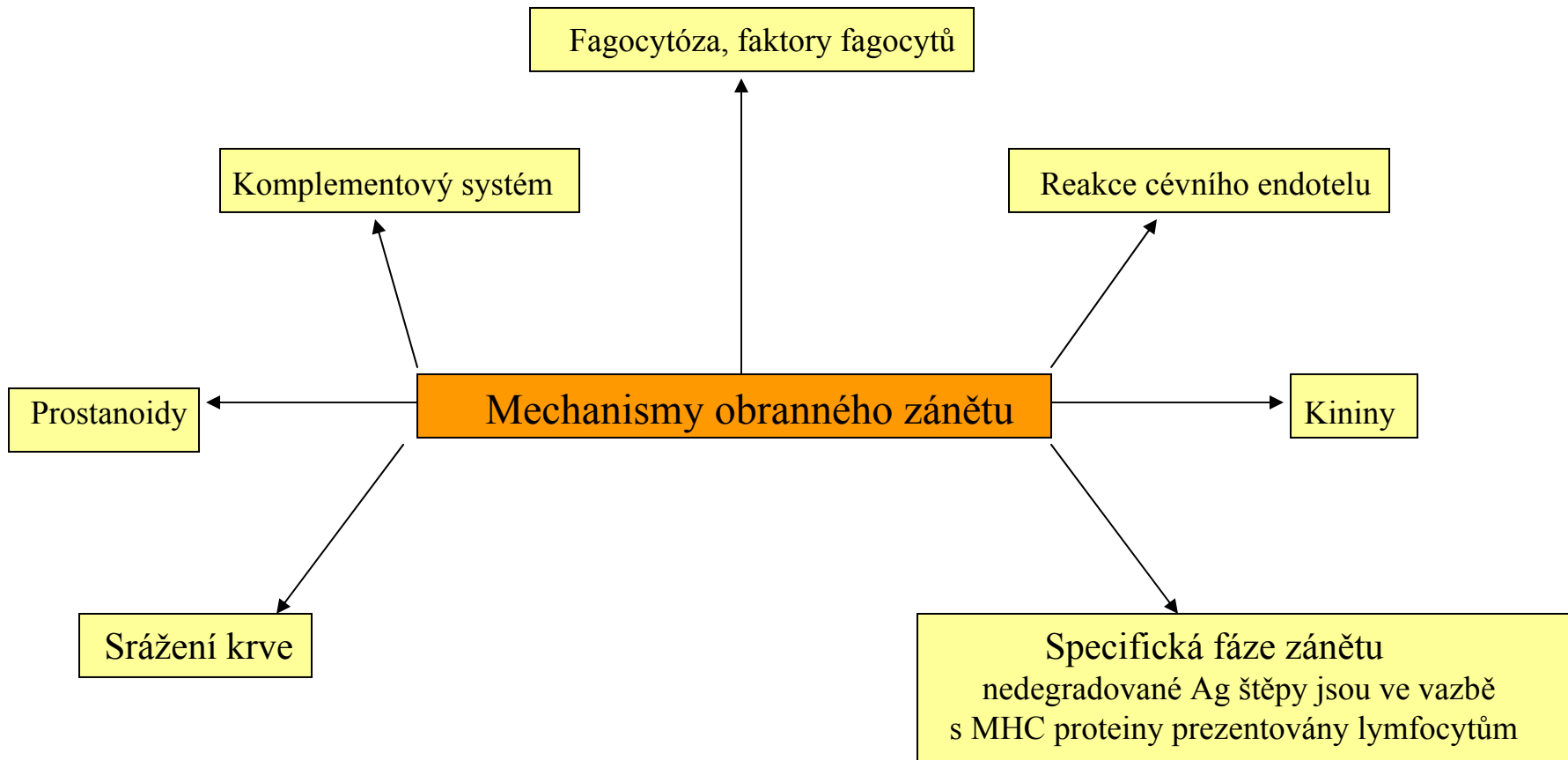
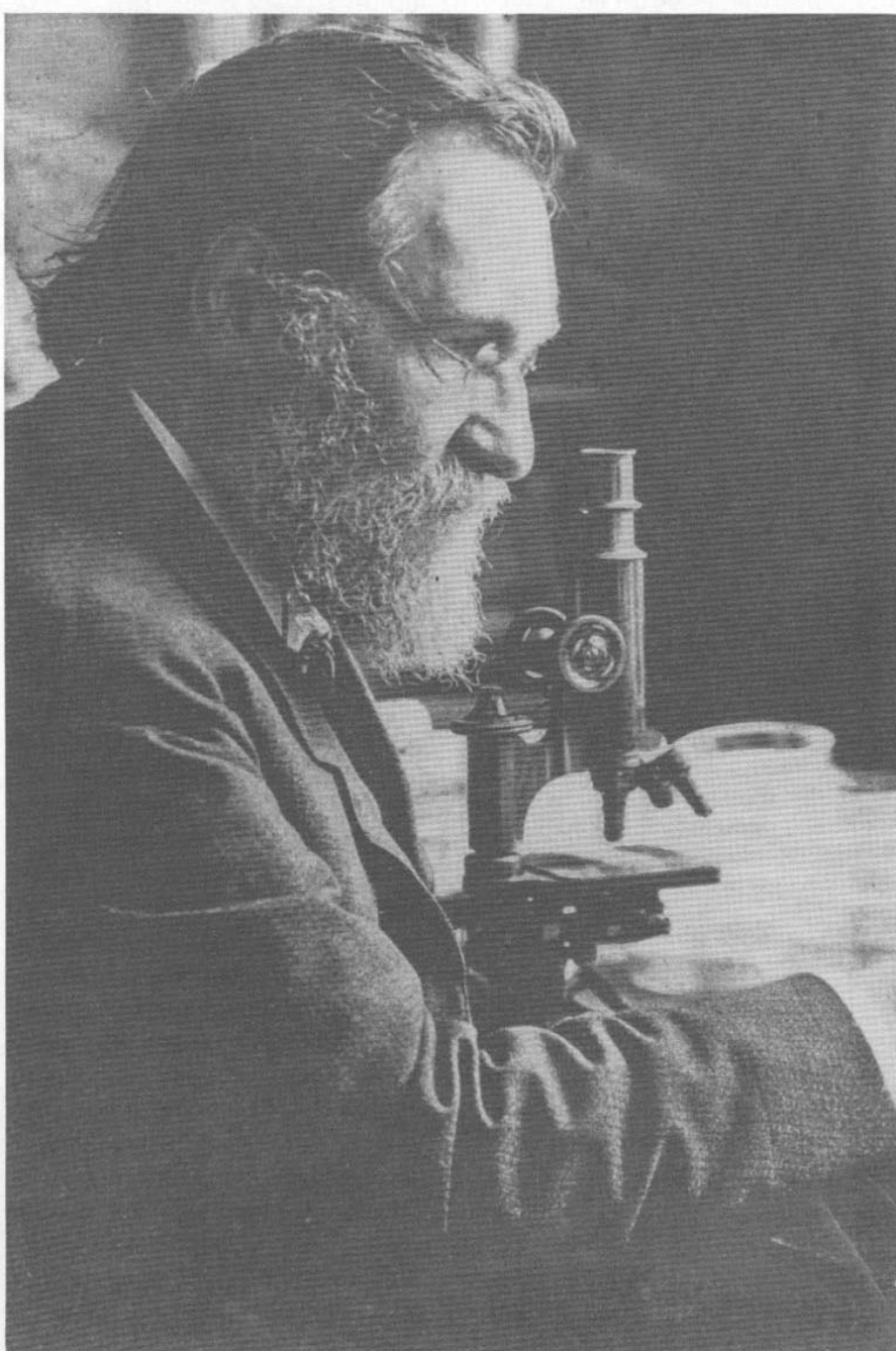


Fagocyty





Elie Metchnikoff (Courtesy National Library of Medicine)

