

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv.Anny v Brně

LABORATORNÍ VYŠETŘOVÁNÍ FAGOCYTÓZY CHEMILUMINISCENCÍ
Bakalářská práce
v oboru zdravotní laborant

Vedoucí práce:
prof. MUDr. Jindřich Lokaj, CSc.

Autor:
Hana Vaculíková

Brno, duben 2009

Jméno a příjmení autora: Hana Vaculíková

Název bakalářské práce: Laboratorní vyšetřování fagocytózy chemiluminiscencí
Laboratory investigation of phagocytosis by
chemiluminescence

Pracoviště: Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN U sv.Anny v Brně

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Jindřich Lokaj, CSc.

Rok obhajoby bakalářské práce: 2009

Klíčová slova: fagocytóza, respirační vzplanutí, chemiluminiscence, polymyxin, colistin

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
prof. MUDr. Jindřicha Lokaje, CSc. a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a
odborné zdroje.

V Brně dne.....

K vypracování mé bakalářské práce přispěli velkým dílem a mé poděkování tímto patří především prof. MUDr. Jindřichu Lokajovi, CSc. za pomoc, odborné rady a trpělivost i celému Ústavu klinické imunologie a alergologie LF MU a FN U sv. Anny v Brně za poskytnutí optimálních studijních a pracovních podmínek.

OBSAH:

1. ABSTRAKT.....	8
ABSTRACT.....	9
2. ÚVOD.....	10
3. LITERÁRNÍ ZPRACOVÁNÍ TÉMATIKY.....	11
3.1. <i>IMUNITNÍ SYTÉM</i>	11
3.1.1. Vrozené mechanismy.....	11
3.1.2. Specifické mechanismy.....	11
3.2. <i>FAGOCYTÓZA</i>	12
3.2.1. Základní typy fagocytárních buněk.....	12
3.3. <i>PRŮBĚH FAGOCYTÓZY</i>	13
3.4. <i>PORUCHY FAGOCYTÓZY</i>	16
3.4.1. Primární imunodeficiencie fagocytů.....	16
3.4.2. Sekundární imunodeficiencie fagocytů.....	17
3.5. <i>OXIDATIVNÍ METABOLISMUS</i>	18
3.6. <i>MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY</i>	22
3.6.1. Hodnocení funkční kapacity fagocytujících buněk.....	22
3.6.2. Vyšetření funkce.....	22
3.6.2.1. Chemiluminiscence.....	24
3.6.3. Porovnání jednotlivých metodických postupů.....	25
3.6.4. Indikace k vyšetření oxidačního metabolismu.....	26
3.6.5. Rozmezí normálních hodnot.....	27
4. CÍLE PRÁCE.....	28
5. METODICKÁ ČÁST.....	29
5.1. <i>MATERIÁL</i>	29
5.1.1. Biologický materiál.....	29
5.1.2. Chemikálie.....	29
5.1.3. Příprava pufrů a ostatních roztoků.....	30
5.1.4. Reakce.....	31
5.2. <i>METODIKA</i>	32
5.2.1. Detekce metabolické aktivity fagocytů chemiluminiscenční metodou.....	32
5.3. <i>VÝSLEDKY</i>	34
5.3.1. Chemiluminiscence při použití zymosanu a opsonizovaného zymosanu.....	34

5.3.2. Chemiluminiscence při použití zymosan, opsonizovaného zymosan a PMA...35	
5.3.3. Vliv polymyxinu B a endotoxinu na chemiluminiscenci při použití luminolu.....36	
5.3.4. Vliv polymyxinu B, colistinu a endotoxinu na chemiluminiscenci při použití luminolu37	
6. ZÁVĚRY.....38	
7. POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA.....39	

POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

APC	buňka předkládající antigen (antigen-presenting cell)
BPI	baktericidní a permeabilitu zvyšující protein (bactericidal permeability increasing protein)
CGD	chronická granulomatózní choroba
fMLP	formyl-methionylleucylalanin (chemotaktický peptid)
IL-8	interleukin 8
LAD	deficience adhesivity leukocytů (leukocyte adhesion deficiency)
LTB ₄	leukotrien B ₄
MCP-1	membránový kofaktorový protein (membrane cofactor protein)
MIP-1 α a β	chemotaktický faktor pro monocyty (macrophage inflammatory protein)
NADP	nikotinamidadeninukleotid fosfát
NK buňky	přirození zabíječi (natural killers)
PAF	faktor aktivující krevní destičky (platelet activating factor)
RAN-TES	chemotaktický faktor (chemokin)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SOD	superoxiddismutáza

1. ABSTRAKT

Profesionální fagocyty patří k základním strukturálním a funkčním složkám imunitního systému a proto musí být vyšetření fagocytózy součástí spektra metod klinické laboratorní imunologie.

Chemiluminiscence je metodou, která díky svému širokému uplatnění budí pozornost nejen klinické, ale také experimentální imunologie. Její samotný princip je založen na skutečnosti, že fagocyty reagují na různé podněty membrány (např. při fagocytóze) tzv. respiračním vzplanutím, které je spojeno se vznikem peroxidu vodíku, superoxidových radikálů a singletového kyslíku. Biologicky aktivní kyslíkové produkty reagují s excitabilními substráty v buňce a přitom dochází k uvolňování světelných kvant. K amplifikaci přirozené chemiluminiscence se používají tzv. luminofory, nejčastěji luminol. Excitované světlo se deteguje chemiluminometricky.

Cílem této práce bylo popsat chemiluminiscenční test s plnou krví a dále zpracovat výsledky vlivu lokálně podávaných antibiotik (polymyxin B, colistin) na chemiluminiscenční aktivitu lidských leukocytů krve v podmínkách in vitro.

ABSTRACT

Professional phagocytes are among the basic structural and functional components of the immunity system. For this reason phagocytosis testing is necessarily to be a part of the methods of clinical laboratory immunology.

Due to a wide range of use, chemiluminescence is a method which attracts attention not only of clinical but also of experimental immunology. Its very principle is based on the fact that phagocytes react on various stimuli of their membranes (e.g. when phagocytosing) by respiratory inflammation, during which hydrogen peroxide, superoxide radicals and singlet oxygen are produced. As biologically active products of oxygen react with excitable substrates in cell, quanta of light are emitted. To amplify natural chemiluminescence it is possible to use luminophores, mainly luminol. Excited light can be detected luminoletrically.

The aim of this thesis was to describe a chemoluminescence test with a full blood sample and further to analyse the consequences of the influence which locally administered antibiotics have on chemoluminescent activity of human blood leukocytes under in vitro conditions.

2. ÚVOD

Profesionální fagocyty patří k základním strukturám a funkčním složkám imunitního systému a představují klíčový obranný mechanismus proti mikrobiálním patogenům. Jsou to právě neutrofilové, které jako první infiltrují po infekci zánětlivou oblast, uvolňují mediátory zánětu a tím se podílí na dalším průběhu zánětlivé reakce. Pro usnadnění fagocytózy bývají mikroorganismy opsonizovány sérovými imunoglobuliny nebo složkami komplementu a následně adherují na specifické povrchové receptory fagocytů a jsou uzavřeny uvnitř fagosomu, který poté fúzuje s lyzosomy. Tím je zahájen proces odbourávání a zabíjení bakterií mnoha enzymatickými i neenzymatickými mechanismy, z nichž mezi nejvýznamnější bezesporu patří schopnost fagocytů reagovat tzv. „respiračním vzplanutím“ - intenzivním, rychlým a krátkou dobu trvajícím zvýšením konzumace kyslíku, tvorby superoxidového anionu, resp. reaktivních kyslíkových meziproductů. K vyšetření této aktivity fagocytů se využívá celá řada testů, z nichž můžeme uvést testy redukce tetrazoliových solí (NBT- a INT-test), testy flow- cytometrické („burst- test“) a testy chemiluminiscence.

Chemiluminiscence má v tomto smyslu široké uplatnění, zachycuje totiž nejen poruchy v NADPH oxidázovém systému spojené s chronickou granulomatózou, ale také poruchy v systému myeloperoxidázovém spojené s deficiencí myeloperoxidázy. Je založena právě na principu respiračního vzplanutí, při kterém vznikají elektronově excitované stavy, které při návratu do základního stavu emitují fotony.

Kromě lékařské praxe se tato metoda uplatňuje i v základním biomedicínském výzkumu, neboť se dá velmi dobře a elegantně využít při studiu defektů procesu opsonizace, exprese povrchových antigenů, vlivu složek bakteriálních buněčných stěn, endotoxinů nebo virových kapsidů, ale umožňuje například i studovat vliv antimikrobiálních přípravků a léčiv na fagocytární aktivitu leukocytů.

3. LITERÁRNÍ ZPRACOVÁNÍ

3.1. IMUNITNÍ SYSTÉM

Imunitní systém je jedním ze základních homeostatických mechanismů našeho těla. Rozpoznává vnější škodliviny, především patogenní mikroorganismy, vnitřní škodliviny, tj. průběžně odstraňuje staré, poškozené nebo zmutované buňky a zároveň udržuje toleranci vůči vlastním tkáním. Složky imunity se rozdělují na humorální a buněčné. Podle způsobu rozpoznávání cizorodých struktur a schopnosti vytvoření imunologické paměti rozlišujeme imunitu vrozenou (přírozenou, nespecifickou) a získanou (adaptivní, specifickou).

3.1.1. Vrozené, přírozené imunologické mechanismy

Tyto mechanismy jsou přítomny u všech mnohobuněčných organismů a tvoří je jednak složka buněčná (fagocytující buňky, přírodně cytotoxické buňky tzv. NK buňky), jednak humorální (komplementový systém, interferony). Nemají imunologickou paměť, tudíž nejsou ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou a jejich reakce probíhá velmi rychle, uvádí se asi do 96 hodin. Kromě toho se na obraně organismu podílí i neimunitní mechanismy, které dělíme na mechanické (např. anatomické bariéry, pohyb řasinek) a chemické (např. enzymy ve slinách, slzách a potu, mastné kyseliny na kůži).

3.1.2. Specifické (adaptivní) mechanismy

Tyto mechanismy jsou evolučně mladší, objevují se až na úrovni obratlovců, jsou antigenně specifické a jsou aktivovány až po setkání s daným antigenem. Opět je můžeme rozdělit na složku humorální (lymfocyty B, protilátky) a buněčnou (založenou hlavně na T-lymfocytech). Jejich reakce probíhá pomaleji, řádově několik dní až týdnů a je pro ně charakteristická imunologická paměť.

