



Vážené kolegyně a kolegové,

v dnešním vydání laboratorních listů Vám přinášíme podrobné informace o vyšetření respiračního vzplanutí. Příjemné čtení.

VYŠETŘENÍ RESPIRAČNÍHO VZPLANUTÍ MĚŘENÍM OXIDACE DIHYDRORHODAMINU NA RHODAMIN

Fagocytóza je základním mechanismem obrany patřící do vrozené imunity člověka. Jedná se o proces, kdy specializované buňky imunitního systému označované jako profesionální fagocyty pohlcují, usmrcují a rozkládají mikroorganismy a jiné nežádoucí struktury. Mezi profesionální fagocyty patří neutrofilní granulocyty a mononukleární fagocyty. Laboratorní vyšetření fagocytózy má praktický význam při diagnostice chorob, které jsou způsobeny poruchou funkce těchto buněk. Poruchy fagocytózy mohou být vrozené i získané.

V průběhu fagocytózy dochází k výrazné metabolické aktivitě fagocytujících buněk, tento děj se označuje jako respirační vzplanutí, které významně koreluje s mikrobicidní schopností fagocytů. Praktický význam mají testy redukce tetrazoliových solí, chemiluminiscence a **oxidace dihydrorhodaminu na rhodamin měřená průtokovým cytometrem**. Jedná se o tzv. burst test.

Při respiračním vzplanutí dochází ke stimulaci povrchové membrány fagocytů a k aktivaci enzymu NADPH-oxidázy. Při této reakci se zvýšeně spotřebovává kyslík a ten se přeměňuje na reaktivní kyslíkové deriváty se silnými oxidačními vlastnostmi:

1. O_2^- ... superoxidový anion
2. H_2O_2 ... peroxid vodíku
3. 1O_2 ... singletový kyslík
4. $HClO$... kyselina chlorná
5. $OH^\cdot$... hydroxylový radikál

Ústřední úlohu v respiračním vzplanutí zaujímá již zmíněný enzym NADPH-oxidáza. Je to komplex několik složek, které se postupně aktivují a vážou na sebe další enzymatické systémy zejména myeloperoxidázu (MPO).

Klinická indikace:

Pacienti s imunitním deficitem jsou v klinické praxi zachyceni na základě opakovaných infekcí. Mezi nejčastější genetické poruchy přirozené obranyschopnosti patří poruchy fagocytární a zabíječské aktivity neutrofilních granulocytů, monocytů a makrofágů, které bývají způsobeny deficitem myeloperoxidázy (MPO, prevalence není známa), chronickou granulomatózou (CGD, prevalence 1:250 000.) nebo deficitem glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6DP, prevalence není známa). Všechny tyto nedostatky vedou k vážným chronickým infekcím, které jsou odolné proti standardní léčbě. Fagocyty nejsou schopny účinně zničit intracelulární i pohlcené extracelulární patogeny, buď kvůli poruše ingesce partikulí nebo **kvůli snížené intenzitě respiračního vzplanutí**.

CGD je různorodá skupina genetických onemocnění s deficitem ve více enzymech kaskády NADPH oxidázy vytvářející reaktivní kyslíkové radikály. Aktivní NADPH oxidáza zdravého jedince katalyzuje reakci NADPH s kyslíkem a produkuje $NADP^+$ a superoxidový radikál O_2^- , který prochází řadou dalších reakcí vedoucích k produkci singletového kyslíku a peroxidu vodíku, který je transformován myeloperoxidázou. Pacienti s CGD trpí nejen opakujícími se infekcemi, ale též nadměrnými zánětlivými neinfekčními stavy.

Deficit MPO má za následek kvantitativní nebo funkční nedostatek následného generování hydroxylových radikálů a chlornanu z peroxidu vodíku enzymem myeloperoxidázou. Chlornan je považován za hlavní zabíječ patogenů při respiračním vzplanutí.



Zelené linky:

800 801 810, 800 801 811 - Praha
800 224 499 - České Budějovice

 www.citylab.cz

Enzym G6PD se účastní dráhy hexaza monofosfátu, tedy jednoho z hlavních procesů tvorby NADPH. Snížená aktivita G6PD je spojena s chronickou nesférocytickou hemolytickou anémií, může též způsobit snížení respiračního vzplanutí fagocytů. V tomto případě jsou příznaky podobné s CGD.