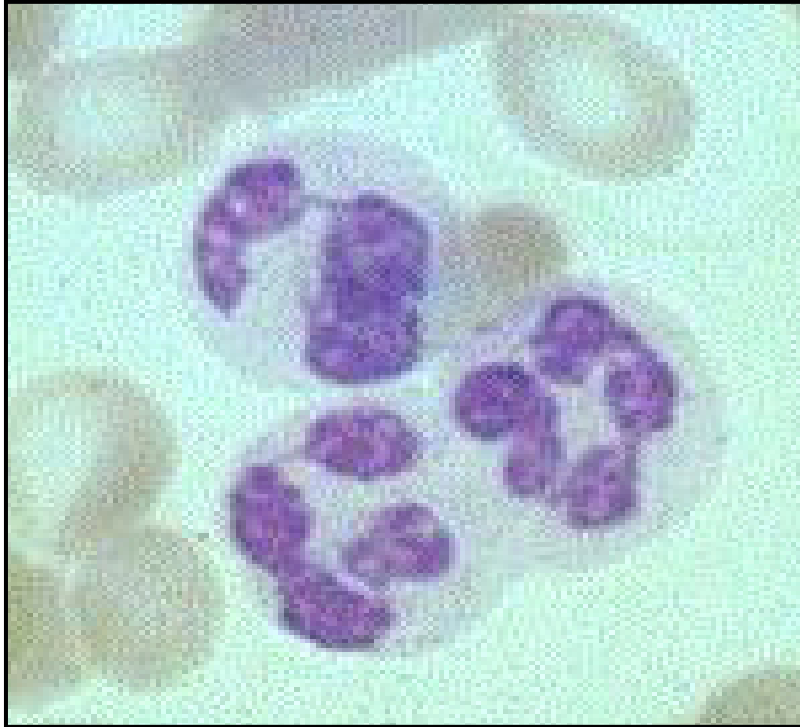
Ilja Mečnikov

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

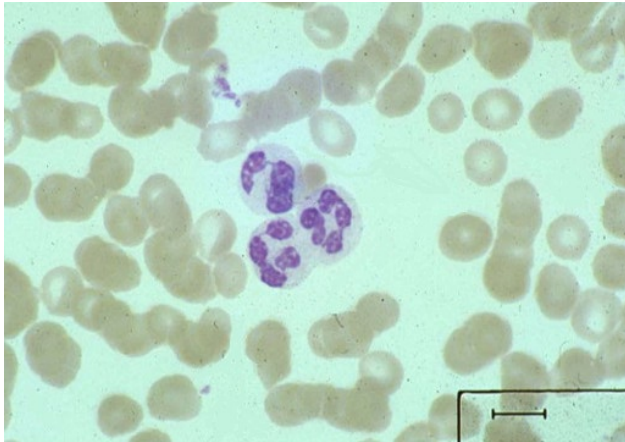
Neutrofily



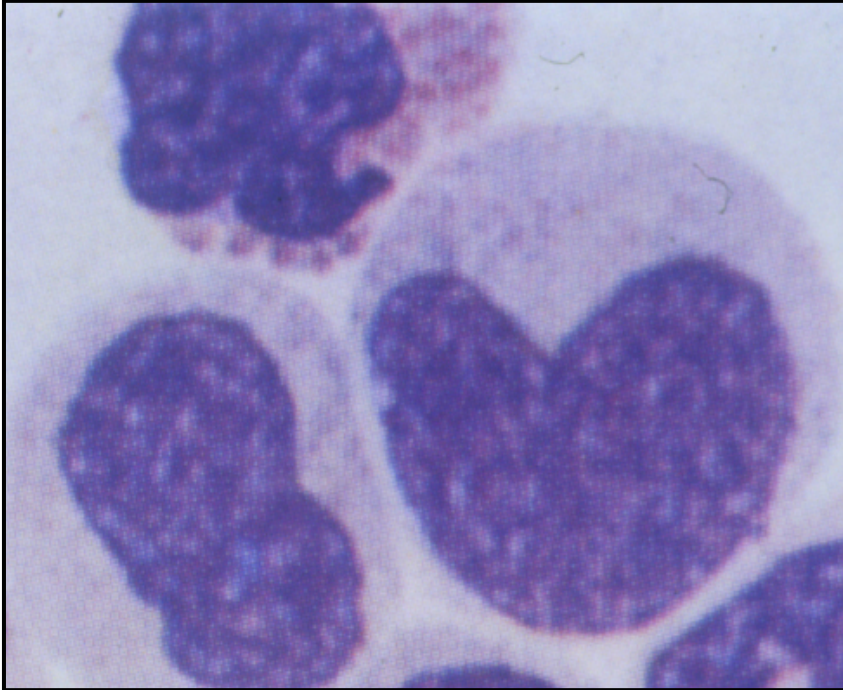
- phagocytóza, intracelulární zabíjení, zánět, poškození tkání
- charakteristické jádro
- granula a CD66 membránový marker
- krátce žijící, v nadbytku v krvi, chybí ve zdravé tkáni