Imunitních reakcí se účastní i buňky, které přímo nepatří do složek imunitního systému. Příkladem jsou erytrocyty (podílejí se na vychytávání komplexů antigenu a protilátky) a trombocyty (účastní se zánětlivých a alergických reakcí). Také fibroblasty, endotelie a epitelie produkují některé cytokiny a exprimují po aktivaci adhezivní molekuly, které usnadňují průnik bílých krvinek do tkání (Bartůňková, Paulík, 2005).

3.2 FAGOCYTÓZA

Fagocytóza je evolučně velmi starý děj podobný pohlcování potravních částic amébami (Hořejší, Bartůňková, 2005). Je to schopnost profesionálních fagocytujících buněk (neutrofilních a eozinofilních leukocytů, monocytů a makrofágů) vyhledat, pohltit, usmrtit a rozložit mikroorganismy, stárnoucí a poškozené buňky a jiný cizorodý materiál. O jejím významu pro člověka svědčí i fakt, že její hlubší vrozené defekty jsou neslučitelné se životem.

Fagocytující buňky mají schopnost identifikovat škodliviny pomocí membránových receptorů, které se buď váží přímo na struktury cizorodé částice (např. Toll-like receptory, lektinové receptory) nebo nepřímo za pomoci komplementu či protilátek (receptor pro Fc část protilátky, CR, FcR).

Konečnou eliminaci pohlcené škodliviny provedou buňky pomocí velkého množství enzymů, které obsahují ve svých granulech.

3.2.1. Základní typy fagocytárních buněk

U vyšších organismů se vydělila populace buněk, které zabezpečují obranyschopnost organismu právě mechanismem fagocytózy. Tyto buňky jsou nazývány profesionálními fagocyty (neutrofilní granulocyty, monocyty). Jde o základní buňky nespecifické imunity a ústřední buňky zánětlivé reakce (Hořejší, Bartůňková, 2005).

Kromě vlastní fagocytózy a eliminace mikroorganismů mají fagocyty i důležitou úlohu regulační, jsou totiž významnými producenty cytokinů, důležitým zdrojem lokální produkce složek komplementu (C3) a některé z nich jsou antigen prezentujícími buňkami (APC= antigen-presenting cell). Při zánětlivé reakci uvolňují fagocyty mediátory zánětu- produkty metabolismu kyseliny arachidonové, tj. prostaglandiny, leukotrieny a tromboxany. Tyto látky spolu s cytokiny stimulují specifické složky imunity a zpětně regulují rozsah zánětlivé reakce (Bartůňková, Paulík, 2005).

- **Neutrofilní granulocyty**- jsou početně největší populací leukocytů (40-60%), vznikají z myeloidní linie a jejich životnost po terminální diferenciaci v kostní dřeni je krátká. Ve svých granulech obsahují celou řadu biologicky aktivních látek. Jejich působení je však nespecifické, takže při jejich aktivaci a uvolnění dochází i k poškození vlastní tkáně. Granula jsou tří typů a dělíme je na primární (azurofilní), sekundární a terciární. Mají hlavní úlohu v obraně proti extracelulárním mikrobům, jako jsou především stafylokoky, pneumokoky, streptokoky i některé plísně.

- **Monocyty a makrofágy**- monocyty vznikají z myeloidní linie, cirkulují v krvi a poté se přeměňují na svou tkáňovou formu, kterou označujeme jako makrofág. Monocyty se mohou také diferencovat v dendritické buňky. Mají dlouhou životnost a proces fagocytózy mohou několikrát opakovat. Při jejich aktivaci dochází k produkci cytokinů a ty se pak dále podílí na aktivaci složek specifické imunity a celkové reakci organismu na škodlivý podnět. Tento systém má zásadní roli při zpracování a předkládání antigenů lymfocytům. Jako profesionální fagocyty se uplatňují především u infekcí vyvolaných fakultativně intracelulárními bakteriemi, např. mykobakteriemi.

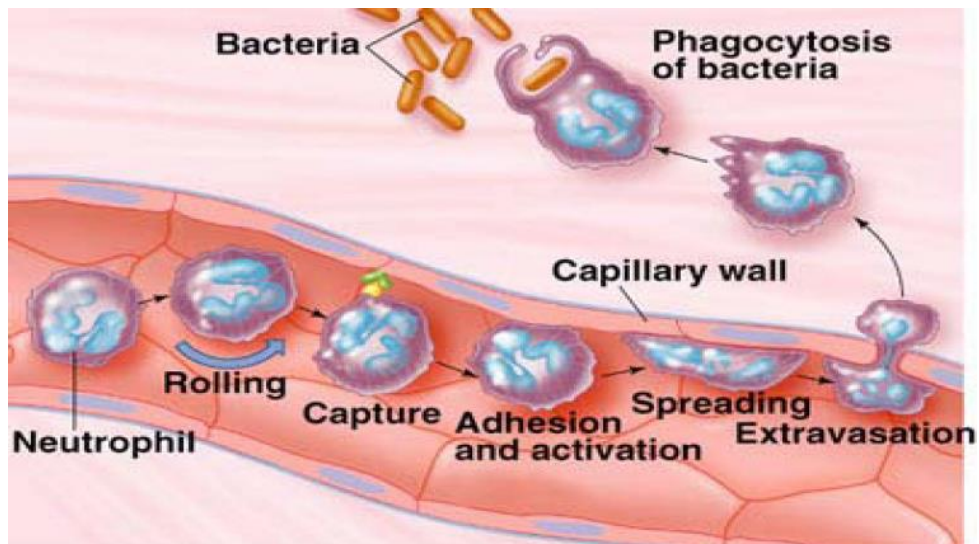
3.3. PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

Fagocytóza je složitý mnohastupňový děj, který orientačně dělíme do několika fází. Je pro ni charakteristické spektrum mezibuněčných interakcí zajištěných cytokiny i přímým kontaktem membránových molekul.

Adheze, extravazace a chemotaxe

V periferní krvi existují dva fondy neutrofilů, mezi nimiž probíhá neustálá výměna: centrální fond cirkulující v axiálním proudu krevního řečiště a marginální fond pohybující se pomalu podél endotelu. Jednou z prvních událostí při akutním zánětu je zvýšení adherence cirkulujících neutrofilů k endotelu cév (Stites, Terr, 1994).

Tato adherence na povrch endoteliálních buněk cév je první fází fagocytózy. Dochází k ní proto, že zanícené tkáně exprimují pod vlivem zánětlivých cytokinů některé adhezivní molekuly, jako např. selektiny, které jsou fagocyty rozeznávány. Adherované fagocyty potom prostupují mezi endoteliálními buňkami do tkáně, což označujeme jako diapedézu nebo extravazaci (Obr 1 a 2). Jejich další pohyb přímo do místa poškození je řízen chemotakticky látkami, které se tu uvolňují. Tyto chemotaktické faktory řídí pohyb buněk ve směru chemotaktického gradientu. Hlavní chemotaktickou látkou pro neutrofilů je cytokin (chemokin) interleukin 8 (IL-8). Pro monocyty a eozinofily jsou důležité jiné chemokiny (MIP-1 α a β , MCP-1 a RAN-TES). Dalšími společnými chemotaktickými látkami jsou komplementové fragmenty C3a a C5a, leukotrien B₄ (LTB₄), faktor aktivující destičky (PAF) a chemotaktické peptidy pocházející z bakteriálních proteinů, z nichž nejznámější je tzv. fMLP (formyl- metionylleucinphenylalanin)(Hořejší, Bartůňková, 2005).



Obrázek č.1: Diapedéza neutrofilů a následná fagocytóza (Odd.buněčné a mol.imunologie 3.LF UK)

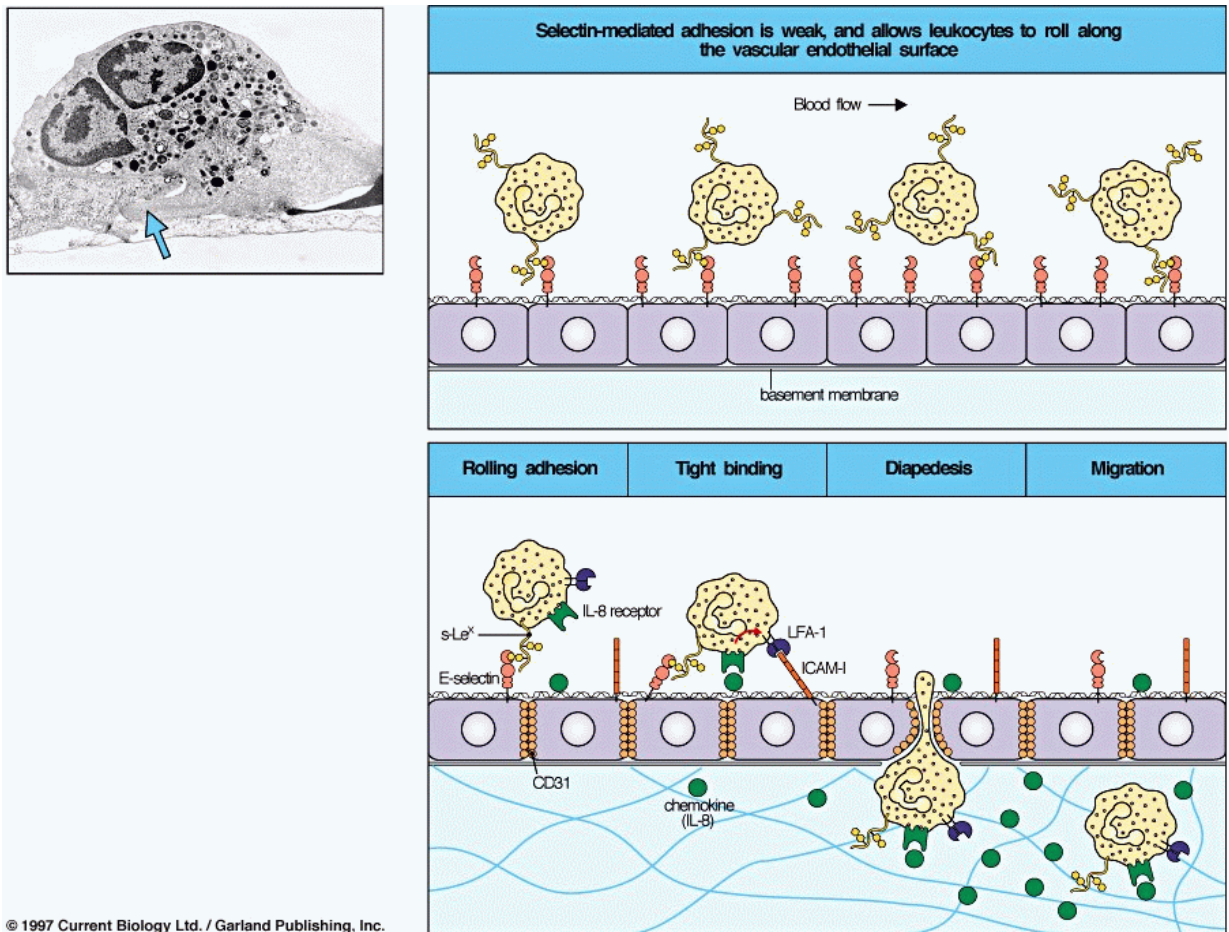
Opsonizace, ingesce a tvorba fagosomu

Pro usnadnění fagocytózy bývají mikroorganismy povlékány specifickou protilátkou nebo komplementem (opsonizace), a poté usmrcovány kombinovaným účinkem oxidantů vytvořených neutrofilem a cytotoxických proteinů z jeho cytoplazmatických granul (Stites, Terr, 1994).

