

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Laboratorní diagnostika poruch fagocytózy

bakalářská práce

Autor práce: Ivona Polívková
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Tinavská, Ph.D.

Datum odevzdání práce: 14. 8. 2013

Abstrakt

Laboratorní diagnostika poruch fagocytózy

Fagocytóza je jeden z nejstarších dějů, podobný pohlcování částic amébami, a patří mezi základní obranné mechanismy imunitního systému při postižení organismu infekcí. Porucha fagocytózy se klinicky manifestuje pod obrazem imunitní nedostatečnosti a může být příčinou velmi závažných onemocnění, jejichž neléčení ústí ve smrt postiženého člověka.

Je to proces, při kterém jsou specializované buňky (makrofágy, dendritické buňky, neutrofilní granulocyty a ostatní fagocytární myeloidní buňky) schopné pohltnout cílové částice, především mikroorganismy, odumřelé buňky a cizí tělesa. Tento proces je klíčový pro udržení homeostázy, kdy dochází po pohlcení mikroorganismů k aktivaci adaptivní imunitní odpovědi, odstranění apoptotických a jinak změněných buněk a nastartování opravných mechanismů u poškozené tkáně. Jedná se o složitý proces, který můžeme rozdělit na několik fází: aktivní pohyb fagocytů do místa zánětu, adherenci, ingesci a intracelulární degradaci, která vede k zabíjení patogenů pomocí mnoha mechanismů. Ty mohou být jednak na kyslíku nezávislé, kde jsou antimikrobiální látky uložené v azurofilních granulích uvolňovány do fagolysozomu, anebo na kyslíku závislé, tzv. oxidační (respirační) vzplanutí, vedoucí k tvorbě biologicky aktivních kyslíkových mediátorů a molekul se značným oxidačním potenciálem.

Defekty postihující fagocytární systém jsou převážně v poruchách počtu či ve funkci neutrofilních granulocytů. Poruchy fagocytózy se projevují infekcemi, způsobenými zejména stafylokoky, enterobakteriemi či plísněmi.

Kostmanův syndrom, neboli těžká kongenitální neutropenie a cyklická neutropenie, patří mezi poruchy fagocytózy, založené na nízkém počtu neutrofilních granulocytů.

K funkčním poruchám fagocytózy patří např. LAD I a LAD II syndrom. Příčinou těchto syndromů je defektní exprese adhezivních molekul, která vede k neschopnosti fagocytárních buněk adherovat a následně pronikat do míst zánětu.

Dalšími poruchami funkce fagocytózy je defekt v enzymatickém systému NADPH oxidázy, která je stěžejnějším enzymem baktericidního mechanismu fagocytů. Tento defekt je příčinou vzácného závažného vrozeného onemocnění, chronické granulomatózní choroby.

Autosomálně recesivní porucha enzymu myeloperoxidáza, který částečně nebo úplně chybí v azurofilních granulích neutrofilů a monocytů, je další a častější poruchou fagocytózy.

K odhalení těchto vzácných a závažných poruch obrany organismu máme celou řadu laboratorních metod, od hodnocení počtu neutrofilů v krevním obraze, po stanovení jejich respirační aktivity pomocí průtokové cytometrie, které jsem v této práci použila. Jedná se o tzv. Burst test, kde se kvantitativně hodnotí respirační vzplanutí granulocytů v heparinizované krvi měřením na průtokovém cytometru. Princip testu spočívá ve využití oxidační redukce dihydrorhodaminu 123 na zeleně fluoreskující rhodamin 123 pomocí peroxidu, hydroxylových radikálů a superoxidových aniontů, vznikajících při aktivaci respiračního vzplanutí

Respirační vzplanutí je jednou z vlastností fagocytárních buněk a je charakterizováno vícestupňovou aktivací NADPH oxidázy, která katalyzuje elektronové snížení molekulárního kyslíku na superoxid. Hraje velmi důležitou roli imunitního systému v obraně organismu, umožňuje usmrtit a degradovat fagocytárním buňkám pohlcené částice a bakterie.

Základním předpokladem správně provedeného funkčního testu respiračního vzplanutí je dodržení předepsané preanalytické fáze, tedy zejména odběr nesrážlivé krve do vhodného antikoagulantu, a času od odběru po zpracování.

V období let 2009 – 2012 jsem vyhodnotila výsledky 611 pacientů, u kterých byl proveden test respiračního vzplanutí na základě požadavku ošetřujícího lékaře. Z celkového počtu vyšetřených pacientů byl jen u 2 pacientů zaznamenán snížený SI za současného výrazného snížení procenta aktivovaných granulocytů. Oba tyto parametry snížené procento aktivovaných granulocytů stimulovaných PMA a *E. coli* a nízký SI ukazoval na možnou závažnou poruchu fagocytózy. V následných testech byl zjištěn defekt enzymu, jenž v rámci imunodeficiencí fagocytózy bývá častější, a který se

v Burst testu projeví právě výrazným snížením SI i procenta aktivovaných granulocytů. Z výsledků je patrné, že závažné primární defekty v mechanismu fagocytózy jsou velmi vzácné a jejich zachycení dochází většinou již v dětském věku, jelikož se jedná o primární imunodeficienci. Proto má toto vyšetření stěžejní význam u dětí s podezřením na imunodeficienci.

Abstract

Laboratory diagnosis of disorders of phagocytosis

Phagocytosis is one of the oldest processes of absorbing particles like amoeba, which is one of the basic mechanisms of the immune system to defend the body against infections. Failure of these processes is clinically manifested like immune deficiency and it can cause a very serious complication which could lead to the death of the patient.

Phagocytosis is performed by specialized cells (macrophages, dendritic cells, neutrophils and other phagocytic myeloid cells) which are able to absorb the target particles, especially microorganisms, dead cells and foreign objects. These processes are essential for stability of homeostasis. Absorption of micro-organisms leads to activation of adaptive immunity response, elimination of apoptotic and destroyed cells and starts the repair processes of damaged tissue. Phagocytosis as a complex process can be divided into several phases: active movement of phagocytes to the inflammation zone, adherence, ingestion and intracellular degradation which leads to the killing of pathogens. There are two mechanisms of killing pathogens. First is independent on oxygen where antimicrobial substances are stored in azurophilic granules which could be released into phagolysosomes. Second mechanism is oxygen-dependent called oxidative (respiratory) burst which leads to the formation of biologically active mediators where oxygen molecules have considerable oxidation potential.

Defects in phagocytic system are mainly caused by low number or malfunction of neutrophils which leads to severe infections mainly caused by staphylococci, Enterobacteriaceae or fungi.

Kostman syndrome, severe congenital neutropenia and cyclic neutropenia are disorders of phagocytosis based on the low number of neutrophil granulocytes.

Among malfunctioning of phagocytosis processes belongs LAD I and LAD II syndrome. The cause of these two syndromes is defect in the expression of adhesion molecules which leads to the inability of phagocytic cells to adhere and then penetrate into the inflammation zone.

The other possible disorder of phagocytic malfunction is defect in enzymes. The NADPH oxidase is necessary for bacterial lyses mechanism of phagocytes and lack of these enzyme caused serious inherit disorder called chronic granulomatous disease.

Lack or completely missing of enzyme myeloperoxidase stored in the azurophilic granules of neutrophils and monocytes is more and more common autosomal recessive disorder of phagocytosis.

In this diploma work I focused on detection of these rare and serious disorders defects using flow cytometry to detect respiratory burst activity of neutrophils in blood samples. This laboratory procedure is called a burst test. In this test we quantitatively evaluate the respiratory burst activity of granulocytes in heparinized blood samples using the flow cytometry. Principle of this method is an oxidation-reduction reaction of dihydrorhodamine 123 to green fluorescent rhodamine 123 using peroxide, hydroxyl radicals and superoxide anions which are activated by respiratory burst.

This process is one of the significant characteristic of phagocytic cells which are characterized by multi-stage activation of NADPH oxidase. This oxidase catalyzes electron reduction of molecular oxygen to superoxide. This step plays a very important role in our immune system and allows to kill and degrade particles and bacteria in phagocyte cells.

Pre-analytical phase is basic for good performing of burst test of neutrophils. It mostly depends on using right anticoagulant, time of taking samples and delivering to the laboratory department.

Since 2009 - 2012 I analyzed the results of 611 patients who were tested for respiratory burst of neutrophils on a request of their physician. Among all of these results we obtain only two positive results of reduction of stimulation index (SI) and significant decrease percentage of activated granulocytes. Both of these parameters: reduced percentage of (activated granulocytes stimulated by PMA and E. coli) and low stimulation index pointing to a potentially serious disorder of phagocytosis mechanism. In specific tests of these cases proved the enzyme defect in phagocytosis mechanism which is the most common disorder in this type of immunodeficiency. These results indicate that the major primary defects of phagocytosis are very rare and their detection is usually in

childhood for suspicion of primary immunodeficiency. This test is very helpful for discovering a prime immunodeficiency.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 8. 2013

.....

Ivona Polívková

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Pavlíně Tinavské, Ph.D., za odborné vedení a poskytnutí důležitých informací při zpracování bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala všem pracovníkům z Imunologického oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. za jejich spolupráci.

Obsah

ÚVOD	13
1. SOUČASNÝ STAV	14
1.1 IMUNITNÍ SYSTÉM	14
1.2 MECHANISMY PŘIROZENÉ IMUNITY.....	14
1.3 SPECIFICKÉ MECHANISMY	15
1.4 FAGOCYTÓZA.....	15
1.4.1 Fagocytyující buňky.....	16
1.4.2 Fáze fagocytózy.....	17
1.4.3 Receptory zapojené ve fagocytóze	18
1.5 RESPIRAČNÍ VZPLANUTÍ	18
1.5.1 Analýza respiračního vzplanutí	19
1.6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE (FACS)	20
1.7 PORUCHY FAGOCYTÓZY	22
1.7.1 Porucha počtu neutrofilů.....	22
1.7.2 Defekt adhezivních molekul	23
1.7.3 Chronická granulomatózní choroba (CGD).....	23
1.7.4 Defekt dalších enzymů	24
1.7.5 Sekundární poruchy fagocytózy	25
1.8 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA PORUCH FAGOCYTÓZY	25
1.8.1 Kvantitativní zastoupení neutrofilních granulocytů	25
1.8.2 Testování schopnosti fagocytyujících buněk pohltit cizorodou částici.....	25
1.8.3 Stanovení míry exprese adhezivních molekul	26
1.8.4 Baktericidní testy	26
1.8.5 Testy oxidačního metabolismu granulocytů	26
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY	29
2.1 CÍLE PRÁCE	29
2.2 HYPOTÉZY.....	29

3. MATERIÁL A METODY	30
3. 1. 1 <i>Materiál</i>	30
3.1.2 <i>Reagencie</i>	30
3.1.3 <i>Příprava reagensů</i>	30
3. 1. 4 <i>Potřebné vybavení</i>	31
3. 2 METODIKA	31
3. 2. 1 <i>Princip metody</i>	31
3. 2. 2 <i>Postup metody</i>	32
4. VÝSLEDKY	36
5. DISKUSE	44
6. ZÁVĚR	47
7. LITERATURA	48
8. KLÍČOVÁ SLOVA	52

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CGD	chronická granulomatózní choroba (chronic granulomatous disease)
DHR	di-hydrorhodamin
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FACS	průtoková cytometrie (fluorescence activated cell scanner)
FSC	forward scatter
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte-colony stimulat_ factor)
LAD	deficit leukocytárních adhezních molekul (leukocyte adhesion deficiency syndrom)
MPO	myeloperoxidáza
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NBT	nitroblue-tetrazolium
NED	naphthylethylenediamin-dihydrochloridem
NO	oxid dusný
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PHPA	p-hydroxyfenyl kyseliny octové
ROOH	hydroxiperoxidáza
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SI	stimulační index
SOD	superoxiddismutáza
SSC	side scatter
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
TLR	toll-like receptor

ÚVOD

Fagocytóza je jeden z nejstarších dějů podobný pohlcování částic améby, který patří mezi základní mechanismy imunitního systému při obraně organismu před infekcí. O významu fagocytózy pro celkovou obranyschopnost člověka svědčí skutečnost, že hlubší vrozené defekty fagocytózy nejsou slučitelné se životem. Fagocytující buňky, zvláště makrofágy a dendritické buňky, mají schopnost identifikovat „nebezpečné vzory“ patogenních mikroorganismů, tzv. PAMP prostřednictvím fylogeneticky původních membránových receptorů. Na přítomnost patogenních mikroorganismů odpovídají tvorbou cytokinů, které modelují komplexní obranný zánět. Fagocytované mikroorganismy jsou usmrcovány a rozkládány biologicky aktivními látkami, jež jsou obsaženy v cytoplazmatických granulích fagocytujících buněk.