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

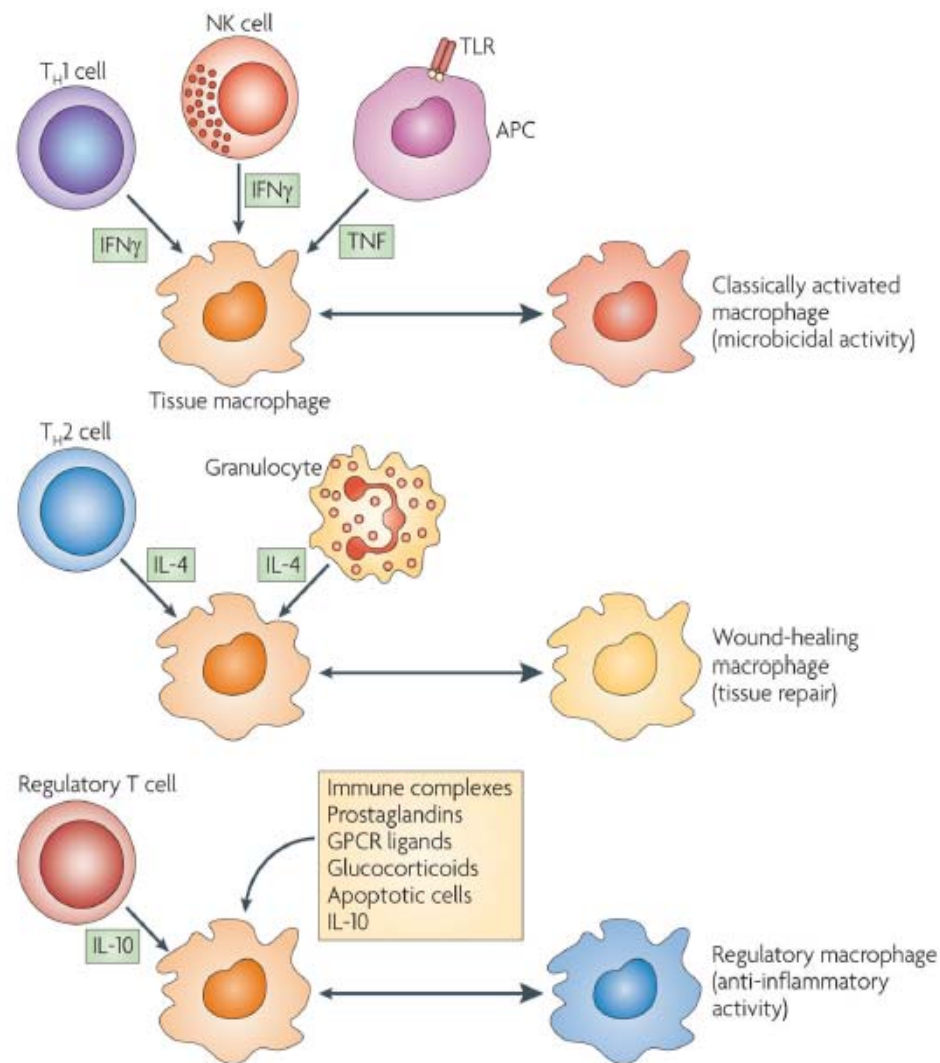


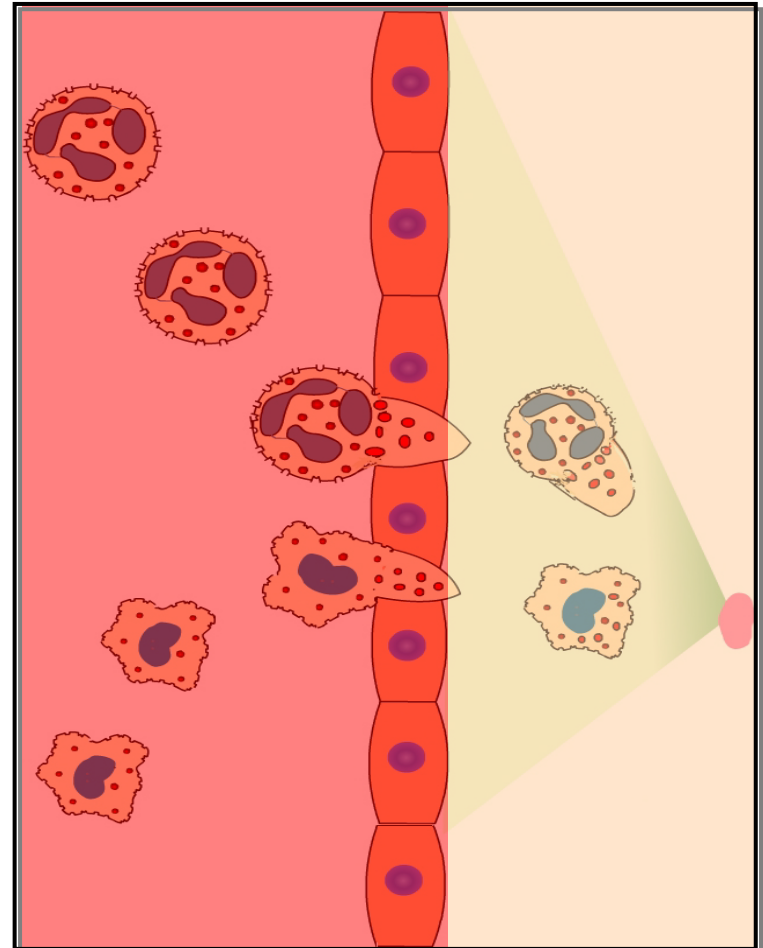
Figure 3. Cytokines produced by immune cells can give rise to macrophages with distinct physiologies

Classically activated macrophages arise in response to interferon- γ (IFN γ), which can be produced during an adaptive immune response by T helper 1 (TH1) cells or CD8⁺ T cells (not shown) or during an innate immune response by natural killer (NK) cells, and tumour-necrosis factor (TNF), which is produced by antigen-presenting cells (APCs). Wound-healing (alternatively activated) macrophages arise in response to interleukin-4 (IL-4), which can be produced during an adaptive immune response by TH2 cells or during an innate immune response by granulocytes. Regulatory macrophages are generated in response to various stimuli, including immune complexes, prostaglandins, G-protein coupled receptor (GPCR)

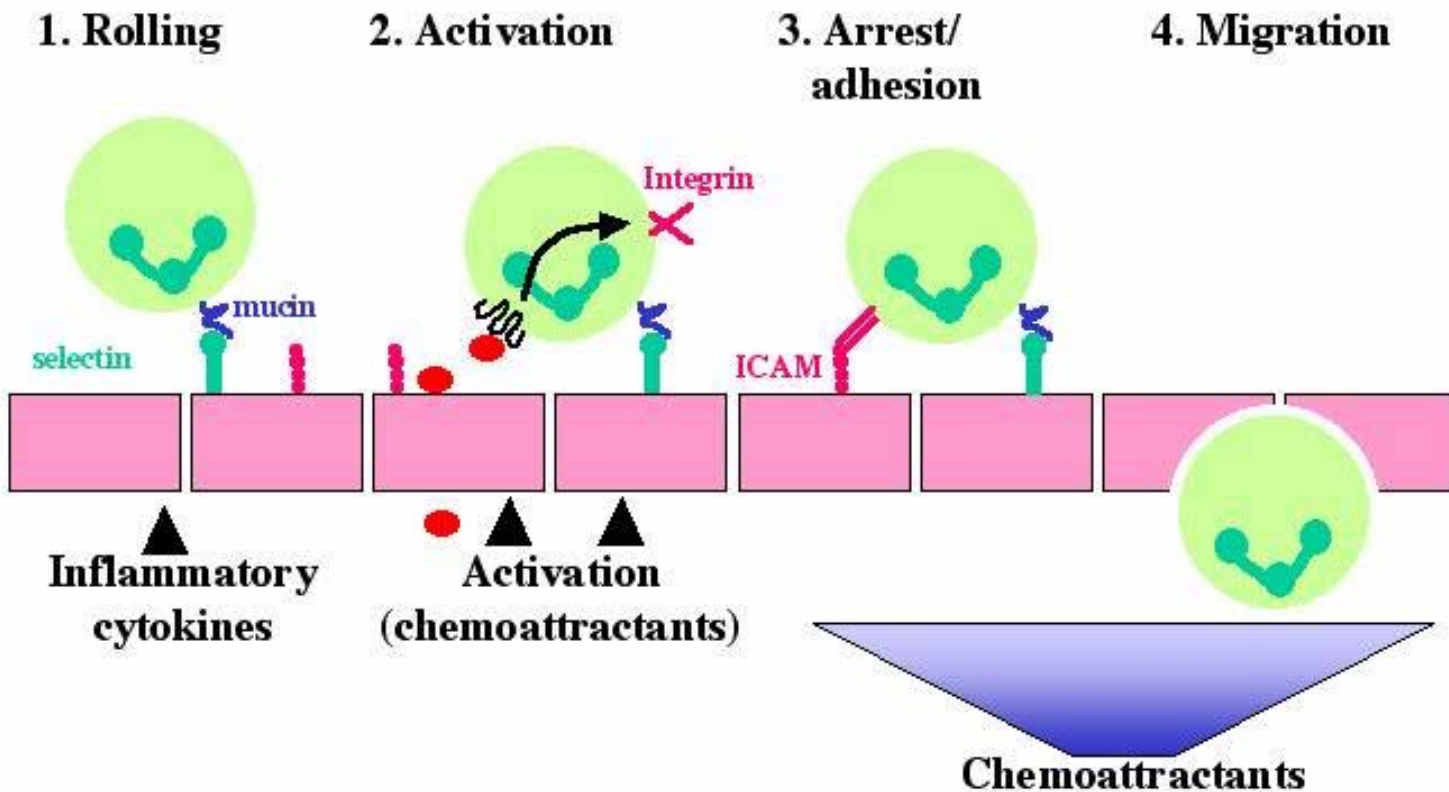
	Monocyty/makrofágy	Neutrofilly
Morfologie	Velké mononukleární buňky	Malé buňky s „multi-lobed“ jádrem
Lokalizace	Krev/tkáně	Krev – odvod do místa infekce
Po zabití bakterie	Migrují do lokálních lymf. uzlin	Umírají na místě apoptózou (zbytek je zlikvidován makrofágy)
Prezentace antigenu	Mohou prezentovat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