Opsonizace je závislá na spolupůsobení protilátek, složek komplementu a jiných sérových proteinů. Protilátky vázané na mikroorganismus jsou rozeznávány Fc-receptory fagocytů. Na povrchu mikroorganismů dochází také k aktivaci komplementového systému, což vede k usazování fragmentů komplementových proteinů, a to zvláště fragmentů proteinu C3. Ty jsou rozeznávány komplementovými receptory. Protilátky a komplementové fragmenty tak působí jako opsoniny, které označují částici jako cizorodou a činí ji tak pro fagocyt „chutnější“ (Hořejší, Bartůňková, 2005).

K nejvýznamnějším opsoninům obecně patří specifické protilátky (zvláště tříd IgG a IgM), dále je to sérový lektin vážící manózu, fibronectin, fibrinogen, C- reaktivní protein a sérový amyloid P. Tyto proteiny se označují také jako proteiny akutní fáze.

Opsonizující látky umožňují přilnutí pohlcované látky na povrch fagocytu a tím zvyšují účinnost ingesce. Dochází při ní k pohlcování částic větších než 0,5 μm . Fagocyt cizorodou částici obklopí pseudopodiemi, která poté na svých distálních koncích splynou a dochází tak k tvorbě endocytárního vezikulu, který označujeme jako fagosom. Tvorba fagosomu je mj.závislá na intracelulárním přeskupení kontraktilních proteinů (mikrofilamentový a mikrotubulový systém). Tyto děje, jakož i děje, které následují, jsou iniciovány a řízeny signály poskytovanými povrchovými receptory fagocytů (Hořejší, Bartůňková, 2005).



Obrázek č.2 Chemotaxe leukocytů (podle: Janeway C.A. et al., Immunobiology, 4th ed., 1999, p.378)

Tvorba fagolysosomu, cidie a nitrobuňečný rozklad

Nitrobuňečná degranulace, „vnitřní trávení“, není jednorázovým procesem, neboť azurofilní a specifická granula uvolňují svůj obsah během fagocytózy různou rychlostí. Proces degranulace neutrofilu spočívá v uvolnění obsahu granula do nově vytvořeného fagolysosomu (Stites, Terr, 1994).

Baktericidní látky obsažené v granulech (např. defensiny), hydrolytické enzymy (např. lysozym) napadají pohlcené mikroorganismy, usmrcují je a rozkládají. Dochází ke vzniku silně kyselého prostředí.

Pro fagocyty je typické, že se u nich uplatňují dva mikrobicidní systémy:

- **mechanismy na kyslíku nezávislé**- souvisí s působením biologicky aktivních látek obsažených v cytoplazmatických granulích (např. baktericidní permeabilitu zvyšující protein =BPI, defensiny, serinové proteázy).

- **mechanismy na kyslíku závislé**- dochází k tvorbě biologicky velmi aktivních kyslíkových mediátorů. Tyto reakce jsou spjaty s prudkým vzestupem spotřeby kyslíku v buňce, což označujeme jako tzv. respirační vzplanutí.

3.4. PORUCHY FAGOCYTÓZY

Jako imunodeficience označujeme stavy, kdy vlivem určité příčiny není imunitní systém jedince stoprocentně funkční a tento jedinec je pak náchylnější k infekčním onemocněním. Podle příčiny je dělíme na primární a sekundární. U primárních imunodeficiencí jsou příčinou mutace genů, které se určitým způsobem podílejí na funkci imunitního systému. Na rozdíl od sekundárních imunodeficiencí, které jsou získané v průběhu života jedince a jsou důsledkem působení vnějších nebo vnitřních faktorů, je u primárních imunodeficiencí příčina přítomná už od samého počátku a závisí jen na charakteru onemocnění, kdy a jak se projeví.

3.4.1. Primární imunodeficience fagocytů

Poruchy fagocytózy postihují hlavně neutrofilů a monocytů s makrofágy. Příčinou těchto poruch může být nedostatečný počet neutrofilů nebo jejich defektní funkce. Mezi klinické projevy poruch fagocytózy patří pyogenní infekce kůže, sliznic a vnitřních orgánů vyvolanými stafylokoky, enterobakteriemi, plísněmi a mykobakteriemi.

Poruchy v počtu neutrofilů

Kostmannův syndrom

Molekulová příčina onemocnění spočívá v mutaci genu kódujícího neutrofilní elastázy. Projevy onemocnění zahrnují záněty kůže a sliznic, objevující se již krátce po narození.

Cyklická neutropenie

Pro onemocnění je charakteristicky cyklický pokles granulocytů, nejčastěji v intervalu tří týdnů.

Poruchy ve funkcích fagocytujících buněk

Chronická granulomatózní choroba (CGD)

Většinou jde o formu onemocnění vázanou na chromosom X, při němž neutrofilů a monocytů postižených dětí nejsou schopny usmrcovat bakterie a plísně, což se projevuje

těžko léčitelnými a neustále se opakujícími infekcemi. Tyto infekce mohou postihnout kteroukoliv tkáň nebo orgán, nejčastěji to bývá kůže, plíce, lymfatické uzliny, játra a kosti.

Nemoc je způsobena mutacemi genů kódujících jednotlivé složky NADPH-oxidázy. Dochází k defektu v tvorbě kyslíkových radikálů, který vede jednak ke snížené baktericidní schopnosti, ale také k dysfunkci některých lysozomálních degradačních enzymů, což vede k omezené schopnosti likvidovat fagocytovaný materiál. V důsledku toho se tvoří granulomy (ohraničená místa infekce kulovitého tvaru), které jsou pro toto onemocnění charakteristické a daly mu jméno.

U pacientů s autosomálně recesivní formou onemocnění je možné částečně stimulovat tvorbu ROS pomocí interferonu γ . Kvalita života pacientů s tímto onemocněním se výrazně zlepšila poté, co byla objevena podstata nemoci a zavedena rychlá diagnostika. V léčbě této choroby se používají antibiotika, interferon γ , u těžkých forem se provádí transplantace kostní dřeně.

LAD syndrom

U tohoto onemocnění na povrchu neutrofilů chybí nebo jsou v nedostateční míře přítomny adhezivní molekuly z rodiny integrinů, což způsobuje poruchu jejich adhezivity. Důsledkem je neschopnost přilnout k endoteliím, opustit krevní řečiště a migrovat do místa zánětu. V periferní krvi pacientů najdeme vysoký počet kolujících neutrofilů, ale v místě zánětu jich je nedostatek.

3.4.2. Sekundární imunodeficience

Sekundární netropeni

Příčinou mohou být poruchy tvorby myeloidních buněk v kostní dřeni, ale mohou mít i periferní příčinu způsobenou působením autoprotilátek nebo vychytáváním ve zvětšené slezině.

3.5. OXIDATIVNÍ METABOLISMUS

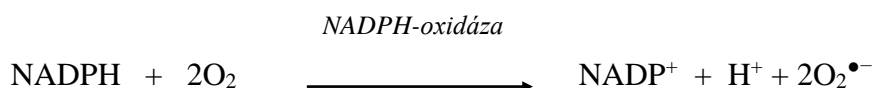
Volné kyslíkové radikály tvořené neutrofilny jsou důležitými mikrobicidními látkami a mají přinejmenším stejný význam jako mediátory uvolňované při zánětu a poškození tkání (Stites, Terr, 1994).

Tyto látky pohotově reagují s různými biologickými strukturami a díky tomu mají důležitou úlohu v přenosu energie, faktorech imunitní ochrany a signálních molekul buněčné regulace.