Porucha fagocytózy se klinicky manifestuje pod obrazem imunitní nedostatečnosti a může být příčinou velmi závažných onemocnění, které neléčené ústí ve smrt postiženého člověka. Rozlišujeme primární a sekundární poruchy fagocytózy.

Je-li fagocytóza narušena geneticky podmíněným defektem, jedná se o primární poruchu. Sekundární poruchy fagocytózy mohou být zapříčeny širokou paletou vnějších faktorů prostředí, se kterými se jedinec setkává přirozeně nebo jsou součástí např. terapeutických zásahů, a představují drtivou většinu případů poruch této složky vrozené imunity (Krejsek et al., 2004).

Při podezření na primární poruchy fagocytární aktivity je vyšetření fagocytózy metodou první volby. Pro vyšetření fagocytózy v laboratoři se používají dvě základní metody, a to fagocytární testy, při kterých se hodnotí počet fagocytujících buněk, a pak jsou to funkční testy, kterými se stanovuje funkční aktivita fagocytujících buněk, tedy zda jsou tyto buňky schopny nejen patogena pohltnout, ale také ho usmrtit.

1. SOUČASNÝ STAV

1.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je obranyschopnost a imunitní dohled. Má za úkol nepřipustit ohrožení organismu nežádoucími cizorodými látkami a vetřelci, které musí včas identifikovat, lokalizovat, zlikvidovat a předat k vyloučení z organismu. Imunitní systém rozlišuje škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu, průběžně odstraňuje staré, poškozené, virem napadené, nádorové či jinak změněné vlastní buňky organismu (Podstatová, 2001).

Další důležitou funkcí imunitního systému je autotolerance, kdy rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči ní.

Mechanismy imunitního systému, které se podílejí na udržování integrity organismu dělíme podle způsobu rozpoznávání cizorodých struktur a schopnosti vytvoření imunologické paměti do dvou základních kategorií: mechanismy přirozené imunity (vrozené, neadaptivní) a mechanismy získané imunity (specifické, adaptivní). Obě kategorie pak zahrnují složky humorální a buněčné (Hořejší, Bartůňková, 2005; Ferenčík et al., 2005).

1.2 Mechanismy přirozené imunity

Pro obranu organismu proti infekci má základní význam neporušený povrch kůže a sliznice a jejich přirozené neimunitní obranné mechanismy, které lze rozdělit na mechanické (pohyb řasinek), chemické (mastné kyseliny na kůži, enzymy) a mikrobiální (kompetice normální nepatogenní flóry s patogeny).

Mechanismy přirozené imunity nazývané také neadaptivní či vrozené, jsou evolučně starší. Tvoří je složka buněčná, kterou tvoří fagocytující buňky (zde se uplatňují mikrofágy a makrofágy) a NK buňky a složka humorální, tvořená komplementovým systémem a interferony. Tyto mechanismy jsou založeny na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle

účinné proti různým patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné. Tento mechanismus nemá imunologickou paměť, tj. nejsou ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou (Hořejší, Bartůňková, 2009; Krejsek at al., 2004).

1.3 Specifické mechanismy

Specifické mechanismy, nazývané také adaptivní jsou evolučně mladší. Jsou to antigenně specifické mechanismy, reagují na cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T a B lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Mechanismy specifické imunity dělíme na humorální (založené na protilátkách) a buněčné zprostředkované (založené hlavně na T- lymfocytech). Tyto reakce tvoří imunologickou paměť.

1.4 Fagocytóza

Fagocytóza je proces, při kterém jsou specializované buňky (makrofágy, dendritické buňky, neutrofilní granulocyty a ostatní fagocytární myeloidní buňky) schopné pohltit cílové částice o velikosti 0,5–5 μm (Greenberg et al., 2002). Jedná se ředeevším o mikroorganismy, odumřelé buňky a cizí tělesa.

Tento proces je klíčový pro udržení homeostázy, kdy po pohlcení mikroorganismů dochází k aktivaci adaptivní imunologické odpovědi, odstranění apoptotických a jinak změněných buněk a nastartování opravných mechanismů u poškozené tkáně (Celli et al., 2002).

Fagocytóza je složitý proces, probíhají zde různé druhy aktivace a kooperace s ostatními buňkami (Underhill et al., 2012). Pro efektivní odstranění mikroorganismů je nutná detekce povrchovými receptory, které mikroorganismus rozeznají a následně dochází k pohlcení neboli *ingesci* a zabití daného mikroorganismu. Kromě terminace investovaného patogena dochází u specializovaných buněk (dendritických buněk, makrofágů a B-lymfocytů) k produkci prozánětlivých cytokinů a prezentaci

peptidů na svém povrchu. Tyto peptidy pocházejí z buněčné stěny patogena a poskytují jeden z aktivačních signálů pro CD4+ T lymfocyty (Rieger et al., 2010).

1.4.1 Fagocytující buňky

Profesionální fagocyty jsou buňky, které se zabývají převážně fagocytózou. Patří mezi ně neutrofilní a eozinofilní granulocyty, monocyty, jejich tkáňová forma makrofágy a dendritické buňky, které hrají zvláštní roli ve zpracování a prezentaci antigenu (Hořejší, Bartůňková, 2009).

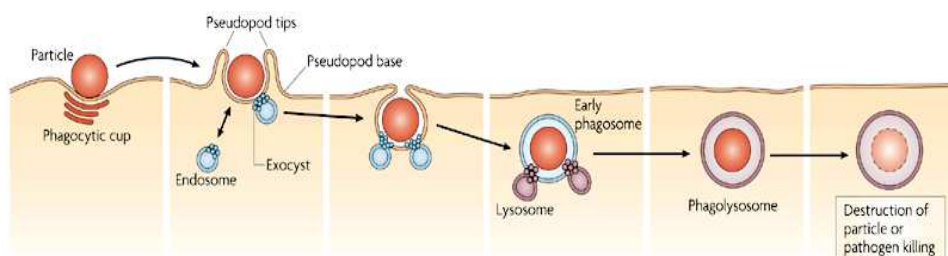
- **Neutrofilní granulocyty** – jejich populace činí 40 – 60 % leukocytů periferní krve, pocházejí z myeloidní řady a jejich životnost je krátká. Mají azurofilní granula, který obsahují mnoho lytických enzymů. Význam spočívá v protiinfekční obraně proti extracelulárním bakteriím především pneumokokům, stafylokokům, streptokokům a některým plísním.
- **Monocyty a makrofágy** – monocyty vznikají z myeloidní linie, cirkulují v krvi a posléze se přeměňují na tkáňovou formu – makrofágy. Mají dlouhou životnost a proces fagocytózy mohou několikrát opakovat. Makrofágy jsou mononukleární buňky, které pohlcují mikroorganismy (Göpfertová et al., 2002). Uplatňují se především u infekcí vyvolanými intracelulárními patogeny, např. mykobakteriemi, jsou to antigen prezentující buňky.
- **Dendritické buňky** - jsou to nejúčinnější buňky překládající antigen. Rozdělujeme je na nezralé a zralé dendritické buňky.

1.4.2 Fáze fagocytózy

Proces fagocytózy můžeme rozdělit na čtyři fáze (obr. 1): aktivní pohyb fagocytů do místa zánětu, adherence, ingesce a intracelulární degradace (Nagao et al., 2011).

Při aktivním pohybu fagocytujících buněk dochází k aktivaci chemokinových a cytokinových receptorů, které po přenosu signálu navedou buňku do místa s největší koncentrací.

Po styku s neznámou částicí dochází k navázání ligandů na receptory a přenosu signálu pomocí signální kaskády do jádra buňky. Tyto signály způsobují polymerizaci aktinových vláken v okolí navázaného komplexu a dochází k vychlívání cytoplasmatické membrány, která obejmě navázaný komplex receptoru s ligandem. Tomuto kroku se říká ingesce. Vzniklý váček, neboli fagozóm, se odštěpí od cytoplasmatické membrány a následuje fúze s lysozomy. Lysozomy obsahují velké množství kyselých hydroláz, které degradují pohlcený materiál (Baggiolini et al., 1993). Další možností degradace je respirační vzplanutí granulocytů a NO makrofágů.



Nature Reviews | Immunology

Obr 1. Fáze fagocytózy (Stuart et al., 2008)

1.4.3 Receptory zapojené ve fagocytóze

Tyto receptory můžeme rozdělit na tři skupiny.

První skupina receptorů jsou takzvané receptory závislé na opsonizaci. Tyto receptory nerozeznávají přímo povrch patogena, ale látky, které se na jeho povrch navázaly. Do této skupiny patří Fc receptor, který se váže na Fc konce imunoglobulinů, komplemetový receptor, který váže složky komplementu a $\alpha 5\beta 1$ integrin, který váže fibronectin.

Druhou skupinu tvoří receptory na opsonizaci nezávislé, do které patří Dectin 1 vázající β -glucan, MARCO, Scavenger receptor A a $\alpha V\beta 5$ integrin, který se váže na apoptické buňky.

Poslední skupinou jsou Toll-like receptory (TLR), které tvoří celou rodinu receptorů TLR-1 až TLR-13 a váží se na různé složky lipopolysacharidové stěny mikroorganismů, dále mohou rozpoznávat dvouvláknovou molekulu RNA, lipoproteiny G- bakterií, kyselinu lipoteichovou G+ bakterií, lipoarabidomanany mykobakterií, zymosan hub, HSP70 a mnoho dalších. Po navázání ligandů na tyto receptory dochází k aktivaci signálních drah, které mohou vést například k produkci cytokinů, chemokinů či polymerizaci aktinových vláken (Brown et al., 1996).