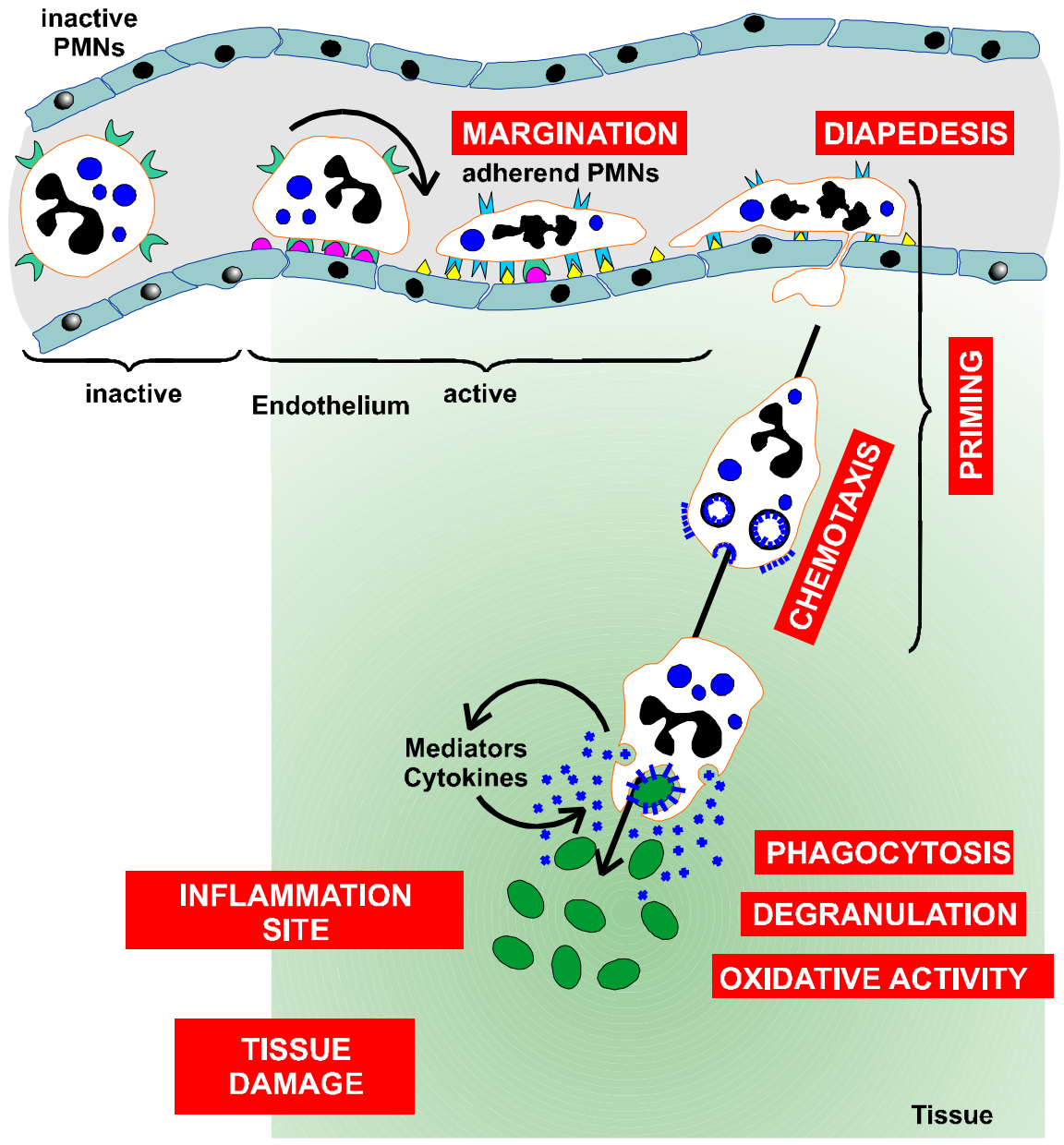
Aktivace fagocytů v zánětu

- ◆ SOS signály
 - N-fMLP
 - PGs, LTs, PAF
 - Komplement
 - Prozánětlivé cytokiny
- ◆ Odpověď fagocytů
 - chemotaxe
 - adherence
 - diapedéza
 - aktivace
 - Peptidy z kaskády srážení krve
 - fagocytóza a zabití



Jak neutrofily dosáhnou místa infekce ?

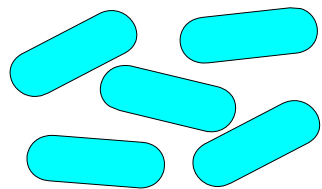




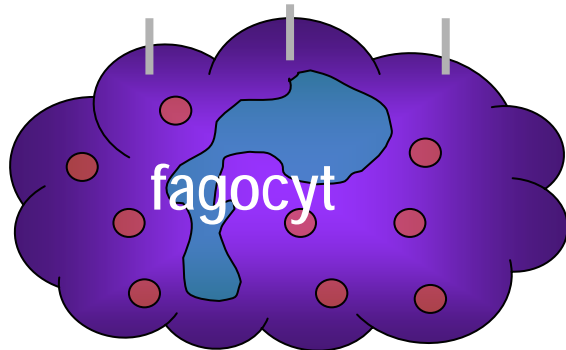
	Adhesion receptor on neutrophils	Counter-receptor on endothelial cells	Implicated in
Selectin interactions	p150sLe ^x (CD15) sLe ^x (CD15s), L-selectin(CD62L)	P-selectin(CD62P) E-selectin(CD62E); GlyCAM-1 and others neutrophil addressins	Leukocyte rolling; binding to high endothelial venules
Integrin-immunoglobulin superfamily interactions	LFA-1, (CD11a/CD18); VLA-4; (CD49d/CD29)	ICAM-1(CD54); ICAM-2(CD102); VCAM-1(CD106)	Secondary adhesion (<i>sticking</i>); spreading; homing to inflamed tissue
Immunoglobulin superfamily interactions	PECAM-1(CD31); HCAM(CD44)	PECAM-1(CD31)	Potentiating adhesion, transendothelial migration Receptor binding hyaluronate and other molecules of connective tissue

GlyCAM: Glycosaminoglycan-cell adhesion molecule; HCAM: homing cell adhesion molecule; ICAM-1, ICAM-2: intercellular adhesion molecule 1,2; LFA-1: leukocyte function associated antigen 1; PECAM: platelet endothelial adhesion molecule; sLex: sialylated Lewis antigen X; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule; VLA-4: very late antigen 4

Opsonizace

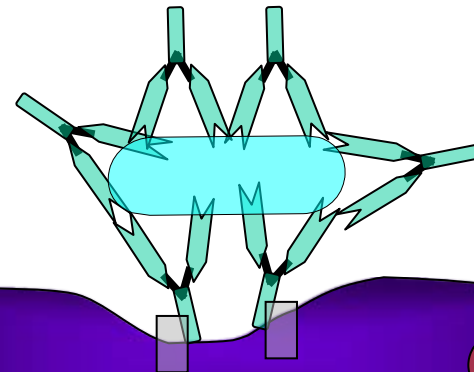


Extracelulární bakterie

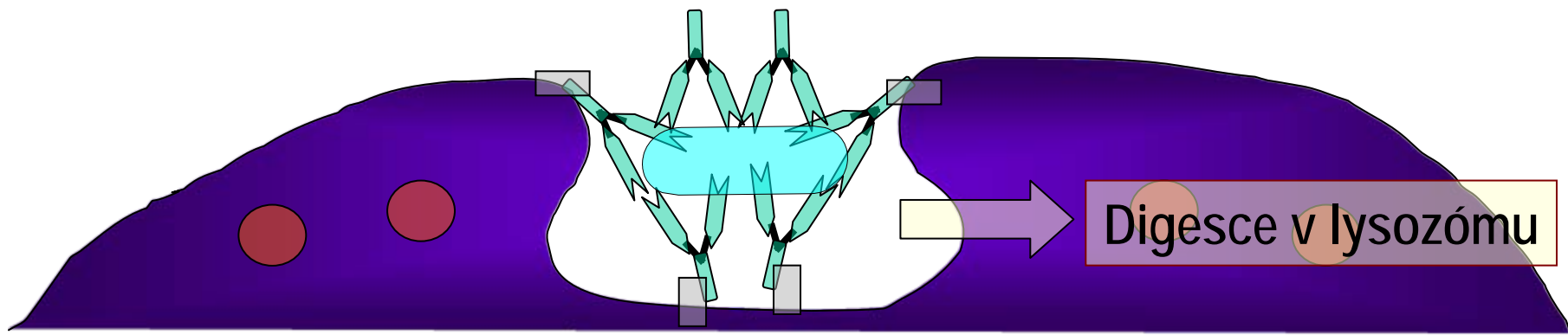


fagocyt

Opsonizace (Ab, C)