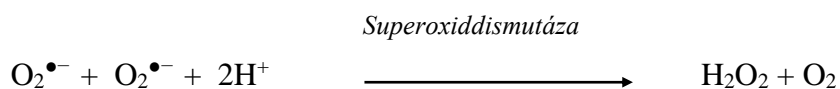
Tabulka č.1: Reaktivní formy kyslíku a dusíku (Štípek a kol., 2000)

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
superoxid, O ₂ [•]	peroxid vodíku, H ₂ O ₂
hydroxylový radikál, HO [•]	kyselina chlorná, HOCl
peroxyl, ROO [•]	ozon, O ₃
alkoxyl, RO [•]	singletový kyslík, ¹ O ₂
hydroperoxyl, HO ₂ [•]	
REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU	
<i>Volné radikály</i>	<i>Látky, které nejsou volnými radikály</i>
oxid dusnatý, NO [•]	nitrosyl, NO ⁺
oxid susičitý, NO ₂ [•]	nitroxid, NO
	kyselina dusitá, HNO ₂
	oxid dusitý, N ₂ O ₃
	oxid dusičitý, N ₂ O ₄
	nitronium, NO ₂ ⁺
	peroxynitrit, ONOO
	alkylperoxynitrit, ROONO

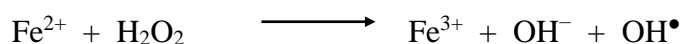
Jak již bylo řečeno výše, reaktivní formy kyslíku se uplatňují v konečné fázi fagocytózy při odstraňování zbytků mrtvých buněk a při zabíjení bakterií. Plazmatická membrána neutrofilních leukocytů a makrofágů je vybavena enzymovým komplexem- NADPH-oxidázou, která obsahuje flavocytochrom b558. Tento komplex je aktivován např. interakcí Fc-receptorů s opsonizovanými částicemi, v nestimulovaných buňkách je enzym nefunkční a jednotlivé komponenty jsou volně rozprostřeny. Po pohlcení infekčního agens dochází k aktivaci tohoto komplexu, což má za následek redukci dioxygeny na superoxid a tím se zvýší spotřeba O₂, což označujeme jako respirační vzplanutí. Donorem elektronů je NADPH, který se pak regeneruje při oxidaci glukózy v pentózovém cyklu. Proto při respiračním vzplanutí zaznamenáme i vzestup oxidace glukózy. Superoxid se mění rychle na peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Ve fagosomu vzniká kyselé prostředí, které podporuje uvolňování iontů železa pro Fentonovu reakci a tvorbu hydroxylového radikálu. Tento proces můžeme vyjádřit pomocí chemických reakcí takto:



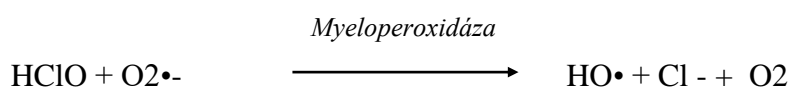
Superoxid se mění působením superoxididismutázy SOD na peroxid vodíku.



Fentonovou reakcí vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál, který je extrémně silným oxidačním činidlem a okamžitě reaguje s okolními biomolekulami.



Neutrofilní granulocyty syntetizují pomocí myeloperoxidázy kyselinu chlornou, která je silným antioxidantem.



Část chlornanových aniontů (ClO^-) reaguje s nízkomolekulárními aminy za vzniku chloraminů, které mají spolu s ROS silný mikrobicidní účinek.

Kromě kyslíku se při zánětlivém procesu uplatňuje i oxid dusnatý. Efekt RNS se projevuje s větší časovou prodlevou než je tomu u ROS, zato má však delší dobu trvání. Oxid dusnatý i spolu s jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami a patří k významným signalizačním molekulám.

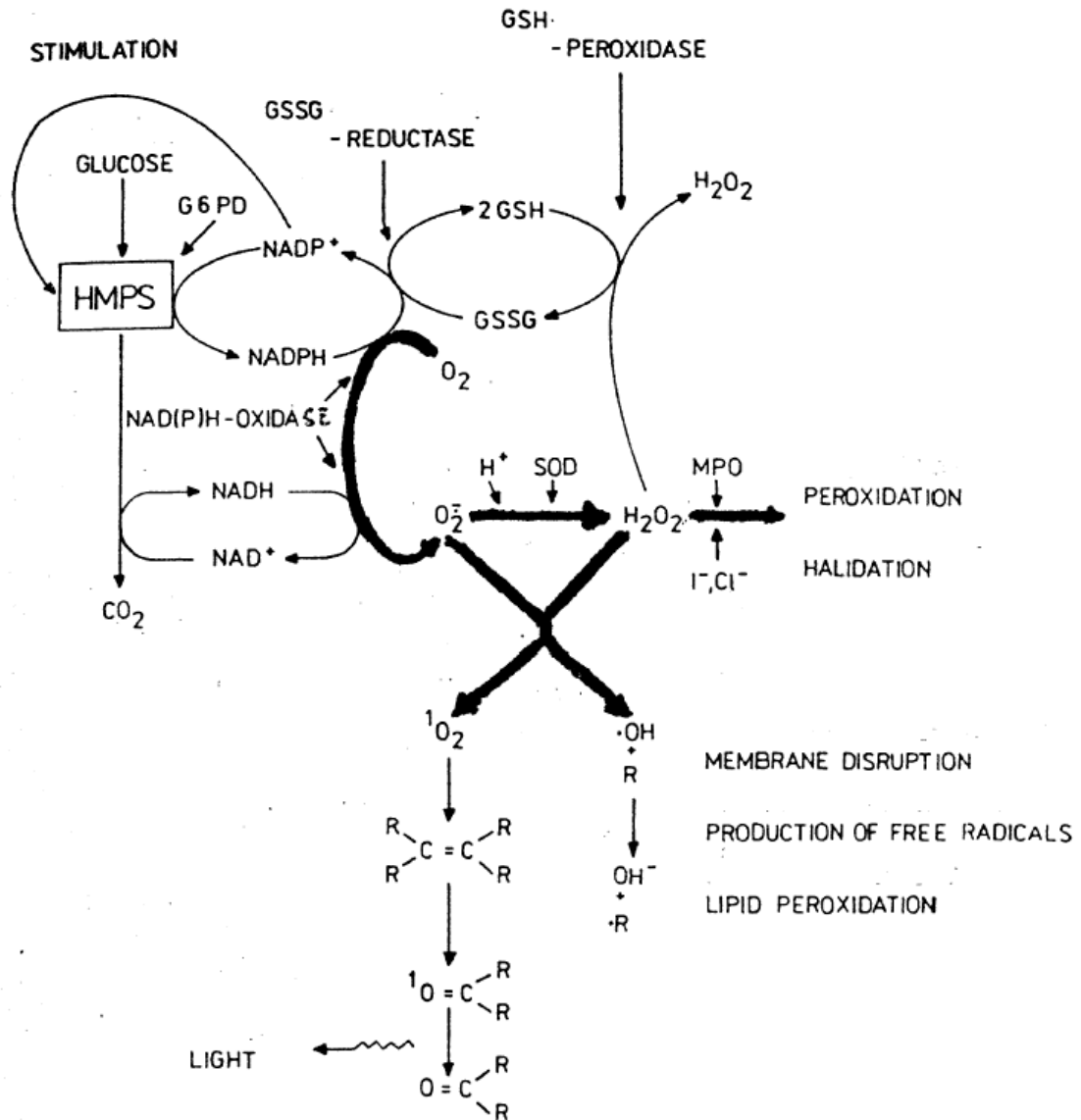
Indukovatelná forma NO-syntázy není specifická pro makrofágy, ale najdeme ji i v jiných buňkách, jako např. buňkách hladkého svalstva. Uvolňovaný NO^{\bullet} stimuluje vazodilataci, což je typické pro zánětem zasaženou tkáň a navíc se podílí na zneškodnění intracelulárně přežívajících patogenů. Interaguje se superoxidem za vzniku peroxynitritu, který oxiduje sulfhydrylové skupiny a je pro buňky vysoce toxický. NO^{\bullet} dále přímo reaguje se sulfhydrylovými skupinami aminokyselin a peptidů za vzniku S-nitrosothiolů. Interakce NO^{\bullet} s trioly ovlivňuje mechanismy koagulace a fibrinolýzy a je spojena s antimikrobními účinky (Štípek a kol., 2000).

Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou tedy při zánětu organismu důležitou součástí mikrobicidních mechanismů fagocytů a účastní se aktivace tvorby prozánětlivých cytokinů. Pokud ale dojde ke zvýšené lokální tvorbě reaktivních forem kyslíku, mohou způsobit nejen destrukci mikrobů, ale i vlastní tkáň. Systémová nadprodukce oxidu dusnatého pak může vést až k septickému šoku.

Při uvolňování ROS dochází ke vzniku elektronově excitovaných stavů, při jejichž návratu do základního stavu dochází k emisi fotonů a tento jev označujeme jako spontánní chemiluminiscenci.

Tabulka č.2: Tvorba toxických oxidantů ve fagolysosomech leukocytů při respiračním vzplanutí (Stites, Terr, 1994)

I. Tvorba superoxidového anionu účinkem NADPH-oxidázy	
Glukóza + NADP ⁺	→ Pentózofosfát + NADPH ² <small>hexózomonofosfátová zkratková dráha</small>
NADPH + O ₂	→ NADP ⁺ + O ₂ ⁻ <small>NADPH-oxidáza</small>
II. Spontánní tvorba toxických kyslíkových radikálů	
2O ₂ ⁻ + 2H ⁺	→ H ₂ O ₂ + ¹ O ₂
O ₂ ⁻ + H ₂ O ₂	→ .OH + OH ⁻ + ¹ O ₂
III. Tvorba halogenačních činidel účinkem peroxidázy	
H ₂ O ₂ + Cl ⁻	→ OCl ⁻ + H ₂ O <small>peroxidáza</small>
OCl ⁻ + H ₂ O	→ ¹ O ₂ + Cl ⁻ + H ₂ O



Obrázek č.3: Schéma respiračního vzplanutí fagocytů a tvorby toxických forem kyslíku

HMPS- hexose monophosphate shunt, G6PD- glukose-6-phosphate dehydrogenase, GSSG and GSH- reduced and oxidized forms of glutathione, NADPH and NADP⁺ - reduced and oxidized forms of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, SOD- superoxide, O₂⁻ -superoxide anionic radical, ·OH- hydroxyl radical, ¹O₂- singlet oxygen, MPO- myeloperoxidase, SOD- superoxididismutase (Upraveno podle Frenčíka, 2000)

3.6. MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY

3.6.1. Hodnocení počtu fagocytujících buněk

Mezi základní vyšetření spojené s fagocytózou patří stanovení počtu buněk schopných fagocytózy (tj. neutrofilních granulocytů), což lze určit buď z diferenciálního krevního obrazu nebo průkazem specifických membránových znaků (CD15 pro neutrofilní granulocyty a CD14 pro monocyty). Jejich výrazné opakované snížení, často spojené s jiným onemocněním, opravňuje k diagnostice poruchy fagocytózy.

3.6.2. Vyšetření funkce

Za určitých klinických okolností je vhodné provést i vyšetření vztahující se k funkční kapacitě neutrofilních granulocytů. Jedná se o primární defekty fagocytózy, jako např. porucha adheze, chemotaxe, ingesce a respiračního vzplanutí. Jako zdroj buněk používáme plnou krev. Vyšetření jednotlivých stádií fagocytózy shrnuje následující tabulka.