1.5 Respirační vzplanutí

Respirační vzplanutí je jednou z vlastností fagocytárních buněk, které je charakterizováno vícestupňovou aktivací NADPH oxidázy, která katalyzuje elektronové snížení molekulárního kyslíku na superoxid (O_2^-) (Baggiolini et al., 1993).

Respirační vzplanutí je rychlé uvolnění reaktivních forem kyslíku (superoxidový radikál a peroxid vodíku) aktivovanými fagocyty. Hraje velmi důležitou roli v imunitním systému a to v obraně organismu. Umožňuje fagocytárním buňkám usmrtit a degradovat pohlcené částice a bakterie (Baggiolini et al., 1993). NADPH oxidáza produkuje superoxid, který samovolně reaguje s jinými molekulami za vzniku aktivních volných radikálů. Působením NADPH oxidázy dochází ke snížení O_2 díky vzniku volných kyslíkových radikálů a vzniku peroxidu vodíku. Neutrofily a monocyty

využívají myeloperoxidázy v kombinaci s peroxidem vodíku a chlorným iontem (Cl^-) za vzniku chlornanu a následně kyseliny chlorné, která hraje zásadní úlohu při destrukci bakterií (Rolas et al., 2012). Další enzym odpovědný u fagocytů za respirační vzplanutí je nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidáza 2 (NOX_2). NOX_2 je membránový multiproteinový komplex, jehož aktivace vyžaduje fosforylaci a membránový přesun cytosolických komponentů, mezi nimiž je i NADPH oxidáza. Nepřítomnost či defekt NADPH oxidázy zabrání tvorbě reaktivních forem kyslíku a má za následek chronické granulomatózní onemocnění (Inoguchi et al., 2003).

1.5.1 Analýza respiračního vzplanutí

Analýzu respiračního vzplanutí lze rozdělit na dvě základní skupiny:

1. intracelulární analýza produkce oxidačních radikálů a jejich produktů

Pro analýzu intracelulárních oxidačních radikálů se využívá precipitace, při které dochází k redukci NBT (Kriska et al., 1999).

2. analýza volných kyslíkových radikálů uvolněných z buněk během respiračního vzplanutí

Mezi možnosti laboratorního stanovení respiračního vzplanutí uvolněných radikálů patří fotometrické stanovení SOD - inhibovatelné redukce cytochromu C, kde se stanovuje kyslíkový radikál O_2^- , který zabrání redukci cytochromů a tím i změně konformace. Ta pak má jiné světelné vlastnosti. Pro možnou interferenci s hydrogen peroxidázou má však toto stanovení nízkou senzitivitu.

Volné kyslíkové radikály je možno stanovit také pomocí Clarkovy elektrody, jejímž principem je měření potenciálu na jedné straně membrány, který se mění v závislosti na koncentraci měřených iontů v okolí (Klegeris et al., 1994).

Nejvíce senzitivní metodou pro stanovení volných kyslíkových radikálů je chemiluminiscence, která využívá detekce chemického světla, vzniklého po uvolnění kyslíkových radikálů.

Vedle luminiscence je jednou z nejčastěji používaných metod pro stanovení volných kyslíkových radikálů fluorometrie. Tato metoda má celou řadu modifikací, např. na peroxidáze závislé oxidaci PHPA (p-hydroxyfenyl kyseliny octové)

nebo scopoletinu, které shodně stanovují množství peroxidu vodíku. Další možností je použití sondy 2-7-dichlorodihydrofluorescinu (H_2DCFDA), která se po oxidaci mění na fluorescenční produkt (Kaul et al., 1996). Další variantou může být použití dihydrorhodaminu 123 (DHR 123), který se oxiduje na fluorescenční rhodamin 123.

Principem těchto stanovení je nastimulování buněk nefluorescenčními substancí, která se po aktivaci a vzniku oxidačních radikálů aktivuje a změní konformaci a stane se z ní látka fluorescenční (Adolph et al., 2012). Fluorescenční signál lze sledovat na průtokovém cytometru, který je schopný změřit velký počet buněk v krátkém čase a intenzitu signálu, která odpovídá aktivitě oxidačního vzplanutí. (Raidal et al., 1998).

Pro stanovení NO produkovaného aktivovanými makrofágy, tedy dalšího fagocytárního mechanismu intracelulárního zabíjení, se nejčastěji využívá Griessova metoda. Tato metoda je založena na působení NO na sulfanilamid, který reaguje s N-1-naphthylethylenediamin-dihydrochloridem (NED), který následně změní jeho konformaci a tato změna se projeví jako nárůst absorpance při 550 nm. Vyhodnocení lze provést na spektrofotometru, který je například i součástí ELISA readru (Modolell et al., 1997).

Zlatým standardem pro měření NO je chemiluminiscenční metoda, kdy se plynný NO ze vzorku mísí s ozónem za vzniku NO_2 , z části excitovaném stavu (NO_2^*). Po návratu do základního stavu se uvolňuje foton, který se detekuje fotonásobičem (Litzman et al., 2007).

1.6 Průtoková cytometrie (FACS)

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda, která umožňuje charakterizovat několik parametrů najednou na velké množině částic v suspenzi. Tato charakterizace probíhá především na základě jejich fyzikálních, chemických a morfologických vlastností. Využití této metody je zejména v biomedicínských oborech, jako jsou hematologie a imunologie. Zde se používá k charakterizaci jednotlivých buněčných

populací. Charakterizace buněk pomocí průtokového cytometru je založena na principu měření světelných rozptylů a intenzit fluorescence.

Příprava buněk pro měření spočívá především ve fluorescenčním značení pomocí monoklonálních protilátek proti specifickým extracelulárním nebo intracelulárním znakům. Označené a naředěné buňky jsou nasáty do analyzátoru, kde dochází k hydrodynamické fokusaci proudu vzorku uprostřed laminárního proudu nosného média. V přesně definovaném bodě prochází proudem média s buňkami několik laserových paprsků o různých vlnových délkách, které excitují různé fluorescenční znaky navázané na specifických strukturách měřených buněk. Díky hydrodynamické fokusaci a naředění suspenze buněk je vysoká pravděpodobnost, že laserovým paprskem prochází vždy jen jedna buňka. Analyzátor zaznamenává kromě emitované fluorescence i rozptyl světla ve dvou směrech (Bartůňková, Paulík, 2005).

Senzor forward-scatter (FSC) měří přímý rozptyl laserového paprsku a senzor side-scatter (SSC) boční rozptyl v úhlu 90° k laserovému paprsku a směru toku vzorku. Intenzita signálu přímého rozptylu je následně interpretována jako velikost procházející buňky, zatímco intenzita signálu z bočního rozptylu popisuje fyzikální vlastnosti povrchu buňky, její vnitřní členitost (granularitu) a optické vlastnosti jádra a cytoplasmy. Emitované fluorescenční světlo je měřeno pomocí fluorescenčních detektorů. Jedná se o fotonásobiče, které zachytávají záblesky v momentě, kdy prochází buňka laserovým paprskem. Tyto impulsy přemění v elektrické signály, které zaznamenává a vyhodnotí počítač, který bývá přímou součástí analyzátoru.

Ke značení povrchových nebo intracelulárních znaků buněk se využívají monoklonální protilátky, na které je navázaný příslušný fluorochrom. Díky specifické afinitě k danému antigenu (znaku) můžeme zjistit nejen počet buněk, které daný antigen mají na povrchu či uvnitř buňky (počet záblesků na detektoru), ale pomocí intenzity záblesku můžeme zjistit, v jakém relativním množství je daný znak zastoupen.

U většiny laboratorních měření se využívá vícebarevného značení, kdy kombinace přítomných znaků přesněji určí buněčný typ. V těchto případech je nezbytné

značit každý antigen jiným fluorochromem tak, aby se emisní spektra nepřekrývala nebo se překrývala co nejméně (Bonetta, 2005).

1.7 Poruchy fagocytózy

Defekty postihující fagocytární systém jsou převážně v poruchách počtu nebo funkce neutrofilních granulocytů. Funkční poruchy zasahují i monocyto-makrofágový systém a projevují se infekcemi, které jsou způsobeny stafylokoky, enterobakteriemi, plísněmi (*Candida albicans*, *Aspergillus*) a mykobakteriemi.

Primární poruchy fagocytózy vznikají vrozeným defektem genů kódujících proteiny, které hrají důležitou roli v tomto obranném mechanismu, jsou relativně vzácné a tvoří asi 9 % všech imunodeficiencí. Sekundární imunodeficiencie jsou získané a vznikají v důsledku působení vnějších nebo vnitřních faktorů a jsou časté (Bartůňková, 2002).

1.7.1 Porucha počtu neutrofilů

Kostmannův syndrom je označován také jako těžká kongenitální neutropenie. Tento syndrom patří ke kvantitativním poruchám vrozené agranulocytózy. Projevy začínají již od dětského věku záněty kůže a sliznice. Molekulovou podstatou onemocnění je pravděpodobně mutace genu pro elastázu neutrofilů. V kostní dřeni se naruší zrání neutrofilů ve stadiu promyelocytu nebo myelocytu. K léčbě se používá růstového faktoru G-CSF, který je velmi účinný. U většiny pacientů po zahájení léčby dojde ke zvýšení koncentrace neutrofilních leukocytů. Přestože tyto neutrofilie nejsou zcela funkčně kompletní, klinický stav pacientů se zlepší. V případě potřeby bývá léčba doplněna antibiotiky. Nezabírá-li léčba G-CSF, je pacient indikován k transplantaci hemopoetických kmenových buněk (Hořejší, Bartůňková, 2009; Bartůňková, 2002).

Cyklická neutropenie je podle nových poznatků zřejmě variantou předchozího syndromu. Toto onemocnění je charakterizováno cyklickým poklesem granulocytů v intervalech asi 3 týdnů. V tomto období bývají pacienti náchylnější k infekcím. I u těchto pacientů byla prokázána mutace neutrofilní elastázy, ale v jiné oblasti genu než u Kostmannova syndromu. Klinický obraz je podobný jako u kvantitativních poruch

neutrofilů. Mezi příznaky cyklické neutropenie patří nekrotizující a ulcerózní záněty sliznice a kůže, které jsou provázeny horečkami objevujícími se v cyklech (Hořejší, Bartůňková, 2009; Bartůňková, 2002).

1.7.2 Defekt adhezivních molekul

LAD I syndrom

Příčinou tohoto vzácného syndromu je defekt leukocytárních integrinů. Může se jednat o kvantitativní nebo kvalitativní odchylky podjednotky β_2 integrinových molekul CD11/CD18. Jedná se o mutaci genu, která kóduje β_2 podjednotku, umístěného na 21. chromozomu nebo je příčina na posttranskripční úrovni. Syndrom je autozomálně recesivní anebo se jedná o nové mutace. Tento defekt způsobuje neschopnost neutrofilů přilnout k endoteliím a tím nedochází k jejich putování do místa zánětu. Adheze ostatních fagocytů není touto poruchou ovlivněna, neboť je zajišťována jiným typem adhezivních molekul (Bartůňková, 2002).