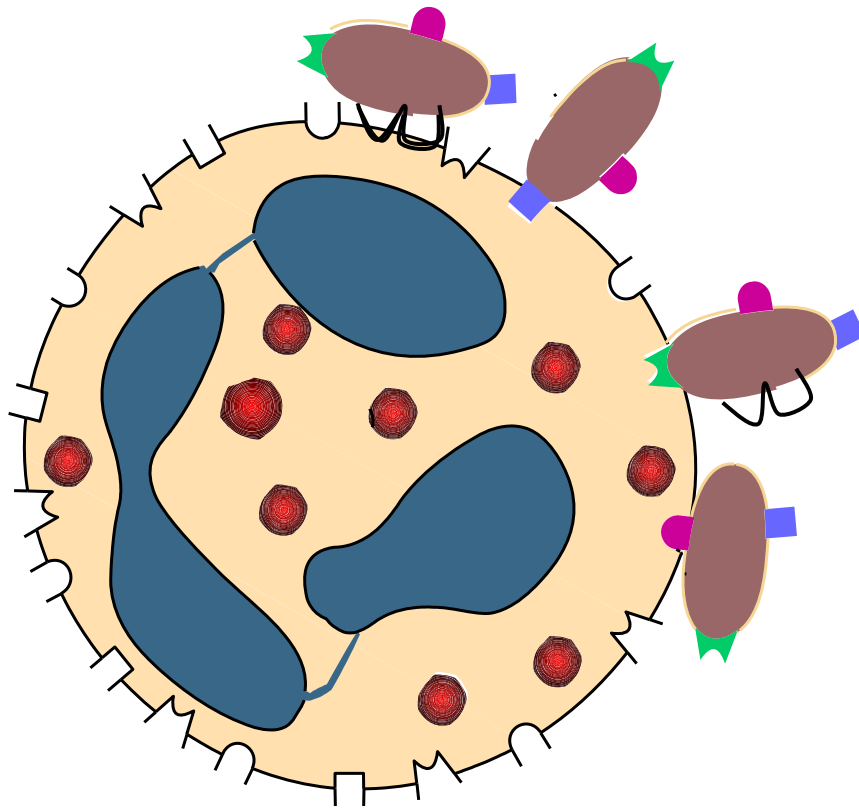


Ingesce fagocytem (Fc receptory, CR)



Digesce v lysozómu

Iniciace fagocytózy



Adheze cestou

U ScavengerR

□ IgG FcR

W CR

∩ 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, fosfolipas A2 a **myeloperoxidasu**