Tabulka č.3: Funkční vyšetření neutrofilních granulocytů (Litzman a spol., 2007)

FUNKCE	TEST	PORUCHA
ADHEZE	Expres CD11/ CD18	LAD1 syndrom
CHEMOTAXE	Migrace pod agarózou	Poruchy jsou poměrně vzácné; transientní jsou u infekcí, popálenin, traumatu
INGESCE	Oponizace a pohlčení částic (metakrylátové partikule, mikroorganismy)	Projeví se u poruch opsonizace
RESPIRAČNÍ VZPLANUTÍ	NBT Chemiluminiscence Burst test	Defektní u chronické granulomatózní choroby (CGD); transientní porucha u infekcí, traumatu, malnutrice
CELÝ PROCES FAGOCYTÓZY- USMRCENÍ MIKROORGANISMŮ	Mikrobicidní test	Upozorní na poruchu některého z kroků fagocytózy

Stanovení exprese povrchových antigenů (CD11/CD18) vede k odhalení deficiencí leukocytárních adhezních molekul LAD (leukocyte adhesion deficiency). Vyšetření provádíme pomocí průtokového cytometru a monoklonálních protilátek.

Chemotaxe je základní vlastností fagocytů, která jim umožňuje migrovat do místa zánětu. In vitro ji testujeme pod agarózou. Do gelu se vytvoří jamky, z nichž do jedné umístíme suspenzi granulocytů a do druhé chemotaktickou látku. Po příslušném časovém intervalu

změříme vzdálenost, kterou buňky urazí od středu jamky, do níž byly umístěny. Test hodnotí stimulovanou chemotaktickou aktivitu i spontánní pohyblivost buněk.

Pro hodnocení ingesce a závislost na opsonizaci lze použít několik substrátů. Nejpřirozenější jsou bakterie, ale v laboratořích se většinou používají jako substrát mikrosférické hydrofilní partikule- MSHP, které mají hydrofilní charakter s nízkým negativním nábojem. Tím je značně omezena nespecifická adherence k buněčným povrchům a další výhodou je i nízký sklon ke spontánní agregaci při dlouhodobém skladování. Test probíhá tak, že suspenzi částic inkubujeme s plnou krví 1 hodinu při 37°C za stálého třepání. Poté zhotovíme nátěr, který se fixuje, obarví a odečítá. Ze 100 hodnocených buněk označujeme jako pozitivní ty, které obsahují 3 a více pohlcené partikule. Tento parametr označujeme jako fagocytární aktivitu, pojmem fagocytární index vyjadřuje počet pohlcených částic na 1 buňku.

Baktericidní test se dá použít jako screeningová metoda, protože zahrnuje všechny fáze fagocytárního děje a upozorní tedy na poruchu některého z jednotlivých kroků fagocytózy nebo jejich kombinace. Buňky se zde inkubují za přítomnosti séra, které je zdrojem opsonizačních látek, s živými mikroorganismy (*C. albicans*, *S.aureus*, *E.coli*). Hodnocení provádíme různě podle použitého substrátu. Jednou možností je stanovit počet přežívajících mikrobů vyočkováním na živnou půdu, druhá možnost je pak mikroskopické hodnocení po vitálním barvení trypanovou modří (obarví se usmrcené mikroorganismy).

S mikrobicidní schopností fagocytů významně koreluje tzv. respirační vzplanutí, které vyhodnocujeme pomocí testů redukce tetrazoliových solí, burst testu a chemiluminiscence.

K testům redukce tetrazoliových solí se používá dvou substrátů- nitroblue- tetrazolium chlorid (NBT) a jodonitrotetrazolium (INT). Tyto testy jsou založeny na schopnosti redukovat bezbarvé tetrazoliové soli na barevný formazan, který se ukládá ve formě krystalů v cytoplazmě granulocytů. Test lze hodnotit jednak mikroskopicky, kdy je výsledek vyjádřen jako procento pozitivních buněk, nebo přesněji fotometricky po provedené extrakci formazanu. V případě poruch v oxidačních mechanismech je test nulový či negativní. V současné době je doporučeno ověřit a zpřesnit výsledek testu dalšími testy, např. chemiluminiscencí.

K testům založeným na měření pomocí průtokového cytometru patří tzv.burst test. Využívá se oxidační redukce dihydrorhodaminu 123 (DHR) na rhodamin 123 po stimulaci buněk PMA a při fagocytóze *E coli*. Stanovuje se jak procento buněk produkujících oxidativní radikály, tak jejich střední fluorescenční aktivita.

3.6.2.1. Chemiluminiscence

V roce 1972 popsal Allen se svými spolupracovníky chemiluminiscenci u neutrofilů periferní krve. Poprvé byla měřena pomocí scintilačního counteru, ovšem tato metoda vyžadovala relativně velké množství buněk a chemiluminiscence byla závislá na interakci fagocytovaných částic s dalšími komponentami v médiu. Použití vhodného zesilovače chemiluminiscence, jako je luminol, umožnilo používání mnohem menšího objemu krve k vyšetření a toto vyšetření se velmi rychle stalo metodou volby pro screening defektů v oxidačním metabolismu neutrofilů, jako např. chronická granulomatózní choroba. Luminol je pravděpodobně oxidován některými reaktivními částicemi kyslíku tvořenými během respiračního vzplanutí a výsledkem je excitovaný aminoftalátový anion jehož přechod do základního stavu je spojen s tvorbou světla.

Samotný princip vyšetření spočívá v tom, že fagocyty reagují na podnět oxidačním vzplanutím, které je charakterizováno vznikem peroxidu vodíku, superoxidových radikálů a singletového kyslíku. Tento singletový kyslík je velmi nestabilní a reaktivní, dochází proto k reakci v lyzosomech bakterií a vznikají elektronově nestabilní karboxylové skupiny, které při návratu do základního stavu emitují fotony. Chemiluminiscence se vyvolává přidáním stimulu, který aktivuje fagocyty. Používá se buď phorbol-myristát-acetát (PMA), který přímou aktivací proteinkinázy C aktivuje NADPH oxidázu, nebo korpuskulární stimula, jako např. zymosan nebo mikroorganismy. K indukci tvorby světla a k jeho zesílení se využívá chemikálie luminol. V přítomnosti produktů respiračního vzplanutí je každá jeho molekula konvertována na aminoftalovou kyselinu za uvolnění dusíku a fotonů s maximální vlnovou délkou 430 nm.

Vzorky se vyšetřují nejméně v dubletu. Vyšetřuje se jednak spontánní aktivita chemiluminiscence, jednak aktivita stimulovaná příslušným stimulem. Intenzita chemiluminiscence se pak vyhodnocuje na chemiluminiscenčním přístroji. Mezi nejdůležitější a nejčastěji hodnocené ukazatele oxidačního vzplanutí patří vrchol CL odpovědi a čas potřebný k jeho dosažení (Bartůňková, Paulík, 2005).

Krev musí být zpracována do dvou hodin po odběru a za fyziologické teploty, tj. v temperovaném luminometru při 37°C, protože při nižší teplotě dochází k podstatně slabší aktivaci fagocytů vyjádřené jako chemiluminiscence.

Metoda je kvantitativní, je měřena celková hodnota chemiluminiscence a proto je třeba brát v úvahu množství granulocytů. Pokud se test provádí z plné krve, mohou být vysoké hodnoty způsobené leukocytózou, nízké hodnoty pak neutropenií. Analýza krevního obrazu

s diferenciálním rozpočtem nebo vyšetření z definované koncentrace granulocytů je tedy součástí vyšetření (Bartůňková, Paulík, 2005).

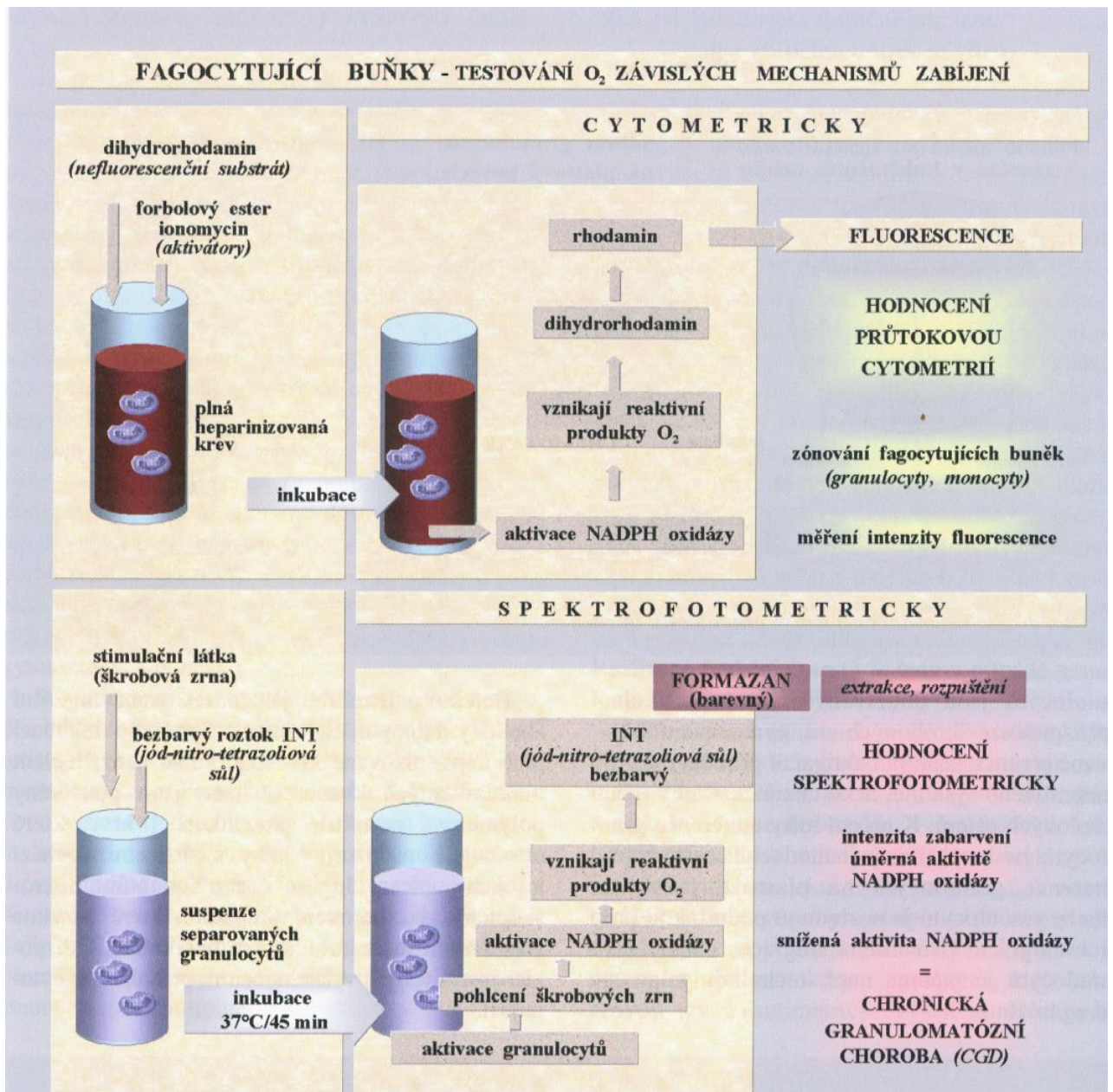
Díky tomu, že tato metoda zachycuje nejen poruchy v NADPH oxidázovém systému spojené s chronickou granulomatózou, ale také poruchy v systému myeloperoxidázovém spojené s deficiencí myeloperoxidázy, našla široké uplatnění nejen v lékařské praxi, ale i v základním biomedicínckém výzkumu, kde se používá např. ke studiu vlivu endotoxinů nebo virových kapsidů, ale umožňuje například stanovit i vliv antimikrobiálních přípravků a léčiv na fagocytární aktivitu. Je také důležité zmínit, že u dialyzovaných pacientů v důsledku opakované stimulace neutrofilů na dialyzačních membránách, jsou hodnoty chemiluminiscence obvykle vyšší ve všech parametrech než u zdravých osob.