LAD II syndrom

Příčinou tohoto syndromu je defektní exprese antigenu sialyl – LewisX (SLeX, CD15), který je ligandem pro P a E selektiny. Molekulární podstatou je mutace v genu kódující jednu z fukosyltransferáz. Tento enzym se podílí na biosyntéze sialyl - Le^x a jiných komplexních sacharidů. Molekula CD15 je exprimována na granulocytech, monocytech, erytrocytech a endotelu (Bartůňková, 2002).

1.7.3 Chronická granulomatózní choroba (CGD)

Chronická granulomatózní choroba je vrozené onemocnění způsobené defekty v enzymatickém systému NADPH oxidázy, která je vázaná na membráně fagocytů, nebo abnormalitou v cytosolických faktorech, které jsou zapotřebí k aktivaci NADPH oxidázy a ke vzniku kyslíkových radikálů, jež přímo působí na poškození a usmrcení pohlcených patogenů. Podle typu deficitní složky NADPH oxidázového komplexu se jedná o formu vázanou na chromozom X nebo o onemocnění recesivně dědičné (Goldblatt a Thrasher, 2000).

Leukocytární počet u pacientů s chronickou granulomatózní chorobou je v normě, je zde však defekt funkce fagocytujících leukocytů – monocytů (makrofágů) a neutrofilů, které díky absenci respiračního vzplanutí, a tedy tvorby reaktivních forem kyslíku, nemohou účinně usmrcovat některé bakterie a plísně (Bartůňková, 2002; Fučíková, 1995).

Defekt v tvorbě kyslíkových radikálů směřuje ke snížení baktericidní schopnosti u některých mikroorganismů, ale vede i k dysfunkci některých lyzozomálních degradačních enzymů a ty nemohou efektivně rozložit pohlcený materiál. V důsledku toho tvoří granulomy, které jsou typické pro CGD (Bartůňková, Paulík, 2005; Litzman et al., 2007).

1.7.4 Defekt dalších enzymů

Častější poruchou fagocytózy, nežli je absence NADPH oxidázy, je autosomálně recesivní porucha enzymu myeloperoxidáza, který částečně nebo úplně chybí v azurofilních granulích neutrofilů a monocytů. Myeloperoxidáza má mikrobicidní funkci. Tento defekt se může projevit náchylností k plísňovým a bakteriálním infekcím i s velmi vážným průběhem U většiny pacientů však probíhá asymptomaticky.

Existují i další defekty enzymů, které postihují myeloidní buňky, např. glukózo-6-fosfát dehydrogenázy, katepsinu C, glutation reduktázy nebo glutation syntézy. Defekty těchto enzymů mohou být buď asymptomatické, nebo se projeví poruchami chemotaxe či baktericidie, které vedou ke zvýšené náchylnosti k infekcím, obzvláště plísňovými anebo po požití některých látek může dojít k hemolytické anémii (Bartůňková, 2002; Kamani a Douglas, 1997).

1.7.5 Sekundární poruchy fagocytózy

Sekundární imunodeficiencie jsou poruchy vznikající v průběhu života vlivem působení vnějších a vnitřních faktorů, jako např. imunosuprese, léčba cytostatiky, ozáření nebo působení toxických látek, které ovlivňují produkci myeloidních buněk v kostní dřeni a způsobují sekundární neutropenie. Funkční poruchy ve smyslu stimulace či inhibice neutrofilních granulocytů jsou způsobeny vazbou autoprotilátek či vlivem jiných faktorů přítomných v krevním séru.

1.8 Laboratorní diagnostika poruch fagocytózy

1.8.1 Kvantitativní zastoupení neutrofilních granulocytů

Vyšetření počtu granulocytů a neutrofilů se provádí z celkového počtu leukocytů v krevním obraze. Z diferenciálního krevního obrazu lze získat relativní zastoupení absolutního počtu jednotlivých buněk (Litzman et al., 2007).

1.8.2 Testování schopnosti fagocytujících buněk pohltit cizorodou částici

Jedná se o schopnost ingescence neboli pohlcení, které je závislé na opsonizaci a lze je posoudit testem s metakrylátovými částicemi nebo kvasinkami (*C. albicans*).

V rutinních imunologických laboratořích se donedávna používaly pro posouzení schopnosti ingescence fagocytujících buněk mikrosférické hydrofilní partikule (MSHP). Jednalo se o hydroxyethylmetakrylátové částice s nízkým negativním nábojem, který omezoval nespecifickou adherenci k buněčnému povrchu (Litzman et al., 2007). Jako přirozenější substrát se používají kvasinky, např. *C. albicans*. V tomto testu se vypočítává tzv. fagocytární index, který vyjadřuje počet pohlcených mikroorganismů na jednu buňku (Bartůňková, Paulík, 2005).

1.8.3 Stanovení míry exprese adhezivních molekul

Provádí se hlavně při podezření na LAD syndrom. Stanovením exprese povrchových glykoproteinů CD11/CD18 na membránách lymfocytů, monocytů a granulocytů vede k odhalení deficiencie leukocytárních adhezivních molekul. Vyšetření se provádí na průtokovém cytometru pomocí monoklonálních protilátek namířených proti α nebo β řetězci heterodimeru (Bartůňková, 2002; Litzman et al., 2007).

1.8.4 Baktericidní testy

Tato metoda se používá jako screeningové vyšetření pro posouzení baktericidní schopnosti granulocytů, kterým však nelze přesně stanovit v jaké fázi fagocytózy (od adheze až po usmrcení pohlceného mikroorganismu) došlo k poruše.

Baktericidní testy se mezi sebou liší v používání mikroorganismu (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*). Vyšetření se provádí z plné krve, ke které se přidává suspenze příslušného mikroba. Test se hodnotí podle použitého substrátu. Jednak se stanoví počet přežívajících mikrobů vyočkovaných na živnou půdu, jednak se používá vitální barvení methylenovou modří, kdy se mikroskopicky hodnotí usmrcené mikroorganismy (Litzman et al., 2007)

1.8.5 Testy oxidačního metabolismu granulocytů

Jedná se o testy posuzující kyslíkový metabolismus granulocytů, který je aktivován v průběhu fagocytózy a významně koreluje s jejich mikrobicidní schopností.

Test redukce tetrazoliových solí

Patří sem NBT test (nitro-blue-tetrazolium test) a INT test (iod-nitro-tetrazolium test). Princip obou testů je založen na redukci rozpustných bezbarvých tetrazoliových solí na modrý nerozpustný formazan. Ten se ukládá ve formě krystalů v cytoplazmě fagocytujících buněk. Do fagocytů nejprve vstupuje rozpuštěná nebarevná forma

substrátu a ta se oxidačními pochody mění na nerozpustnou barevnou látku. Vyhodnocení se provádí na sklíčku v optickém mikroskopu, kdy je výsledek vyjádřen jako procento pozitivních buněk s tmavě modrými skvrnami formazanu, nebo přesnějším fotometrickým vyhodnocením po provedené extrakci vzniklého formazánu. Fagocyty jsou stimulovány např. rýžovým škrobem nebo zymozanem (Litzman et al., 2007; Bartůňková, Paulík, 2005).

Chemiluminiscenční test

Jedná se o citlivější metodu kvantitativního sledování respiračního vzplanutí. Princip tohoto testu je založen na skutečnosti, že buňky při fagocytóze emitují malá množství světla, které lze detekovat. Chemiluminiscence se vyvolá přidáním stimulu, který aktivuje fagocytózu. Nejběžněji se používá PMA (phorbol – myristát – acetátu). Ten pomocí proteinkinázy C aktivuje NADPH oxidázu. Jako další stimuly se používají 1% rýžový škrob nebo zymozan. Dojde k respiračnímu vzplanutí a vznikají vysoce reaktivní látky, které reagují s mikroby za vzniku karboxylových sloučenin. Ty jsou elektronově nestabilní a při návratu do základního stavu pak dochází k emisi fotonů. K zesílení světla a indukci tvorby světla se využívají luminiformy, nejčastěji luminal. Test je vhodný pro diagnózu chronické granulomatózy a to k zachycení poruchy v NADPH oxidázovém a myeloperoxidázovém systému (Bartůňková, Paulík, 2005; Litzman et al., 2007).

Burst test

Tímto testem se kvantitativně hodnotí respirační vzplanutí granulocytů v heparinizované krvi měřením na průtokovém cytometru. Jedná se o modifikaci předchozího testu.

Princip testu spočívá ve využití oxidační redukce dihydrorhodaminu 123 na zeleně fluoreskující rhodamin 123 pomocí peroxidu, hydroxylových radikálů a superoxidových aniontů při aktivaci respiračního vzplanutí. Pro aktivaci fagocytózy se používají opsonizované bakterie *Escherichia coli* a PMA. Dochází k respiračnímu

vzplanutí za vzniku hydroxylových radikálů, peroxidu vodíku a superoxidových aniontů, které redukuje dihydrorhodamin na rhodamin123, který spontánně fluoreskuje.

Fluorescence je pak hodnocena na průtokovém cytometru. Stanovuje se stimulační index a procento (počet) granulocytů produkujících oxidativní radikály, tedy zeleně fluoreskující buňky. Vyhodnocuje se také aktivita spontánních tj. nestimulovaných fagocytů (Litzman et al., 2007; Bartůňková, Paulík, 2005; Elbim et al., 1999).

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

2. 1 Cíle práce

Cílem práce bylo sestavení literární rešerše na dané téma, zvládnutí laboratorní metodiky a náročné práce s průtokovým cytometrem a základním vyhodnocení klinických dat v rozsahu možností rutinní imunologické laboratoře.

2. 2 Hypotézy

Předpokládá se úspěšné zavedení daného vyšetření do laboratoře. Dalším předpokladem je, že získané výsledky respiračního vzplanutí budou ve shodě s literárními údaji a to, že primární defekt fagocytózy je velmi vzácné onemocnění. Se sekundárními poruchami tohoto imunologického mechanismu se můžeme setkat častěji.

3. MATERIÁL A METODY

V období let 2009 až 2012 jsem vyhodnotila pomocí průtokové cytometrie 611 pacientů, u kterých byla v rámci diferenciální diagnostiky provedena buněčná imunita včetně respiračního vzplanutí.

3.1.1 Materiál

Diagnostiku respiračního vzplanutí jsem provedla z nesrážlivé periferní krve odebrané do zkumavky s heparinem. Krev nesmí být odebrána do EDTA nebo citrátu sodného, neboť tato antikoagulační činidla ruší funkční stanovení.

Použila jsem komerční soupravu FagoFlowEx[®] od firmy EXBIO. Vyšetření jsem provedla podle zavedených postupů v Laboratořích imunologie v Nemocnici České Budějovice a.s.

Nakonec jsem vyšetření vyhodnotila na průtokovém cytometru Cytomics FC 500 nebo na NAVIOS[®] od firmy Beckman Coulter.

3.1.2 Reagencie

- *Escherichia coli*
- PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)
- PBS (phosphate buffered saline)
- DHR 123 (dihydrorhodamin 123)
- Demineralizovaná voda
- Fyziologický roztok (NaCl 0,9 % w/v)
- Lyzační roztok

3.1.3 Příprava reagensů

- **E. coli** - lyofilizované bakterie *E. coli* rozpustím pomocí 200 μ l demineralizované vody a suspenzi promíchám na vortexu. Nepotřebné množství

suspenze lze skladovat v lednici při 2 – 8 °C nejdéle 24 hodin, případně zamrazit při ≤ 20 °C.