sekundární granula

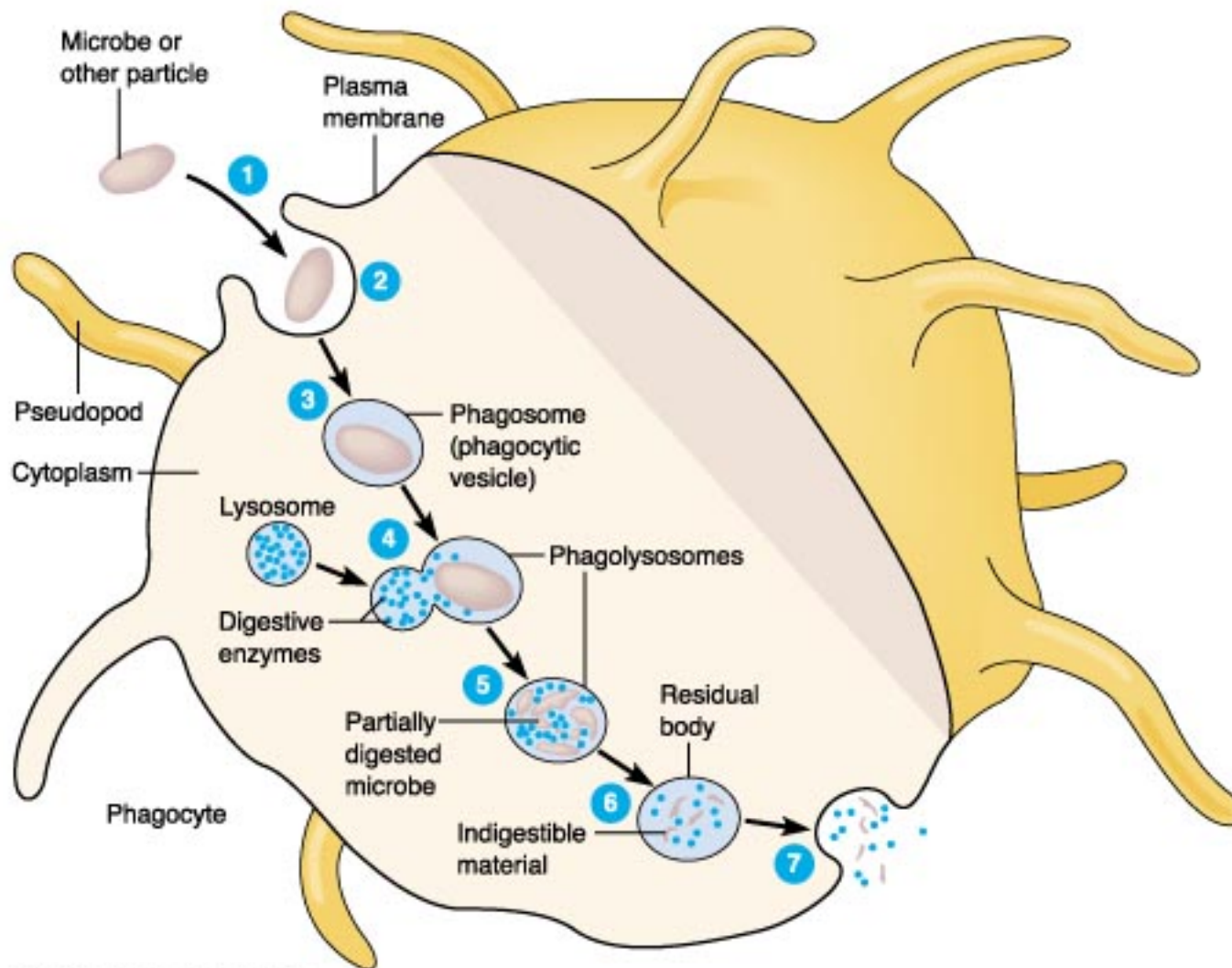
specifické pro zralé neutrofilly

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

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

Lysozomy – obsahují **kyselá hydrolasy**

Sekreční váčky – reservoir membránových komponent

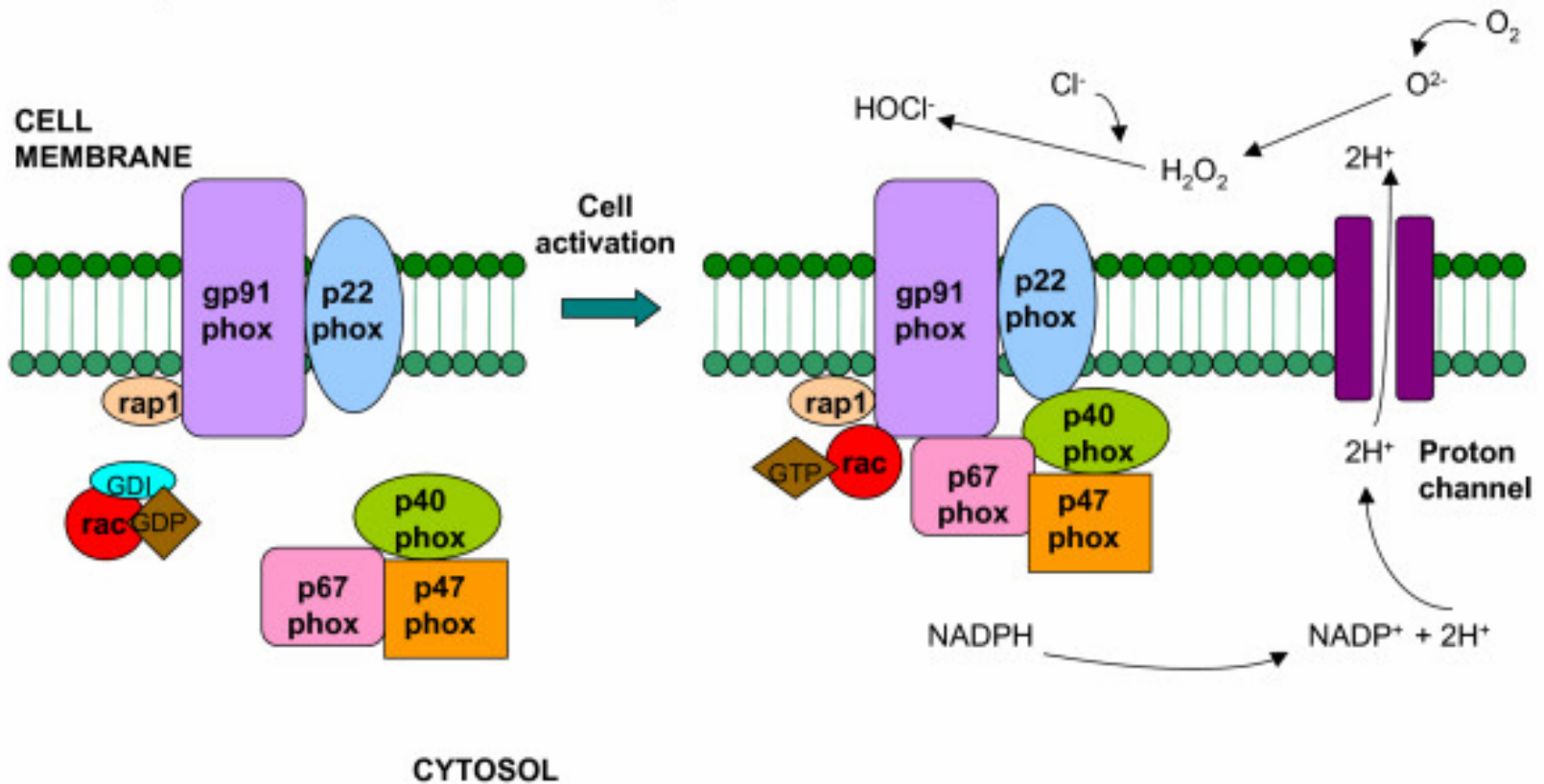


- 1** Chemotaxis and adherence of microbe to phagocyte.
- 2** Ingestion of microbe by phagocyte.
- 3** Formation of a phagosome.
- 4** Fusion of the phagosome with a lysosome to form a phagolysosome.
- 5** Digestion of ingested microbe by enzymes.
- 6** Formation of residual body containing indigestible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

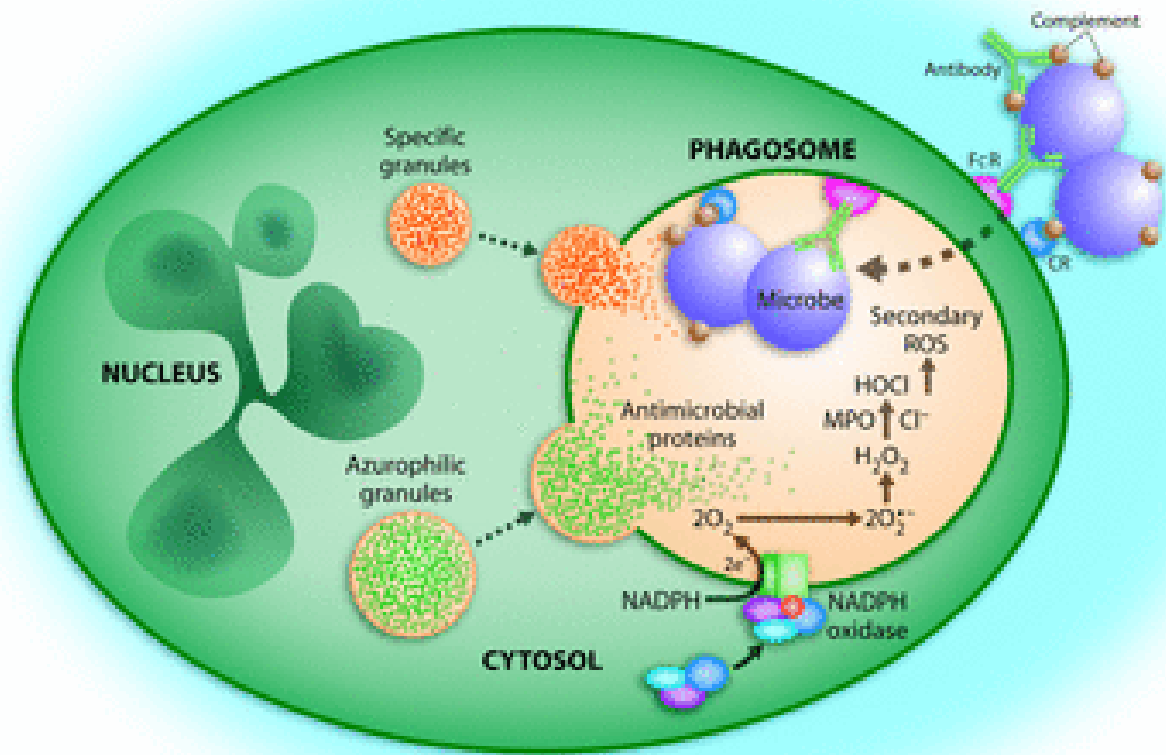
(a) Phases of phagocytosis

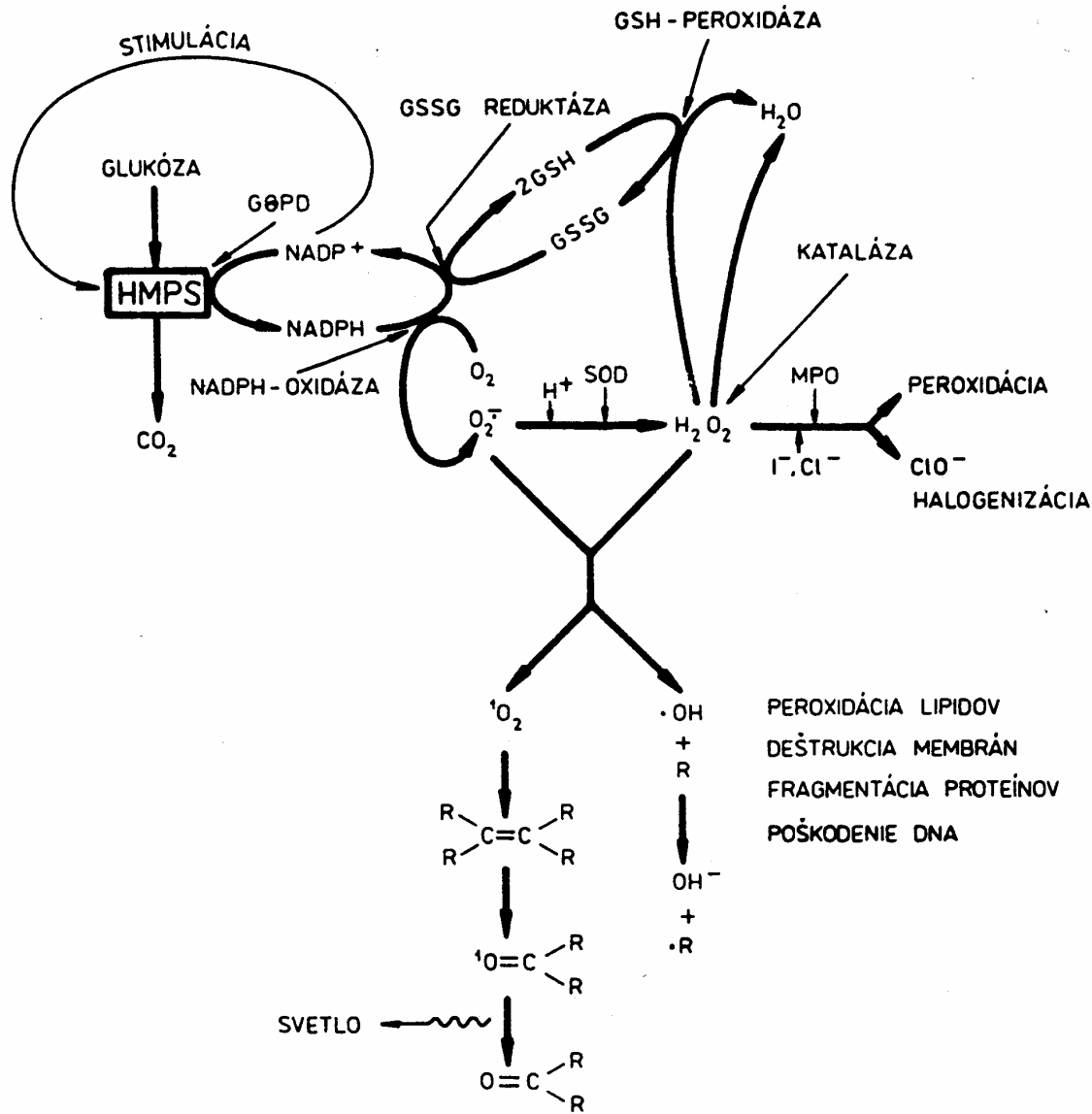
Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