Srovnání flow-cytometrického a spektrofotometrického testu k vyšetřování respiračního vzplanutí fagocytů je uvedeno na obrázku č.4, převzatého z monografie Krejska a Kopeckého.

3.6.4. Porovnání jednotlivých metodických postupů

Z uvedených typů vyšetření je velice oblíbenou metodou hodnocení schopnosti ingesce, ovšem výpovědní hodnota v klinické diagnostice je velmi malá a hodnotit se dá pouze snížení hodnot, které je výrazné až při velmi těžkých stavech, jako je sepse nebo konečná stádia nádorových onemocnění. Proto se uplatňuje především ve výzkumné práci podobně jako baktericidní testy, které jsou náročné a nesnadno standardizovatelné kvůli nutné návaznosti na mikrobiologickou laboratoř.

Naproti tomu velmi levnou a jednoduchou metodou jsou testy oxidačního metabolismu, u kterých je jedinou podmínkou zpracování krve do 2 hodin po odběru, jinak může být výsledkem falešně negativní test. Vyšetření odhalí všechny formy chronické granulomatózní choroby, tj. autozomálně recesivní i vázanou na X-chromozom (defekt ve větší podjednotce cytochromu b), nezachytí však nosiče poruchy. Také test chemiluminiscence je vhodný jak pro diagnostiku chronické granulomatózy, tak i pro určení heterozygotů, kteří mohou mít poloviční hodnotu chemiluminiscence než zdravý jedinec, avšak je zde závislost na mozaice granulocytů a na schopnosti normálních fagocytů produkovat kyslíkové radikály.



Obrázek č.4: Fagocytující buňky- testování O₂ závislých mechanismů zabíjení (Krejsek, Kopecký, 2004)

3.6.5. Indikace k vyšetření oxidačního metabolismu

Indikací k vyšetření je především podezření na chronickou granulomatózní chorobu, která se projevuje uzlinovými syndromy nejasné etiologie a recidivujícími stafylokokovými infekcemi kůže a vnitřních orgánů. V klinickém výzkumu se vyšetření provádí při monitorování stavu fagocytárních funkcí u chorob sekundárně postihujících fagocytární systém jako je dialýza, expozice toxickým látkám, léčba růstovými faktory a podobně.

3.6.6. Rozmezí normálních hodnot

U NBT testu si rozmezí normálních hodnot určují laboratoře jako arbitrální jednotky, nulové hodnoty podporují diagnózu chronické granulomatózy.

Hodnoty chemiluminiscence jsou vždy porovnávány s kontrolou a normální hodnoty stimulované CL jsou 500 CPM jednotek bez omezení věku. Nízké nebo nulové hodnoty CL mají pacienti s chronickou granulomatózou a pacienti s deficiencí myeloperoxidázy (Bartůňková, Paulík, 2005).

4. CÍLE PRÁCE

Mezi nejvýznamnějšími sledovanými parametry fagocytózy, k nimž se obrací pozornost jak klinické, tak experimentální imunologie, je schopnost fagocytů reagovat tzv. „respiračním vzplanutím“- intenzívním, rychlým a krátkou dobu trvajícím zvýšením konzumce kyslíku, tvorby superoxidového anionu, resp. reaktivních kyslíkových meziproduktů. K vyšetření této aktivity fagocytů se využívají testy, založené na redukci tetrazoliových solí (NTB- a INT-test), testy chemiluminiscence a testy flow cytometrické („burst test“).

Cíle práce:

- popsat chemiluminiscenční test s plnou krví a zaměřit se především na využití luminolu, a různých stimulancí (zymosan, opsonizovaný zymosan, formol myristát acetát- PMA)
- zpracovat výsledky vyšetření vlivu lokálně podávaných antibiotik (polymyxin B, colistin) na chemiluminiscenční aktivitu lidských leukocytů krve v podmínkách in vitro.

Jako podklady budou použity pracovní protokoly nepublikovaných experimentů prof. J. Lokaje z ÚKIA LF MU.

5. METODICKÁ ČÁST

5.1. MATERIÁL

Zásobní roztoky, stejně jako koncentrace reagensů a uspořádání testu, byly voleny dle zavedených postupů na Ústavu klinické imunologie a alergologie LF FN u sv. Anny v Brně.

5.1.1. Biologický materiál - krev

Pro všechna měření byla použita plná venózní krev odebraná dobrovolným dárčům do 5 jednotek heparinu na 1 ml.

5.1.2. Chemikálie

- Luminol (3-aminophthalhydrazid)
- PMA
- Endotoxin
- Hanksův roztok
- Zymosan
- Oponizovaný zymosan
- Polymyxin B
- Kolistin
- PBS
- Destilovaná voda
- Fyziologický roztok (NaCl 0,9% w/v)

5.1.3. Příprava reagensí

PBS (Phosphate buffered saline) – fosfátový pufr

- NaCl 4,80g
- Na₂HPO₄ · 2H₂O 7,60g
- KH₂PO₄ 1,45g
- navážená množství chemikálií rozpustíme v 1 l destilované vody
- na úpravu požadovaného pH (7,2) použijeme 1M NaOH nebo 1M HCl

Zymosan (Pure, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) – 1% suspenze

- množství 0,20 g rozpustíme ve 20 ml fyziologického roztoku
- inkubujeme 30 minut ve vodní lázni při 80-90°C
- 2x propereme ve fyziologickém roztoku
- centrifugujeme 5 minut při 1500 rpm
- vzniklý sediment resuspendujeme ve 20 ml fyziologického roztoku
- rozdělíme po 1 ml a uchováváme při -20°C

Senzibilizace zymosanu

- 1,0 ml 1% suspenze zymosanu rozpustíme ve fyziologickém roztoku a centrifugujeme
- k sedimentu přidáme 0,5 ml čerstvého séra pacienta a inkubujeme 30 minut při teplotě 37°C.
- centrifugujeme a sediment resuspendujeme ve 2,0 ml PBS, čímž vznikne 0,5% suspenze

Luminol (Sigma, molekulová hmotnost 117,16)

- roztok Lumac 10⁻³M zředíme v PBS v poměru 1: 4
- získáme roztok o koncentraci 2,5·10⁻⁴ M (250 μM/l)

Endotoxin (Sigma, NO L-2880, E.Coli O55.B5)

- 1mg/ ml ve fyziologickém roztoku

Polymyxin B a colistin (Pfizer)

- zásobní roztoky připraveny ve fyziologickém roztoku

5.1.4. Reakce

- Hanksův roztok 0,5 ml
- Luminol 0,1 ml
- Vzorek krve 0,1 ml
- Inkubace 5 minut při 37°C
- Zymosan (opsonizovaný zymosan, PMA) 0,1 ml
- Měření na luminometru Biolumat

Při studiu účinku endotoxinu a antibiotik byla krev předinkubována 30 minut při 37°C

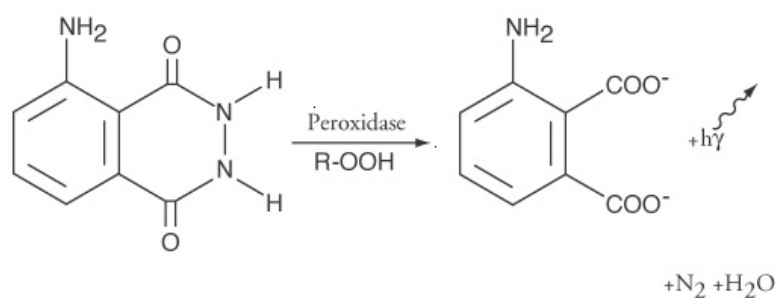
5.2. METODIKA

5.2.1. Detekce metabolické aktivity fagocytů chemiluminiscenční metodou

Chemiluminiscence je světélkování, které doprovází chemické reakce některých látek a vzniká přímou přeměnou chemické energie na světelnou bez současného vzniku tepla .

Princip metody:

Principem metody je skutečnost, že fagocyty reagují na zánětlivý podnět oxidačním vzplanutím, které má za následek vznik peroxidu vodíku, superoxidových radikálů a singletového kyslíku. Jejich elektrony jsou schopny přejít do tzv. excitovaného stavu s vyšší energií, který je ovšem nestabilní a tak velmi rychle dochází k návratu do stavu základního a získaná energie je uvolněna ve formě fotonů.. K indukci tvorby a zesílení signálu pro snazší detekci používáme tzv. luminofory, např. luminol, isoluminol, lucigenin. . Luminol reaguje především s H_2O_2 a pravděpodobně singletovým kyslíkem (1O_2) a jeho CL je závislá na myeloperoxidázové aktivitě. Lucigenin je vysoce specifický pro superoxidový aniont a tudíž odráží aktivitu NADPH-oxidázy. Výsledkem těchto reakcí je emise fotonů, kterou detegujeme na luminometru (Obr. č.5 a 6).