Všechny výše uvedené nemoci spojené s fagocytární funkcí ilustrují důležitou roli fagocytů při odstraňování a usmrcování patogenů pro udržení homeostázy organismu.

Vyhodnocení testu

Z naměřených dat jsou vyhodnocovány dva parametry, které indikují podezření na poruchu respiračního vzplanutí:

- a) Procentuální zastoupení pozitivních granulocytů, které vykazují respirační vzplanutí po stimulaci bakteriemi *E. coli*.

Po stimulaci *E. coli* se všechny granulocyty účastní respiračního vzplanutí. V některých případech může pacient zdědit od jednoho rodiče nefunkční granulocyty. Potom se na obrázku, kde jsou buňky stimulované *E. coli*, objeví dva píky.

- b) Stimulační index, který představuje poměr MFI pozitivních granulocytů stimulovaného vzorku a MFI negativních granulocytů negativního kontrolního vzorku.

Stimulační index slouží pro přibližné porovnání intenzity respiračního vzplanutí mezi jednotlivými vzorky krve. Stimulační index je ovlivněn experimentálními podmínkami v laboratoři a nastavením průtokového cytometru.

Odběr:

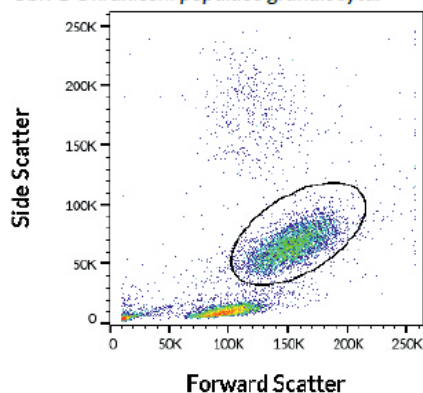
- Vzorek žilní krve odebrat do heparinu.
- Vzorek uchovávat při pokojové teplotě (nechladit ani nemrazit).
- Do laboratoře dodat v co nejkratším čase.

Prosíme o dodržení preanalytické fáze.

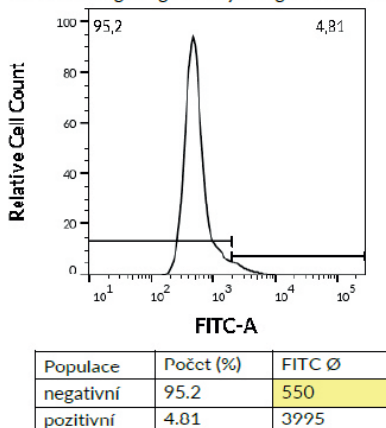
Dodání do laboratoře:

- Vyšetření je prováděno každý den od pondělí do čtvrtka.
- Vyšetření se neprovádí v pátek a den před státním svátkem (jedná se o funkční test).

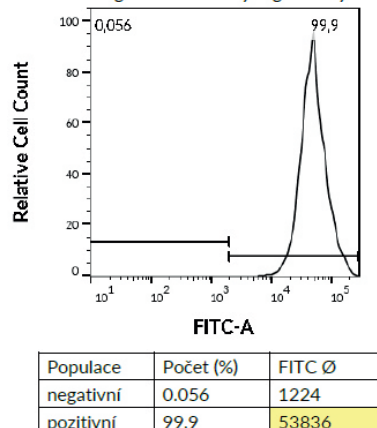
Obr. 1 Ohraničení populace granulocytů.



Obr. 2b Histogram granulocytů negativní kontroly.



Obr. 2c Histogram stimulovaných granulocytů.



Vypracovala: RNDr. Alena Sekerková

Literatura:

1. de Oliveira-Junior EB. Scand J Immunol. 2011;73(5):420-7. Song E. Clin Mol Allergy. 2011; 31;9(1):10.
2. Kuijpers T. Cell Mol Life Sci. 2012;69(1):7-15.
3. Klebanoff SJ. J Leukoc Biol. 2005;77(5):598-625.
4. van Bruggen R. Blood. 2002;100(3):1026-30.



Zelené linky:

800 801 810, 800 801 811 - Praha
800 224 499 - České Budějovice

 www.citylab.cz