NADPH OXIDASE ACTIVATION



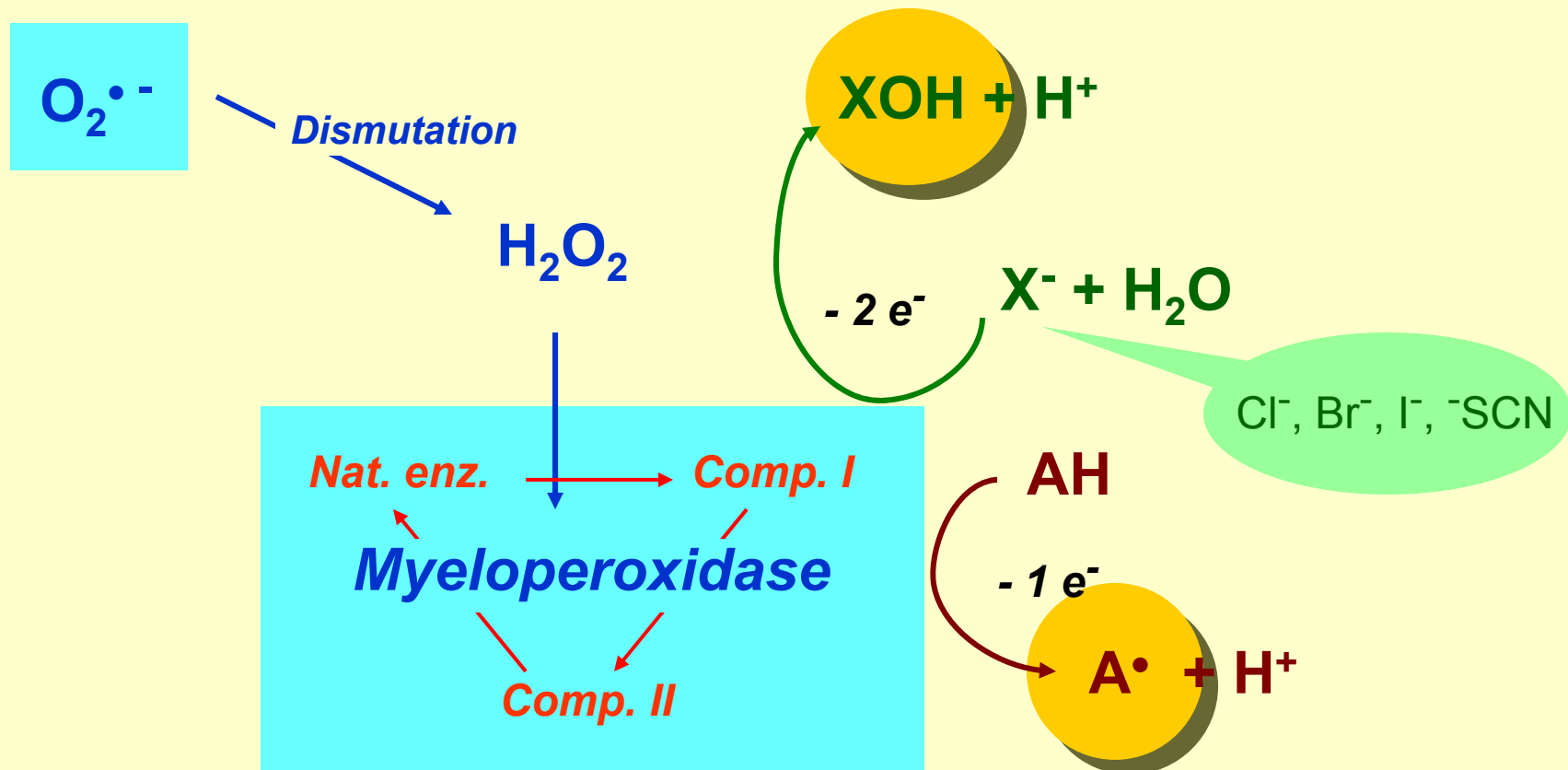
Schematic representation of the NADPH oxidase enzyme. The integral membrane of the phagocyte consists of two subunits: p22phox and gp91phox which respectively produce the smaller and larger chain of the cytochrome-b558. Two cytosolic subunits: p67phox and p47phox; a p40phox accessory protein and a Rac-GTP 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.





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, $O_2^{\cdot-}$ -- superoxidový aniónový radikál, $\cdot OH$ -- hydroxylový radikál, 1O_2 -- 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^+

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).

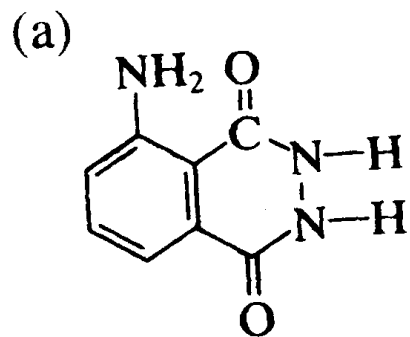
Následně jsou pomocí speciálního přístroje analyzována paramagnetická spektra.

Luminometrické metody

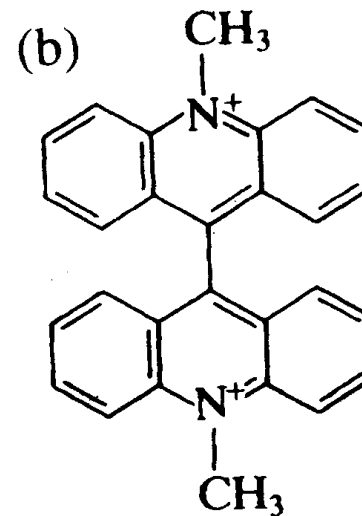
Luminometrické próby (luminofory) jsou oxidovány RMK
Při návratu do základního energetického stavu emitují fotony.
Jejich detekce je možná pomocí luminometrů nebo scintilačních
spektrofotometrů.

Nejčastěji používané luminofory:

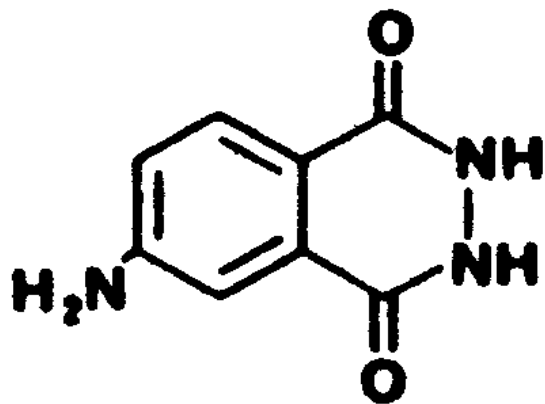
- Luminol
- Lucigenin
- Izoluminol
- Pholasin