Obrázek č.5: Chemiluminiscence luminolu (<http://www.caymanchem.com/app/template/currents,010.vm/a/z>)

Aktivátory oxidačního vzplanutí

Pro navození oxidačního vzplanutí profesionálních fagocytů se používají následující druhy aktivátorů:

- forbolmyristát acetát (PMA)- proniká přes cytoplazmatickou membránu a aktivuje přímo proteinkinázu C, která následně aktivuje NADPH- oxidázu fosforylací jejích podjednotek

- opsonizovaný zymosan (OZP)- na zymosanové částice je navázán C3b, jehož prostřednictvím se vážou na komplementové receptory fagocytů, čímž se spustí signální dráha, jejímž výsledkem je aktivace proteinkinázy C a následně i NADPH- oxidázy.



Obr.č.6: Luminometr Biolumat LB 3500 (Berthold) použitý při měřeních

5.3. VÝSLEDKY

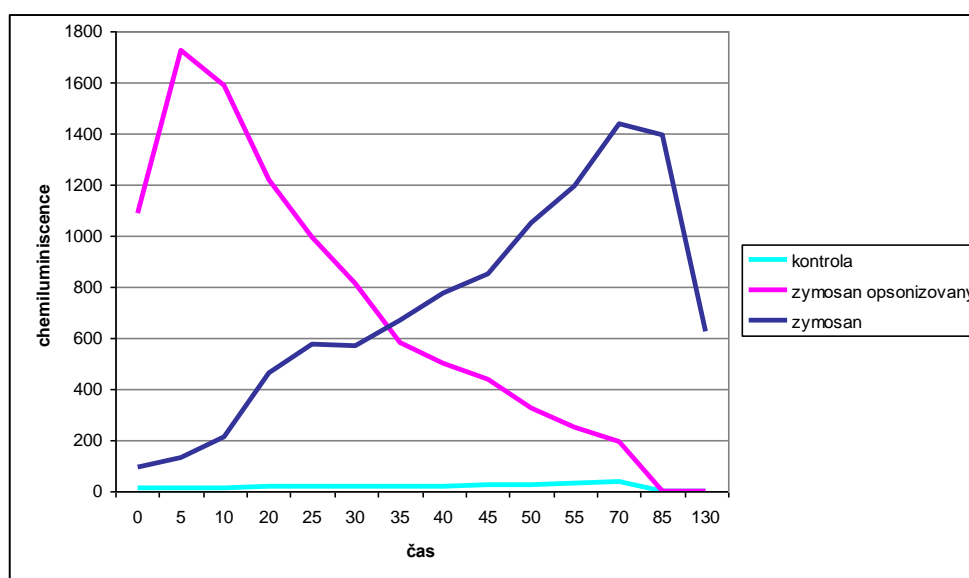
5.3.1. Chemiluminiscence při použití zymosanu a opsonizovaného zymosanu

Z tabulky č.4 a grafu č.1 je zřejmé, že reakce chemiluminiscence u leukocytů plné krve stimulovaných opsonizovaným zymosanem má vyšší intenzitu a probíhá daleko rychleji než u leukocytů stimulovaných samotným zymosanem. Maximální hodnoty chemiluminiscence je v prvním případě dosaženo v prvních pěti minutách a poté následuje rychlý pokles aktivity. Naproti tomu u leukocytů stimulovaných samotným zymosanem vidíme pomalý nárůst chemiluminiscenční aktivity s maximální hodnotou až po 70 minutách a poté strmý pokles aktivity.

Tabulka č.4 (ke grafu č.1)

čas	kontrola	zymosan opsonizovaný	zymosan
0	12,5	1087,5	96,0
5	13,0	1723,5	133,0
10	14,5	1585,5	210,0
20	17,0	1216,5	460,5
25	18,0	993,0	574,5
30	18,0	811,0	568,0
35	19,5	581,5	670,5

čas	kontrola	zymosan opsonizovaný	zymosan
40	21,5	500,5	774,0
45	22,5	437,0	850,5
50	26,0	323,5	1049,0
55	28,5	250,5	1194,5
70	36,0	195,0	1440,5
85	0,0	0,0	1393,5
130	0,0	0,0	625,0



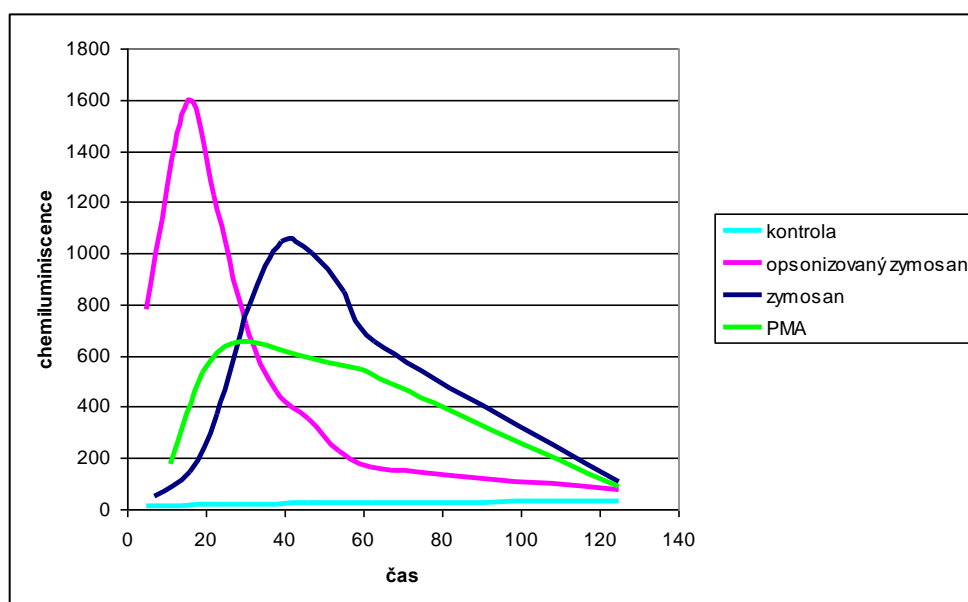
Graf č.1 : Chemiluminiscenční aktivita leukocytů plné krve stimulovaná zymosanem a opsonizovaným zymosanem. Jednotlivé křivky vyjadřují průběh chemiluminiscence (krevní obraz: leukocyty 8,2, segmenty 69%, lymfocyty 26%, monocyty 5%).

5.3.2. Chemiluminiscence při použití zymosanu, opsonizovaného zymosanu a PMA

Následující graf č.2 a tabulka č.5 shrnují výsledky aktivity leukocytů plné krve stimulovaných zymosanem, opsonizovaným zymosanem a PMA. U zymosanu a opsonizovaného zymosanu je průběh křivek podobný jako u grafu č.1. U leukocytů stimulovaných opsonizovaným zymosanem je dosaženo velmi rychle maxima, u leukocytů stimulovaných samotným zymosanem probíhá reakce pomaleji a po dosažení maxima následuje u obou rychlý pokles aktivity. Naproti tomu u leukocytů stimulovaných PMA probíhá reakce o něco pomaleji než za použití opsonizovaného zymosanu, ale po dosažení maximální hodnoty chemiluminiscence následuje pozvolný pokles aktivity.

Tabulka č.5 (ke grafu č.2)

čas	kontrola	čas2	zymosan opsonizovaný	čas3	zymosan	čas4	PMA
5	12,0	5	781,0	7	48,3	11	178,0
14	15,5	15	1583,5	16	143,7	19	534,7
22	16,5	22	1225,5	23	369,7	27	650,7
30	20,5	30	724,0	31	792,3	35	643,0
38	20,0	38	458,5	39	1046,0	43	603,3
46	23,0	46	350,5	47	1003,3	51	575,0
54	24,0	54	224,0	55	851,3	59	545,7
62	26,0	62	162,5	63	655,7	67	490,7
125	32,5	125	75,5	125	107,0	125	87,0



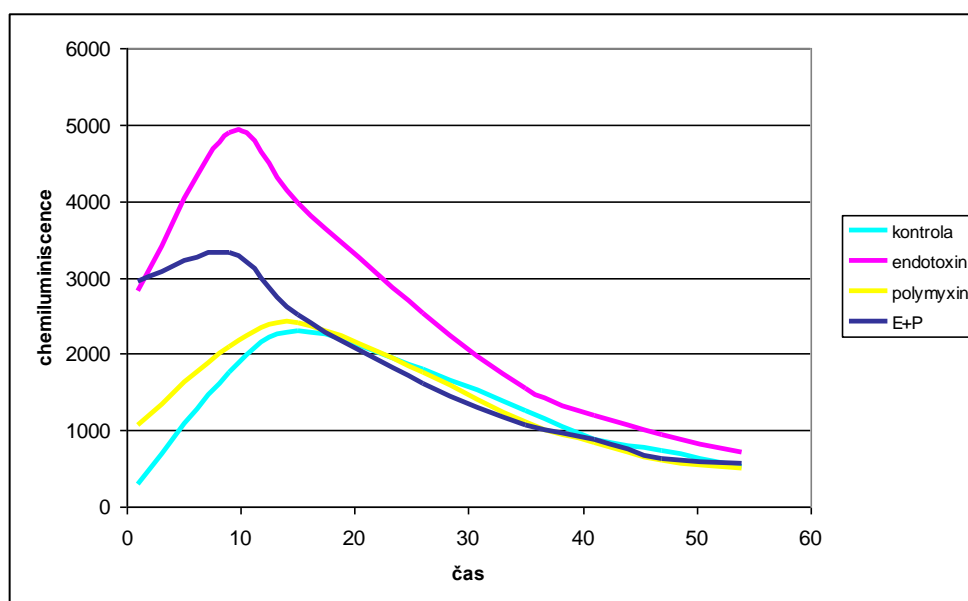
Graf č.2: Chemiluminiscenční aktivita leukocytů plné krve stimulovaná zymosanem, opsonizovaným zymosanem a PMA (0,1 μ g). Jednotlivé křivky vyjadřují průběh chemiluminiscence (krevní obraz: leukocyty 3,7, segmenty 55%, lymfocyty 37%, monocyty 6%).