- **DHR 123** - před použitím rozpustím pomocí 600 μ l demineralizované vody a roztok promíchám na vortexu. Nepotřebné množství roztoku lze skladovat v lednici při 2 – 8 °C nejdéle 8 hodin, případně zamrazit při ≤ 20 °C. Zamrazený roztok DHR123 se musí spotřebovat do 14 dnů. Skladování zamrazeného roztoku může způsobit až 20% pokles stimulačních indexů.
- **PMA** - před použitím rozpustím pomocí 200 μ l demineralizované vody a roztok promíchám na vortexu. Nepotřebné množství suspenze lze skladovat v lednici při 2 - 8 °C nejdéle 24 hodin, případně zamrazit při ≤ 20 °C.
- **Lyzační roztok** – je připraven pro okamžité použití.

3. 1. 4 Potřebné vybavení

- Demineralizovaná voda
- 5 ml zkumavky pro barvení buněk
- Sada automatických pipet s jednorázovými špičkami
- Vortex
- Termostat nastavený na 37 °C
- Centrifuga
- Průtokový cytometr - excitace modrým laserem 488 nm, emise záření při 525 nm (FITC)

3. 2 Metodika

3. 2. 1 Princip metody

Princip testu je založen na měření respiračního (oxidačního) vzplanutí granulocytů po jejich stimulaci inaktivovanými bakteriemi *E. coli*. Po ingesci bakterií je ve fagocytech aktivována NADPH oxidáza, která spustí respirační (oxidační) vzplanutí.

Vznikající reaktivní meziprodukty uvnitř fagocytů oxidují dihydrorhodamin 123 (DHR123) na fluorescenční produkt rhodamin 123, který je detekován průtokovým cytometrem. Pozitivní kontrolu představuje vzorek, který je inkubován s PMA (phorbol 12 - myristate 13 - acetate), který spustí respirační vzplanutí i bez adheze a ingesce patogenu granulocytem.

3. 2. 2 Postup metody

Pro vyšetření jednoho vzorku krve pacienta jsou zapotřebí 3 zkumavky.

- V 1. zkumavce označené jako **K** máme nestimulovanou negativní kontrolu.
- Ve 2. zkumavce označené jako **P** je pozitivní kontrola stimulovaná PMA.
- Ve 3. zkumavce označené jako **A** je vzorek stimulovaný suspenzí *E.coli*.

1. Do zkumavky:

- **A** (vzorek krve stimulovaný bakteriemi) jsem napipetovala 10 μ l suspenze *E. coli*
 - **K** (negativní kontrola) jsem nedala nic
 - **P** (pozitivní kontrola) jsem přidala 10 μ l roztoku PMA
2. Do všech zkumavek jsem odměřila 50 μ l krve s heparinem a zkumavky promíchala pomocí vortexu.
 3. Do všech zkumavek jsem přidala 10 μ l rekonstituovaného roztoku DHR 123 a zkumavky promíchala pomocí vortexu.
 4. Zkumavky jsem inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 40 minut.
 5. Poté jsem přidala 50 μ l lyzačního roztoku (Lysing Solution), zkumavky promíchala pomocí vortexu a inkubovala 5 minut při laboratorní teplotě.
 6. Poté jsem do zkumavek přidala 3 ml demineralizované vody, promíchala pomocí vortexu a inkubovala přibližně 5 - 10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedošlo k lýze červených krvinek.
 7. Zkumavky jsem centrifugovala 5 minut při 300 g.

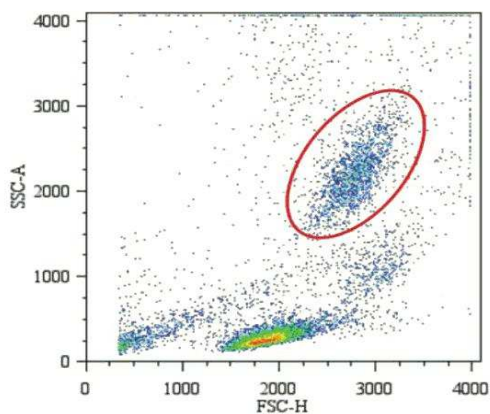
8. Odstranila jsem supernatant a roztřepala sediment pomocí 0,2 - 0,4 ml pufru PBS.

Test jsem následně vyhodnotila pomocí průtokového cytometru. Naměřená data stimulovaného vzorku, pozitivní a negativní kontroly se zobrazují v grafu side-scatter (SSC) ku forward-scatter (FSC) a nebo FSC/ SSC. Zvolila jsme si populaci buněk, která mě zajímala (obr. 1.), v tomto případě se jednalo o populaci granulocytů. Vlivem ingesce bakterií dochází k posunu populace granulocytů v SSC/FSC grafu. Ohraničení populace je třeba nastavit individuálně podle jednotlivých vzorků. Posléze máme zobrazení ohraničených granulocytů v histogramech (obr. 2, 3, 4.), kde na ose X je intenzita fluorescence ve FL1 pro FITC a na ose Y je počet buněk. Vhodným ohraničením populací jsem spočítala procentuální zastoupení pozitivních a negativních granulocytů a jejich průměrnou intenzitu fluorescence (MFI) (Tabulka č. 1 a 2). Granulocyty stimulované PMA a *E. coli*, u kterých došlo k respiračnímu vzplanutí, vykazují intenzivní fluorescenci rhodaminu 123 ve FITC kanálu. Výsledky se vyjadřují jako relativní zastoupení (procento) buněk označených rhodaminem 123 nestimulovaných a stimulovaných *E. coli* nebo PMA. Následně jsme stanovila tzv. stimulační index (SI), který se vypočítá jako poměr průměrné intenzity fluorescence pozitivních granulocytů stimulovaných *E. coli* (MFI - POZ) a průměrné intenzity fluorescence nestimulovaného - negativního kontrolního vzorku (MFI - NEG). Stimulační index slouží pro přibližné porovnání intenzity respiračního vzplanutí mezi jednotlivými vzorky krve (Příbalový leták od firmy EXBIO).

$$SI = \frac{MFI - \textit{pozitivní}}{MFI - \textit{negativní}}$$

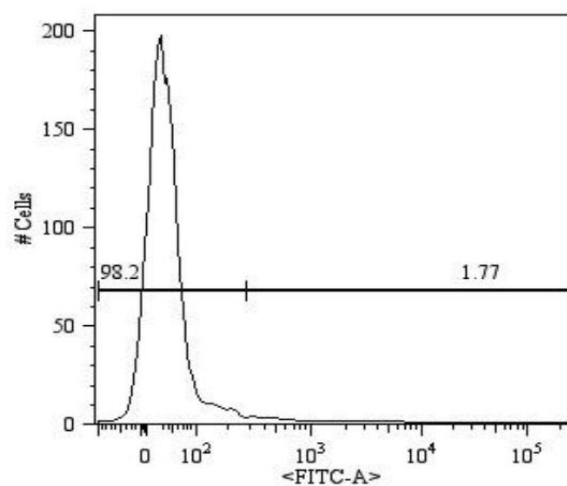
Obr. 1: Ohraničená populace granulocytů

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO



Obr. 2: Histogram populace nestimulovaných granulocytů - negativní kontrola

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO



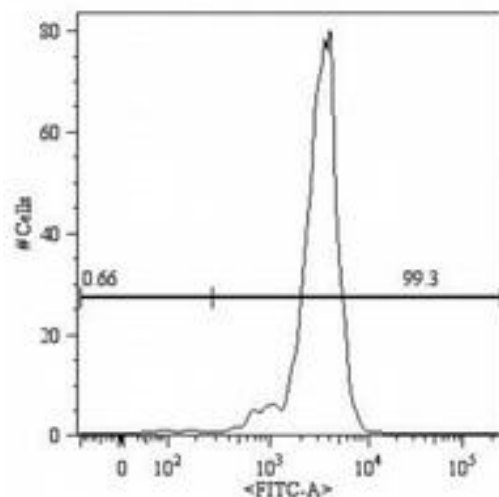
Tabulka č. 1: Nestimulované granulocyty – negativní kontrola

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO

Populace	Počet buněk	MFI - NEG
Negativní	98,2	33,3
Pozitivní	1,77	751

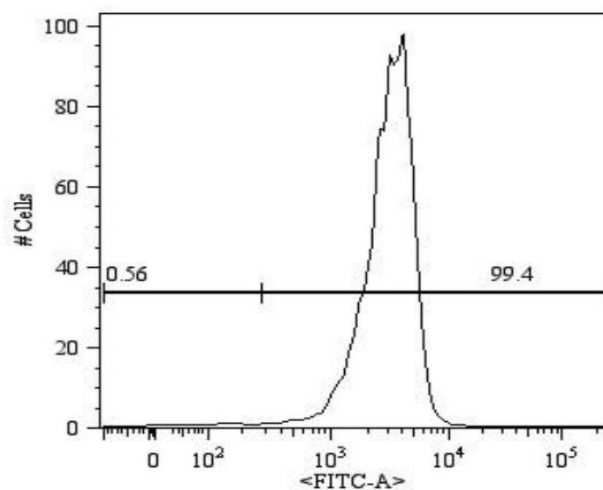
Obr. 3: Histogram populace stimulovaných granulocytů PMA - pozitivní kontrola

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO



Obr. 4: Histogram populace stimulovaných granulocytů *E. coli*

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO



Tabulka č. 2: Granulocyty stimulované *E. coli*

Zdroj: příbalový leták firmy EXBIO

Populace	Počet buněk	MFI - POZ
Negativní	0,56	130
Pozitivní	99,4	3391

Tabulka č. 3: Referenční hodnoty respiračního vzplanutí granulocytů

Stimulační index	% stimulovaných granulocytů <i>E. coli</i>	% stimulovaných granulocytů PMA
≥ 30	≥ 80%	≥ 80%

4. VÝSLEDKY

V období let 2009 – 2012 bylo v naší imunologické laboratoři vyšetřeno celkem 611 pacientů, u kterých byl proveden test respiračního vzplanutí na základě požadavku ošetřujícího lékaře a jejichž výsledky jsem v následující kapitole vyhodnotila. Jednalo se o pacienty zejména z imunologických ordinací, dětských a gastroenterologických oddělení (Tabulka č. 4.). Nejčastější diagnózou u pacientů s vyšetřením respiračního vzplanutí granulocytů byla imunodeficience (Tabulka č. 5)

Tabulka č. 4: Oddělení nejčastěji požadující vyšetření respiračního vzplanutí

Zdroj: vlastní výzkum

Oddělení	Celkem	SI 0-20	SI 21-30	SI 31-200
Imunologické ordinace	310	5	17	288
Gastroenterologické oddělení	103	1	6	96
Dětské oddělení	85	5	11	69
Interní oddělení	25	0	3	22
Infekční oddělení	10	0	1	9