luminol



lucigenin

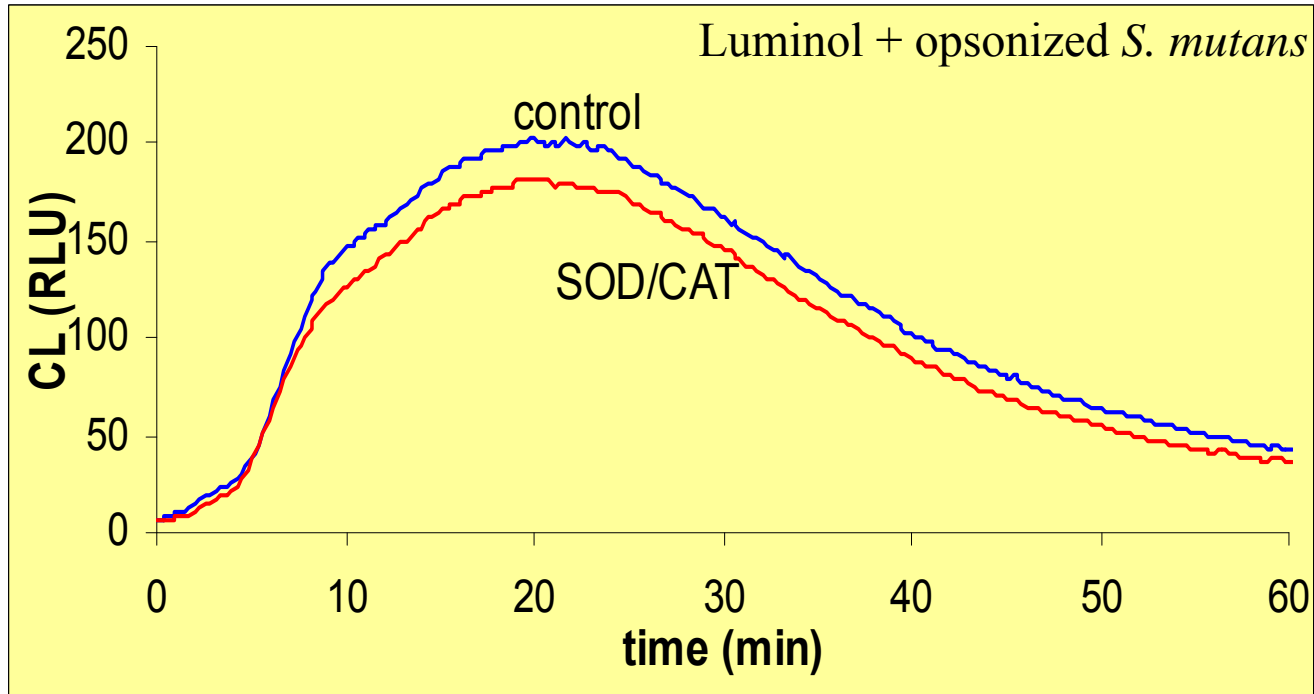
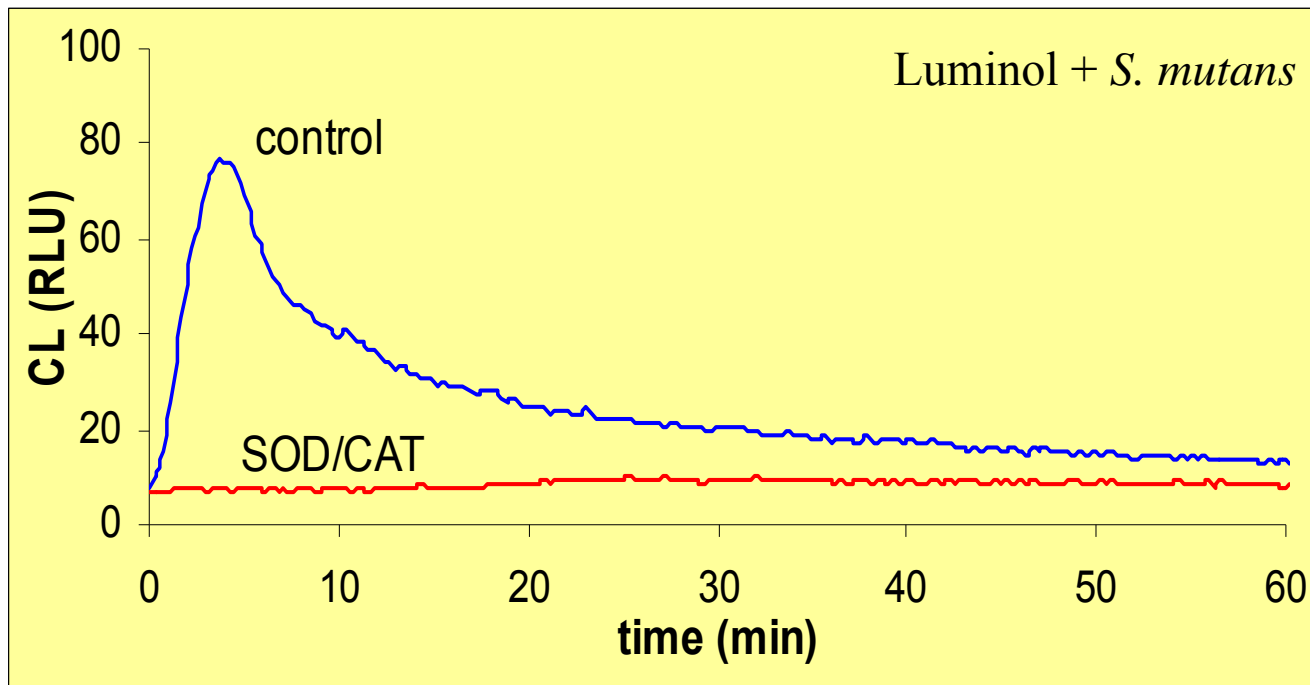


Izoluminol

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:

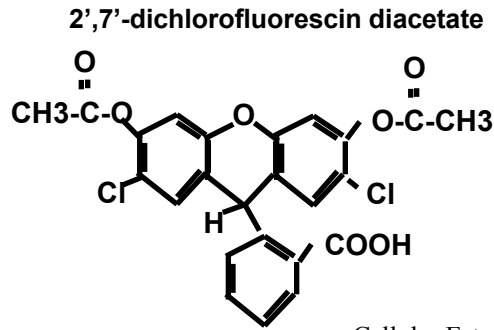
- fluorimetru
- fluorescenčního mikroskopu
- konfokálního mikroskopu
- **flow cytometru**

Výhody detekce pomocí flow cytometru

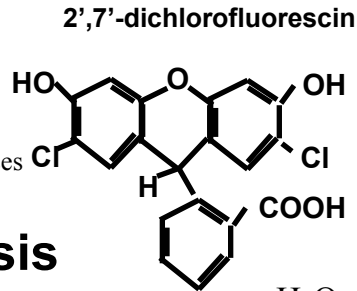
- analýza velkého počtu buněk v krátkém čase (1000 buněk/sec)
- možnost současného hodnocení více buněčných populací v jednom vzorku

Příkladem **fluorescenčních prób** jsou:

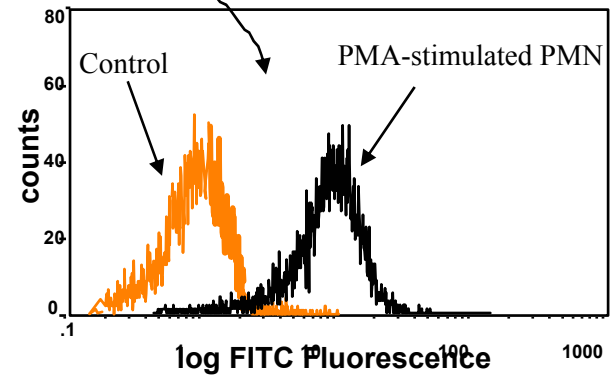
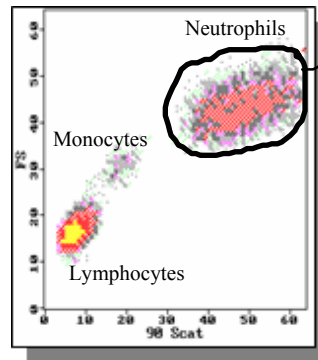
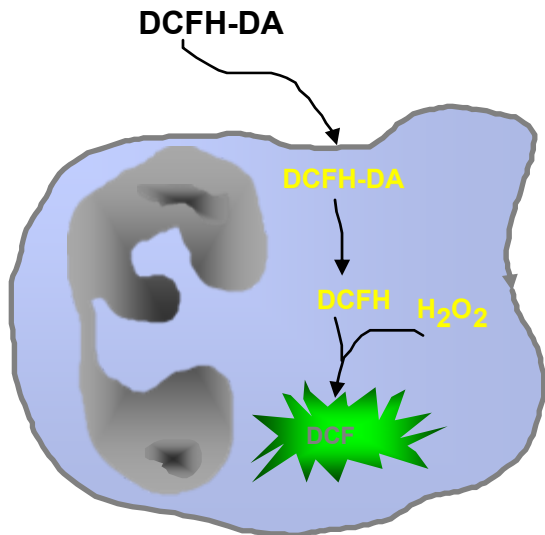
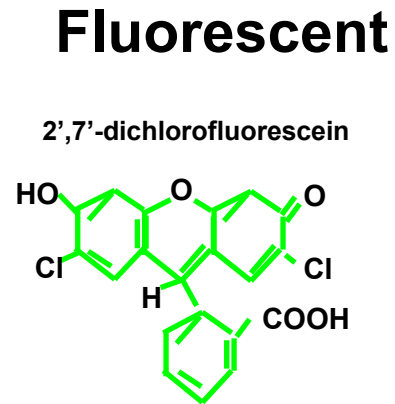
dichlorofluorescin diacetate, dihydrorhodamin 123 nebo **hydroethidin**



Cellular Esterases
Hydrolysis



H_2O_2
Oxidation



Detekce NO

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