5.3.3. Vliv polymyxinu B a endotoxinu na chemiluminiscenci při použití luminolu

Následující tabulka č.6 a graf č.3 shrnují hodnoty chemiluminiscence ovlivněné použitím endotoxinu a polymyxinu B. Je zřejmé, že endotoxin chemiluminiscenci výrazně stimuluje a ta dosahuje hodnoty maxima téměř 5000. Polymyxin B chemiluminiscenční aktivitu indukovanou opsonizovaným zymosanem prakticky nemění. Naproti tomu polymyxin zřetelně inhibuje chemiluminiscenční aktivitu indukovanou endotoxinem.

Tabulka č.6 (ke grafu č.3)

čas	kontrola	čas	endotoxin	čas	polymyxin	čas	E+P
1	300,0	2	2832,7	6	1076,3	8	2947,0
9	1760,3	10	4893,7	11	2082,3	12	3325,3
15	2290,7	17	3978,7	18	2409,0	19	2502,0
26	1791,0	27	2529,3	28	1765,0	29	1605,7
35	1246,0	37	1547,0	38	1116,0	40	1061,3
41	879,0	42	1198,3	43	840,3	44	885,3
47	726,0	49	944,3	51	607,3	53	618,7
54	514,3	55	719,3	56	499,0	58	558,3



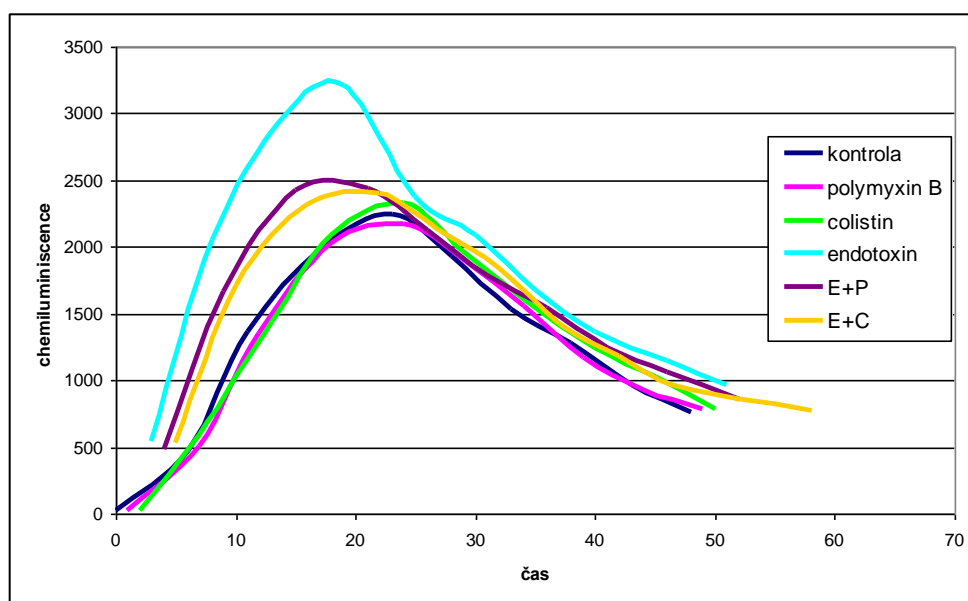
Graf č.3: Vliv endotoxinu a polymyxinu B na chemiluminiscenční aktivitu leukocytů plné krve stimulovaných opsonizovaným zymosanem za použití luminolu. Jednotlivé křivky vyjadřují průběh chemiluminiscence (Plná krev: leukocyty 6,0, segmenty 64%, lymfocyty 36%).

5.3.4. Vliv polymyxinu B, colistinu a endotoxinu na chemiluminiscenci při použití luminolu

V následující tabulce č.7 a grafu č.4 jsou shrnuty výsledky měření chemiluminiscence leukocytů plné krve ovlivněné použitím polymyxinu B, colistinu a endotoxinu. Je zřejmé že za použití endotoxinu nastupuje rychlá reakce s dosažením maximální hodnoty chemiluminiscence 3206. Kombinací endotoxinu s polymyxinem nebo colistinem je průběh obou křivek téměř shodný, ovšem maximální dosažená hodnota chemiluminiscence je výrazně nižší než při použití samotného endotoxinu. Polymyxin a colistin neovlivňují chemiluminiscenční aktivitu při fagocytóze opsonizovaného zymosanu.

Tabulka č.7 (ke grafu č.4)

čas	kontrola	čas	P	čas	C	čas	E	čas	E+P	čas	E+C
0	20,5	1	27,5	2	24,0	3	540,0	4	480,3	5	531,3
6	476,5	7	505,0	7	590,0	8	2050,0	9	1669,7	10	1713,3
11	1361,5	12	1348,0	13	1438,5	14	2964,0	15	2420,0	16	2323,0
17	1973,5	18	2030,0	18	2088,0	19	3206,0	21	2442,3	22	2405,0
23	2242,0	24	2168,5	24	2324,5	25	2381,0	26	2128,0	27	2121,0
28	1935,5	29	1901,0	29	1969,0	30	2093,0	31	1789,7	32	1838,0
33	1538,0	34	1555,0	34	1600,5	35	1676,0	36	1549,7	37	1424,3
38	1275,5	39	1176,0	40	1242,0	40	1362,0	41	1248,0	42	1180,0
43	962,0	44	927,0	45	1031,5	46	1152,0	46	1058,7	47	947,7
48	761,0	49	789,0	50	781,5	51	968,0	52	856,3	58	774,0



Graf č.4: Vliv polymyxinu B, colistinu a endotoxinu na chemiluminiscenční aktivitu leukocytů plné krve stimulovaných opsonizovaným zymosanem za použití luminolu. Jednotlivé křivky vyjadřují průběh chemiluminiscence (Plná krev: leukocyty 3,8, segmenty 62%, lymfocyty 36%, monocyty 2%)

6. ZÁVĚRY

Na možnost vyšetřovat fagocytózu chemiluminiscencí v plné krvi bylo upozorněno již v osmdesátých letech minulého století (Tono-Oka a spol., 1983, Ristola a Repo, 1989, DeChatelet a spol. 1982). Na oddělení klinické imunologie FN v Brně byla již tehdy tato metodika zavedena a využita např. při diagnostice chronické granulomatózy (Staršia a spol., 2007), zůstává však stále využitelná v laboratořích lékařské imunologie.

Z analyzovaných dat je zřejmá především odlišná dynamika luminol-dependentní chemiluminiscence plné krve v závislosti na stimulans: nejrychlejší, s maximem okolo 15 minut je po opsonizovaném zymosanu, nejpomalejší, s maximem okolo 60 minut, je při použití neopsonizovaného zymosanu, solubilní stimulans – PMA - má maximum v období okolo 30 minut. K významné stimulaci luminol-dependentní chemiluminiscence indukované opsonizovaným zymosanem dochází v přítomnosti endotoxinu.

Je známo, že antibiotika ovlivňují nejen mikroorganismy, ale i složky imunitního systému, např. fagocyty (Šoltisová a Lokaj, 1989). Ve své práci jsem se proto zaměřila na studium vlivu antibiotik, která jsou určena pro lokální aplikaci, na fagocytózu lidských leukocytů periferní krve. V praxi se využívá Polymyxin B (v očním lékařství Maxitrol, V ORL Otosporin, v gynekologii Polygynax) a Colistin (např. Colomycin v inhalační i injekční formě).

Z uvedených výsledků je zřejmé, že obě antibiotika neovlivňují chemiluminiscenci krevních leukocytů indukovanou fagocytózou opsonizovaného zymosanu, ale výrazně inhibují chemiluminiscenční aktivitu při fagocytóze v přítomnosti endotoxinu. Lze předpokládat, že tento účinek je způsoben neutralizací endotoxinu polymyxinem a colistinem (Cooperstock a Riedle, 1981), což může antibakteriální účinek těchto antibiotik zesilovat.

7. POUŽITÁ A DOPORUČENÁ LITERATURA

Bartůňková J., Hořejší V., *Základy imunologie*, Triton, 2005, 279s., ISBN 80-7254-686-4

Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv, *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, a.s., 2005, ISBN 80-247-0691-1

Bylund J., Dahlgren C., Karlsson A.: *Measurement of respiratory products generated by professional Phagocytes*. *Methods in Molecular Biology* 2007; 412: 349- 363

Coperstock M., Riegle L.: *Polymyxin B inactivation of lipopolysacharide in vaccines of gram-negative bacteria*. *Infect. Imunity* 1981; 33: 315-318

DeChatelet L.R., Long G.D., Shirley P.S., Bass D.A., Thomas M.J., Henderson F.W., Cohen M.S.: *Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils*. *J. Immunol.* 1982; 129 (4): 1589-1593

Krejsek J., Kopecký O., *Klinická imunologie*, Nukleus HK, 2004, 968s., ISBN 80-86225-50-X

Litzman J., Freiburger T., Král V., Thon V.: *Základy vyšetření v klinické imunologii*, 59s., MU LF, Brno 2007

Lokaj J.: *Vybrané kapitoly z lékařské imunologie pro bakalářský studijní program Zdravotní laborant*

Ristola M., Repo H.: *Luminol-enhanced chemiluminescence of whole blood. Statistical analysis and comparisson of the response of different subjekts*. *APMIS* 1989; 97: 503-512

Staršia A., Ranoušková A., Ferencík M., Kotulová D., Lokaj J., Štefanovič J., Kamenický F.: *Cielené imunologické vyšetřovanie pacienta s chronickou granulomatóznou chorobou a jeho rodiny*. *Praktický lékař* 1984; 64: 786-791

Stites D.P., Terr A.I.: *Základní a klinická imunologie*. ictoria Publishing a.s., 1994, 741s. ISBN 80-85605-37-6

Šoltisová D., Lokaj J.: *Influence of subinhibitory and inhibitory concentrations of antimicrobial agents on the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes*. Acta Veterinaria Brno 1989; 58: 353-362

Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing, 2000, 314s, ISBN 80-7169-704-4

Tono-Oka T., Ueno N., Matsumoto T., Ohkawa M., Matsumoto S.: *Chemiluminescence of whole blood*

1. A simple and rapid Method for the estimation of phagocytic function of granulocytes and opsonic activity i whole blood (Clin Immunol Immunopathol 1983; 26: 66-75)

Tono-Oka T., Matsumoto T., Ueno N., Yashiki N., Matsumoto S.: *Chemiluminescence of whole blood*

2. Application to clinical examination of phagocytic functions of whole blood from various type of disease (Clin Immunol Immunopathol 1983; 29: 333-340)