Tabulka č. 5: Rozdělení pacientů dle nejčastějších diagnóz

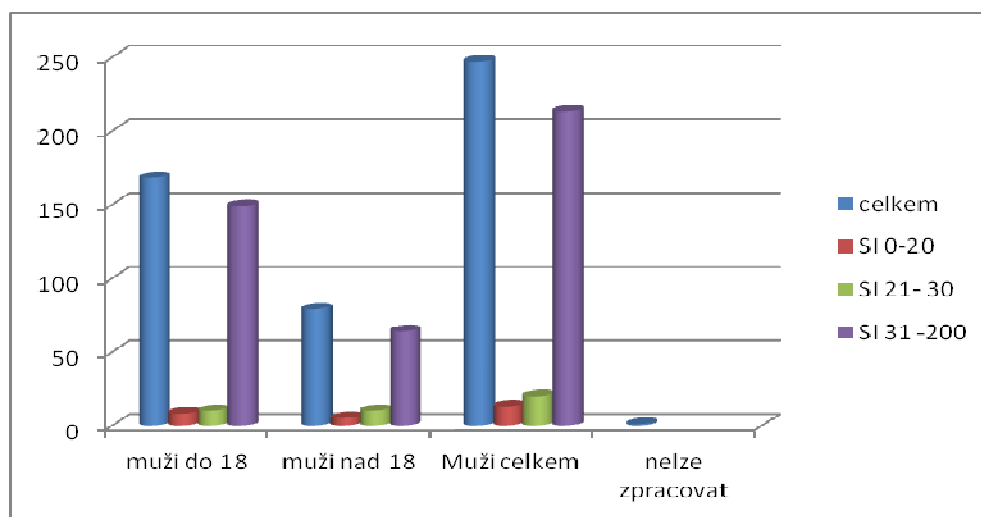
Zdroj: vlastní výzkum

Dg.	Název	Celkem	SI 0-20	SI 21-30	SI 31-200
D849	Imunodeficiencie	131	2	10	119
D839	Běžná variabilní imunodeficiencie NS	79	0	0	79
D848	Jiné specifické imunodeficiencie NS	77	0	4	73
D899	Porucha týkající se mechanismů imunity	50	1	4	45
R509	Horečka NS	24	2	3	19
J459	Astma NS	22	0	1	21
D803	Selektivní defekt podtříd Ig G	1	0	0	1

Následně jsem pacienty rozdělila podle pohlaví, věku a stimulačního indexu (Graf č. 1, č. 2).

Graf č. 1 : Počet zastoupení mužů dle věku a stimulačního indexu

Zdroj: vlastní výzkum



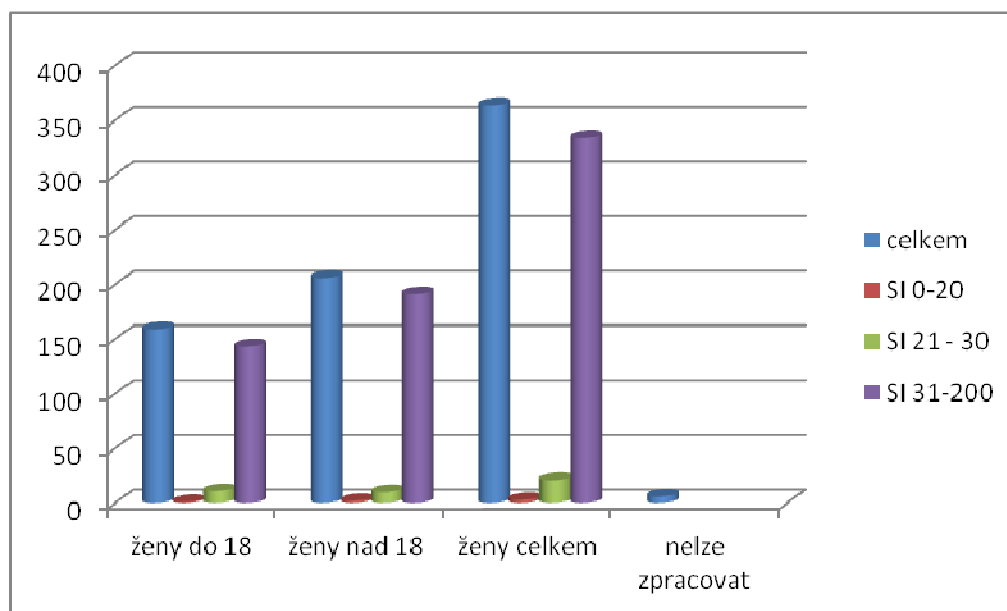
Na grafu číslo 1 vidíme zastoupení mužské populace. Celkem bylo vyšetřeno 247 pacientů, které jsem rozdělila podle věku na muže do 18 let a nad 18 let.

Ve skupině do 18 let bylo 168 mužů a z toho výrazně snížený SI 0 – 20 mělo 8. 10 mužů mělo snížený SI 21 - 30 a většina (149) měla normální SI v rozmezí 31 – 200.

Další skupinou byli muži nad 18 let, kterých bylo celkem 79, z toho se SI 0 - 20 bylo 5 mužů, se SI 21 - 30 jich bylo 10 a 64 vyšetřovaných mužů tohoto věku mělo SI 31 – 200.

Graf č. 2: Počet zastoupení žen dle věku a stimulačního indexu

Zdroj: vlastní výzkum



Na grafu číslo 2 vidíme zastoupení ženské populace, kdy bylo vyšetřeno celkem 364 žen. Ve věkové kategorii do 18 let bylo 159 žen a z toho SI 0 - 20 měla 1 žena, SI 21- 30 bylo zaznamenáno u 11 žen a většina (143) vyšetřovaných pacientek měla SI 31 – 200.

Ženy nad 18 let věku, kterých bylo celkem 206, byly dle SI rozděleny následovně: výrazně snížený SI 0 - 20 měly 2 ženy, ve skupině se sníženým SI 21 - 30 bylo 10 žen a 191 vyšetřovaných žen tohoto věku mělo normální SI 31 – 200.

Ve skupině žen i mužů se vyskytl materiál, který nebylo možno zpracovat většinou z důvodu chybného odběru do zkumavek s nevhodným antikoagulačním

činidlem (citrát nebo EDTA), popřípadě nebyla dodána nesrážlivá krev. Celkem se jednalo o 7 případů.

V následující tabulce č. 6 jsou bližší informace k pacientům s výrazně sníženým stimulačním indexem (SI 0-20), u kterých bylo podezření na vážnější poruchu fagocytózy. Celkem bylo zaznamenáno 16 případů s výrazně sníženým SI (0 – 20).

Tabulka č. 6: Skupina pacientů s podezřením na poruchu fagocytózy se SI 0 – 20

Zdroj: vlastní výzkum

Pohlaví a věk	SI	<i>E. coli</i>	Dg.	Ročník	Oddělení
Muži do 18 let	12	43%	J458	1997	Imunologické oddělení
	11	45%	J301	1997	Imunologické oddělení
	15	98%	D849	2004	Imunologické oddělení
	18	92%	A844	2007	Dětské oddělení
	8	82%	R509	2006	Dětské oddělení
	19	88%	R560	2010	Dětské oddělení
	12	46%	J209	2008	Dětské oddělení
	19	73%	R509	2012	Dětské oddělení
Muži nad 18 let	20	98%	J069	1988	Interní oddělení
	12	98%	K831	1945	Gastroenterologické oddělení
	12	98%	C218	1947	Onkologické oddělení
	19	99%	R060	1919	ORL
	20	98%	J038	1975	Interní oddělení
Ženy do 18 let	15	83%	D849	2007	Imunologické oddělení
Ženy nad 18 let	10	72%	C510	1950	Onkologické oddělení
	16	81%	D899	1978	Imunologické oddělení

V tabulce č. 7 uvádím pacienty s výrazně sníženým SI (0 - 12) nezávisle na pohlaví.

Tabula č. 7: Vybraná skupina pacientů s výrazně sníženým SI (0 - 20)

Zdroj: vlastní výzkum

Ročník	Diagnóza	SI	E. coli	PMA	Aktiv. granulocyty	Kontr. granulocyty
1997 -1. odběr	Smíšené astma	12	43%	-	11,6	0,95
1997- 2. odběr	Alergická rýma způsobená pylem	11	45%	-	13,5	1,2
PS 2008	Akutní bronchitida	12	46%	11%	5,1	0,59
2006-1. odběr	Horečka	8	82%	-	6,2	0,75
2006-2. odběr	Horečka	70	98%	-	36,5	0,52
1945	Neprůchodnost žlučového	12	98%	-	10,1	0,85
1947	ZN-léze přesahující rectum, řiť a řitní kanál	12	98%	-	7,5	0,61
1950	ZN-velký stydký pysk	10	10%	-	3,2	0,32

U pacienta - ročník 1997 byl zaznamenán při opakovaném vyšetření respiračního vzplanutí výrazně snížený SI (12 a 11) i snížené procento aktivovaných granulocytů (43% a 45%). Z obou vyšetření je patrné, že SI i procento aktivovaných granulocytů *E. coli* jsou u tohoto pacienta opakovaně sníženy, tudíž zde bylo vysloveno podezření na imunodeficienci a doporučeno zaslat pacienta na specializované imunologické oddělení.

Také u pacienta PS 2008 byl zaznamenán snížený SI (12) a snížené procento aktivovaných granulocytů stimulací PMA i *E. Coli* (46%) S podezřením na imunodeficit byl pacient odeslán na imunologii do Nemocnice Motol v Praze. Opakovaný odběr neměla naše laboratoř již k dispozici.

U ostatních pacientů se sníženým SI nebylo prokázáno výrazné snížení procento aktivovaných granulocytů a byl doporučen opakovaný odběr a vyšetření k definitivnímu vyloučení defektu. Pouze u pacienta ročník – 2006 jsme měli k dispozici ke srovnání opakované vyšetření s časovým odstupem od původního, kdy u pacienta byl prokázán systémový infekční zánět. Opakované vyšetření respiračního vzplanutí neprokázalo primární defekt fagocytózy.

V následující části uvádím výsledky 2 pacientů. Příkladem pacienta s normálním respiračním vzplanutím, které nesvědčí pro poruchu fagocytózy granulocytů je pacient NK 1981 (grafická dokumentace 1A - 3B), u kterého je procento aktivovaných granulocytů stimulovaných PMA a *E. coli* a SI v normě. Tyto hodnoty nesvědčí o poruše fagocytózy v respiračním vzplanutí.

U pacienta PS 2008 (grafická dokumentace 4A - 6B) bylo zjištěno nízké procento aktivovaných granulocytů stimulovaných PMA a *E.coli* a výrazně snížený SI, na jejichž základě bylo vysloveno podezření na možný defekt ve fagocytárním mechanismu (Tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Stimulační index a procentuální zastoupení aktivovaných granulocytů bez stimulace a se stimulací u vybraných pacientů NK 1981 a PS 2008

Zdroj: vlastní výzkum

	% aktivovaných granulocytů bez stimulace	% aktivovaných granulocytů stimulovaných PMA	% aktivovaných granulocytů stimulovaných <i>E. Coli</i>	SI
NK 1981 zdravý	0,80	99,87	99,70	58,90
PS 2008 deficit	0,97	10,99	46,26	11,90

Grafická dokumentace výsledků měření průtokovým cytometrem u pacientů NK 1981 a PS 2008:

Zdroj: vlastní výzkum

1A - 3B

1A, 1B - bez stimulace

2A, 2B - stimulace PMA

u zdravého pacienta NK 1981

3A, 3B - stimulace *E. coli*

4A - 4B

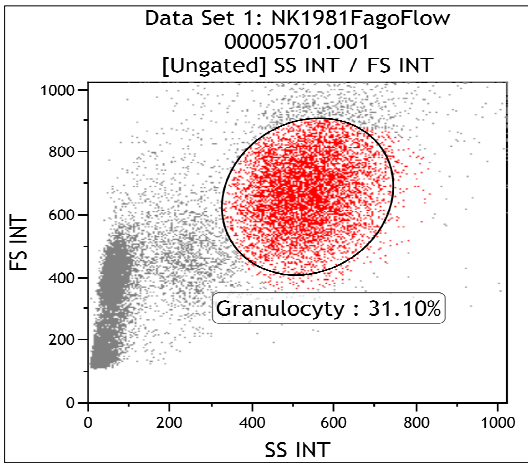
4A, 4B - bez stimulace

5A, 5B - stimulace PMA

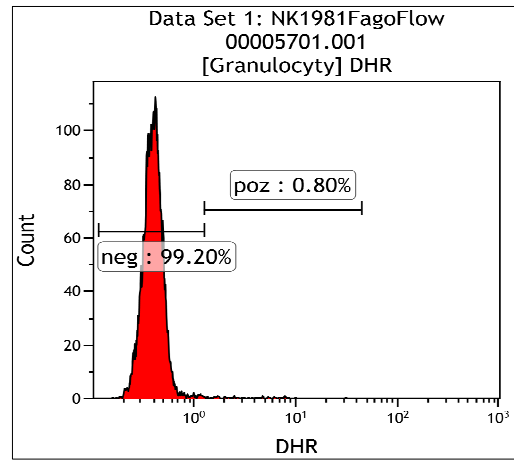
u pacienta s patologickým respiračním vzplanutím -

6A, 6B - stimulace *E. coli*

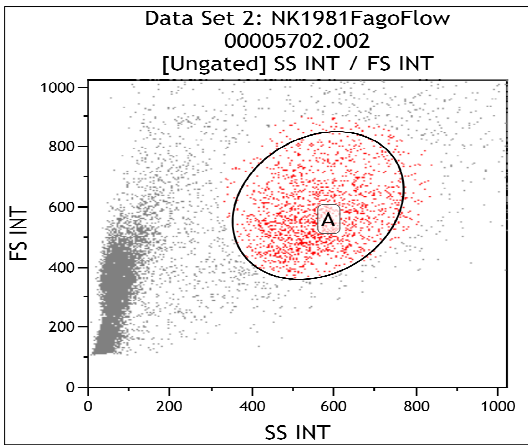
deficit v MPO PS 2008



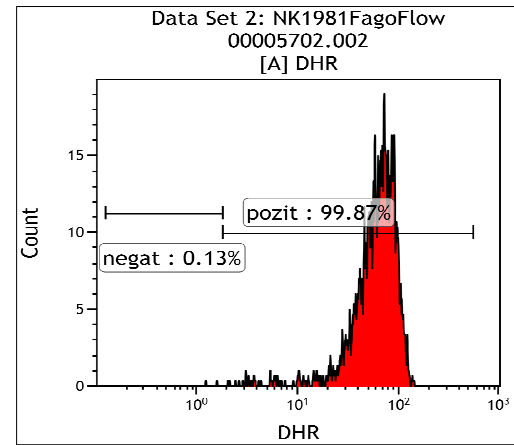
Obr. 1A



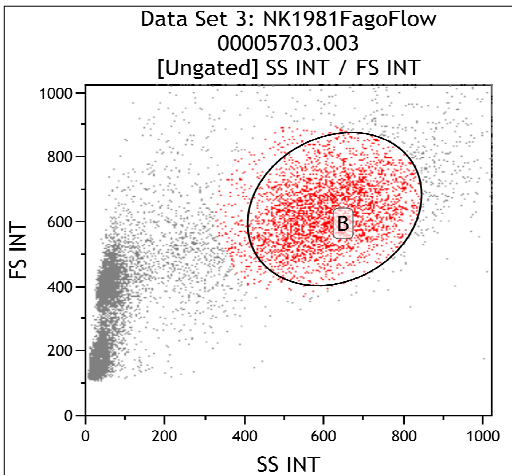
Obr. 1B



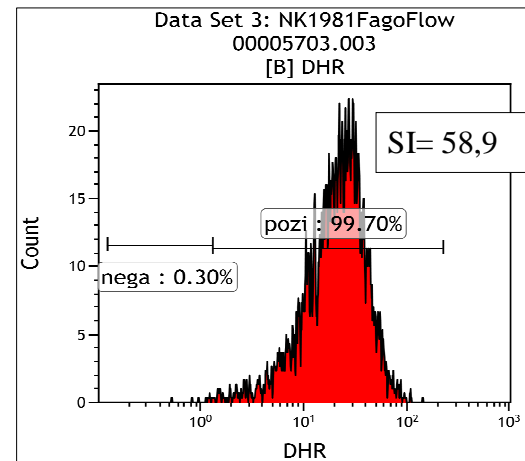
Obr. 2A



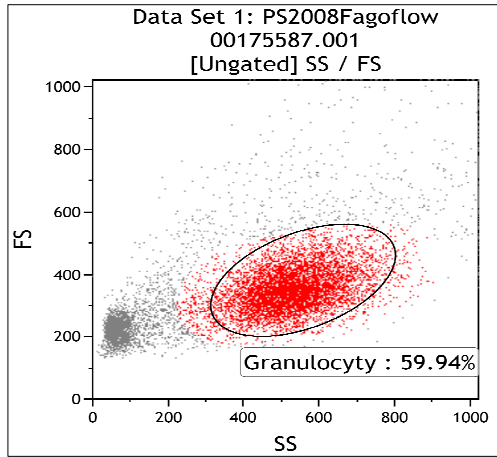
Obr. 2B



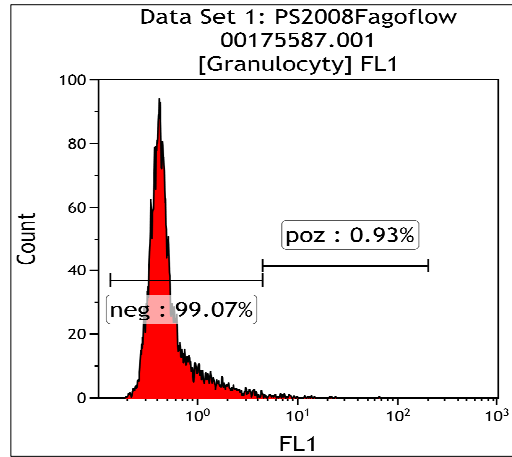
Obr. 3A



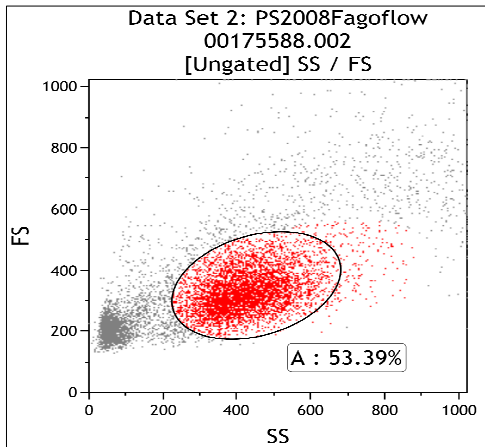
Obr. 3B



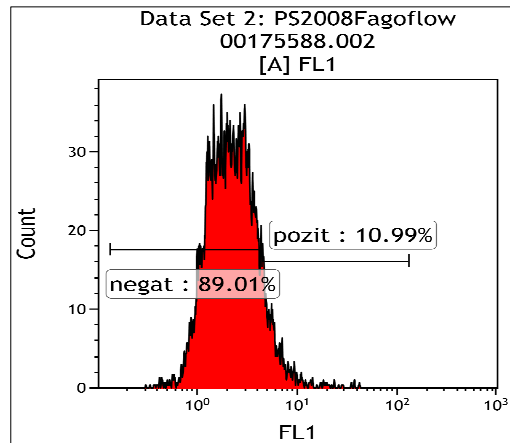
Obr. 4A



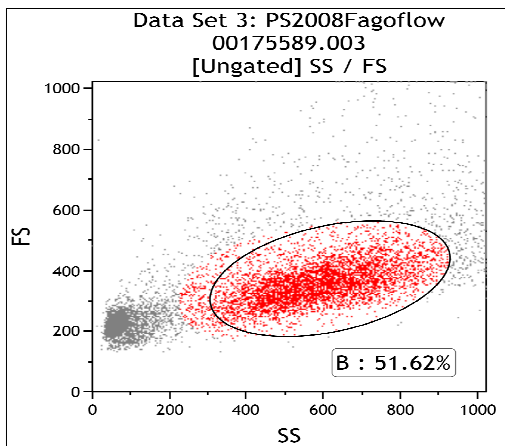
Obr. 4B



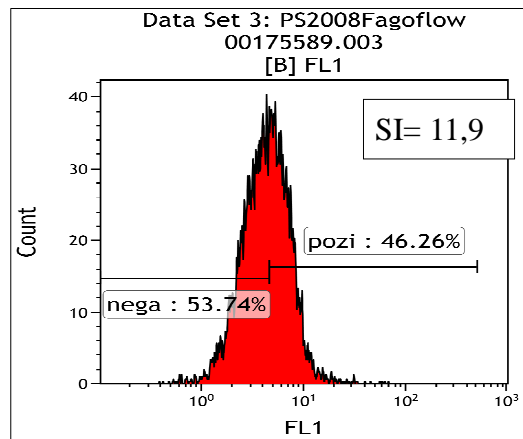
Obr.5A



Obr. 5B



Obr. 6A



Obr. 6B

5. DISKUSE

Základním předpokladem správně provedeného funkčního testu respiračního vzplanutí je dodržení předepsané preanalytické fáze, tedy zejména odběru nesrážlivé krve do vhodného antikoagulantu a času od odběru po zpracování. Pro stanovení respiračního vzplanutí by nesrážlivá krev měla být odebrána do zkumavky s heparinem, jelikož odběr do EDTA nebo citrátu může ovlivnit vyšetření. Tato antikoagulační činidla ruší funkční stanovení tím, že dochází k vyvázání Ca^{2+} iontů, které jsou důležité pro průchod membránou buňky (Příbalový leták od firmy EXBIO). Důležitou roli také hraje včasné dodání vyšetřovaného materiálu do laboratoře. Samotné stanovení tohoto funkčního testu by se mělo provádět do 8 hodin po odběru. Literární zdroje uvádějí, že jednotlivá vyšetření a použité reagentie musí být velmi specifické, aby neovlivnily další důležité procesy v buňce, které mají přímý vliv na oxidační vzplanutí. Například přítomnost látek, které by negativně ovlivnily transkripční faktor NF κ B, který je přímo zodpovědný za syntézu H_2O_2 , by byla velmi nežádoucí (Kaul et al. 1996).

Podle celé řady experimentálních studií může být stanovení oxidačního vzplanutí ovlivněno mnoha látkami, jako jsou například hydroxyperoxy (ROOH) či tert-butylhydroperoxid, které působí na zvýšení koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) působením proteinkinázy C uvnitř buňky, a tím snížení aktivity produkce oxidačních radikálů (Murphy et al., 1995). Ionty jako je Zn^+ a Cd^{2+} jsou zodpovědné za redukci NADPH a tím i zastavení signální dráhy, která vede ke vzniku peroxidu vodíku v aktivované buňce (Murphy et al., 2006). Naopak acetylcholinesteráza, která se dokáže vázat na monózovo-fukusové receptory přítomné na povrchu makrofágů, způsobuje zvýšení aktivity těchto buněk. Jedná se tedy o další signální dráhu, která je schopná aktivovat fagocyty (Klegeris et al., 1996).

Při interpretaci laboratorních výsledků respiračního vzplanutí bychom měli také brát zřetel na to, jestli pacient neprodělává v době vyšetření nějaké infekční onemocnění, jako například pneumonii, bakteriální infekci, sepsi a další. Zdá se, že tato onemocnění by mohla být příčinou „únavy“ granulocytů, která se projeví jako snížení SI respiračního vzplanutí s normálním procentem aktivovaných granulocytů. Proto by bylo velmi přínosné, aby se v těchto případech vyšetření opakovalo a jednoznačně se

stanovilo, zda se jedná o imunodeficienci nebo o přechodné snížení respirační aktivity granulocytů. V případě podezření na imunodeficienci je nutné provést genetické vyšetření na specializovaném pracovišti.

Z celkového počtu vyšetřených pacientů (611) byli jenom 2 pacienti, kteří měli snížený SI za současného výrazného snížení procenta aktivovaných granulocytů. Snížené procento aktivovaných granulocytů stimulovaných PMA a *E. coli* a nízký SI ukazuje na možné závažné onemocnění chronické granulomatózy, která je způsobená mutací genu kódující enzym fagocytární NADPH-oxidázy. V první řadě je ale třeba nejprve vyloučit defekt enzymu MPO, který v rámci imunodeficiencí fagocytózy bývá častější a který se v Burst testu projeví právě výrazně sníženým až negativním SI i procentem aktivovaných granulocytů (Litzma et al., 2007). V rámci naší imunologické laboratoře je možno pomocí průtokové cytometrie ověřit intracelulární přítomnost enzymu MPO v granulocytech specifickou monoklonální protilátkou. Ale i toto onemocnění je třeba nakonec potvrdit genetickým vyšetřením.

U prvního pacienta - ročník 1997 - byl prokázán defekt fagocytózy opakovaným vyšetřením respiračního vzplanutí, které bylo posléze doplněno vyšetřením intracelulární přítomnosti enzymu MPO v granulocytech pomocí monoklonální protilátky. V tomto případě byla zaznamenána velmi nízká exprese MPO. Vyšetření potvrdilo částečný defekt tohoto enzymu ve fagocytech.

Také u pacienta PS 2008 (grafická dokumentace 4A - 6B) byl nakonec prokázán deficit v enzymu MPO. Opět zde byl snížený SI a snížené procento aktivovaných fagocytů stimulovaných PMA a *E. coli*.

U dalších pacientů se sníženým SI se nejednalo o primární defekt fagocytózy, ale vzhledem k normálnímu nebo jen mírně sníženému procentu aktivovaných granulocytů by mohlo jít o sekundární postižení fagocytující aktivity vlivem onkologického onemocnění, případně jeho léčbou.

U malého pacienta- ročník 2006 se SI 8 a normálním procentem aktivovaných granulocytů, bylo vyžádáno a provedeno opakované vyšetření po odeznění akutního infekčního zánětu, které vyloučilo možný imunodefekt. Zde byla snížená respirační aktivita granulocytů pravděpodobně ovlivněna infekcí.

Z výsledků je patrné, že závažné primární defekty v mechanismu fagocytózy jsou velmi vzácné a jejich záchyt bývá většinou již v dětském věku, jelikož se jedná o primární imunodeficienci. Proto má toto vyšetření stěžejní význam u dětí s podezřením na imunodeficienci (Krejsek et al., 2004)

Vyšetření respiračního vzplanutí průtokovým cytometrem je velmi specifické a přesné stanovení. Je zásadní pro potvrzení nebo vyloučení choroby, která je způsobená poruchou fagocytárních funkcí, a to chronické granulomatózní choroby či jiného primárního defektu (Litzman at al., 2007). Pomocí cytometru je zajištěno citlivé a přesné měření počtu neutrofilů, které jsou schopny generovat reaktivní formy kyslíku, a tím odhalit závažné primární imunodefekty nejen v jejich homozygotní, ale i heterozygotní formě a odlišit je tak od přechodných či sekundárních stavů oslabení imunity.

6. ZÁVĚR

V naší imunologické laboratoři se mi podařilo úspěšně zavést metodu Burst testu založenou na detekci respiračního vzplanutí průtokovým cytometrem do rutinní praxe.

Podle předpokladů měla většina vyšetřovaných pacientů fagocyty imunokompetentní, což znamená, že byly schopny produkce kyslíkových radikálů jakožto důležitého baktericidního mechanismu imunitního systému. Ve 2 případech bylo na základě vyšetření respiračního vzplanutí pomocí průtokové cytometrie vysloveno podezření na závažný defekt fagocytózy, který byl následně také potvrzen. Se sníženým SI, který je jedním z parametrů hodnocení respiračního vzplanutí aktivity granulocytů, se setkáváme i u pacientů s přechodným oslabením fagocytózy nejčastěji vlivem infekčního zánětu, onkologického onemocnění či jeho léčbou. U těchto pacientů je však procento aktivovaných fagocytů normální.

Přestože je výskyt poruch fagocytózy nízký, je diagnostika těchto defektů významná zejména u dětských pacientů, u kterých je v rámci diferenciální diagnostiky nutno vyloučit život ohrožující imunodefekt.

7. LITERATURA

ADOLPH, S., SCHOENIGER, A., FUHRMANN, H., J SCHUMANN, J. Unsaturated fatty acids as modulators of macrophage respiratory burst in the immune response against *Rhodococcusequi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012, č. 52, 2246 - 2253.

BAGGIOLINI, M., BOULAY, F., BADWEY, J.A., CURNUTTE, J.T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1993, č. 7, s. 1004-1010.

BARTŮŇKOVÁ, J. *Imunodeficiencie*. Praha: Grada Publishing, a.s, 2002. ISBN 80-247-0244-4.

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. A KOLEKTIV. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada Publishing, a.s, 2005. ISBN 80-247-0691-1.

BONETTA, L. Flow cytometry smaller and better. *Nature Methods*. 2005, č. 2, s. 785-795.

BROWN, E.J., STEINBERG, T.H. Phagocytosis. *Biomembranes. A Multi-Volume Treatise*. 1996, č. 4, s. 33-63.

CELLI, J., FINLAY, B.B. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends in Microbiology*. 2002, č. 10, s. 232-237.

ELBIM, C., RAJAGOPALAN - LEVASSEUR, P., CHOLLET - MARTIN, S., GAILLARD, J.L., FAY, M., HAKIM, J., FISCHER A. : Defective priming of the phagocyte oxidative burst in a child with recurrent intracellular infections. *Microbes and Infection*. 1999, č. 1, s. 581-587.

FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V. *Imunitní systém - informace pro každého*. Grada publishing, a.s., 2005. ISBN 80-247-1196-6.

FUČÍKOVÁ T. *Klinická imunologie v praxi*. Praha: Galén, 1995. ISBN 80-85824-57-4.

GOLDBLATT, D., THRASHERA, J. Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*. 2000, č. 122, s. 1-9.

GÖPFERTO VÁ, D., JANKOVSKÁ, D., DOHNAL, K., MELICHERČÍKOVÁ, V. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena*. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-7254-223-0.

GREENBERG, S., GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2002, č. 14, s. 136-145.

HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.

KAMANI, N.R., DOUGLAS, S.D. Evaluation of phagocytic cell disorders. In: *Leffell MS, Donneberg AD, Rose NR (ed.) : Handbook of Human Immunology, CRC Press*. 1997, s. 319-341.

KAUL, N., FORMAN, H.J. Activation of NF κ B by the respiratory burst of macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, č. 21, s. 401-405.

KLEGERIS, A., MCGEER, P.L. Inhibition of respiratory burst in macrophages by complement receptor blockade. *European Journal of Pharmacology*. 1994, č. 260, s. 273-277.

KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nukleus HK, 2004. ISBN 80-86225-50-X.

KRISKA, T., GAMALEY, I., VASVÁRI, G., HOLLY, S., MALTSEVA, E., STRIZHAK, P., GÁL, D. Quantitative studies on the respiratory burst generated in peritoneal macrophages. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 1999, č. 50, s. 159-165.

LITZMAN, J., FREIBERGER, T., KRÁL, V., THON, V. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.

MODOLELL, M., EICHMANN, K., SOLER, G. Oxidation of NG-hydroxyl-L-arginine to nitric oxide mediated by respiratory burst: an alternative pathway to NO synthesis. *FEBS Letters*. 1997, č. 401, s. 123-126.

MURPHY, J.K., HOYAL, C.R., LIVINGSTON, F.R., FORMAN, H.J. Modulation of the alveolar macrophage respiratory burst by hydroperoxides. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, č. 18, s. 37-45.

MURPHY, R., DECOURSEY, T.E. Charge compensation during the fagocyte respiratory burst. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, č. 1757, s. 996-1011.

NAGAO, G., ISHII, K., HIROTA, K., MAKINO, K., TERADA, H. Role of lipid rafts in innate immunity and phagocytosis of polystyrene latex microspheres, *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*. 2011, č. 84, s. 317-324.

PODSTATOVÁ, H. *Mikrobiologie epidemiologie hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. Olomouc: Epava, 2001. ISBN 80-86297-07-1.

Příbalový leták FagoFlowEx[®] Kit od firmy EXBIO.

RAIDAL, S. L., BAILEY, G.D., LOVE, D.N. Low cytometric determinativ of oxidative burst aktivty of equine periphera lblood and bronchoalveolarl avage-derived leucocytes. *The Veterinary Journal*. 1998, č. 156, s. 117-126.

RIEGER, A.M., HALL, B.E., BARREDA, D.R. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*. 2010, č. 34, s. 1144-1159.

ROLAS, L., MAKHEZER, N., HADJOU DJ, S., EL-BENNA, J., DJERDJOURI, B., ELKRIEF, L., MOREAU, R., PERIANIN, A. Inhibition of mammalian target of rapamycin aggravates the respiratory burst defect of neutrophils from decompensated cirrhotic patiens. *Hepatology*. 2012, in press.

STUART, L.M., EZEKOWITZ, R.A. : Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nature reviews Immunology*. 2008, č. 8, s. 131-141.

UNDERHILL, D.M., GOODRIDGE, H.S. Information processing during phagocytosis. *Nature reviews Immunology*. 2012, č. 12, s. 492-502.

8. KLÍČOVÁ SLOVA

Respirační vzplanutí

Fagocytóza

Imunodeficiencie

Stimulační index

Průtokový cytometr