

Fagocytóza mikročástic makrofágy - [F]

(Kateřina Slaninová, Denisa Lizoňová)

1. Úvod

Fagocytóza představuje jeden z klíčových mechanismů nespecifické imunity a hraje fundamentální roli v homeostáze organismu. Jedná se o aktivní proces, při kterém specializované buňky, tzv. profesionální fagocyty (zejména makrofágy, dendritické buňky a neutrofily), pohlcují částice větší než 0,5 μm . Cílem této úlohy je charakterizovat funkční stav nasazených makrofágů prostřednictvím vizualizace a kvantifikace jejich schopnosti internalizovat exogenní částice v reálném čase.

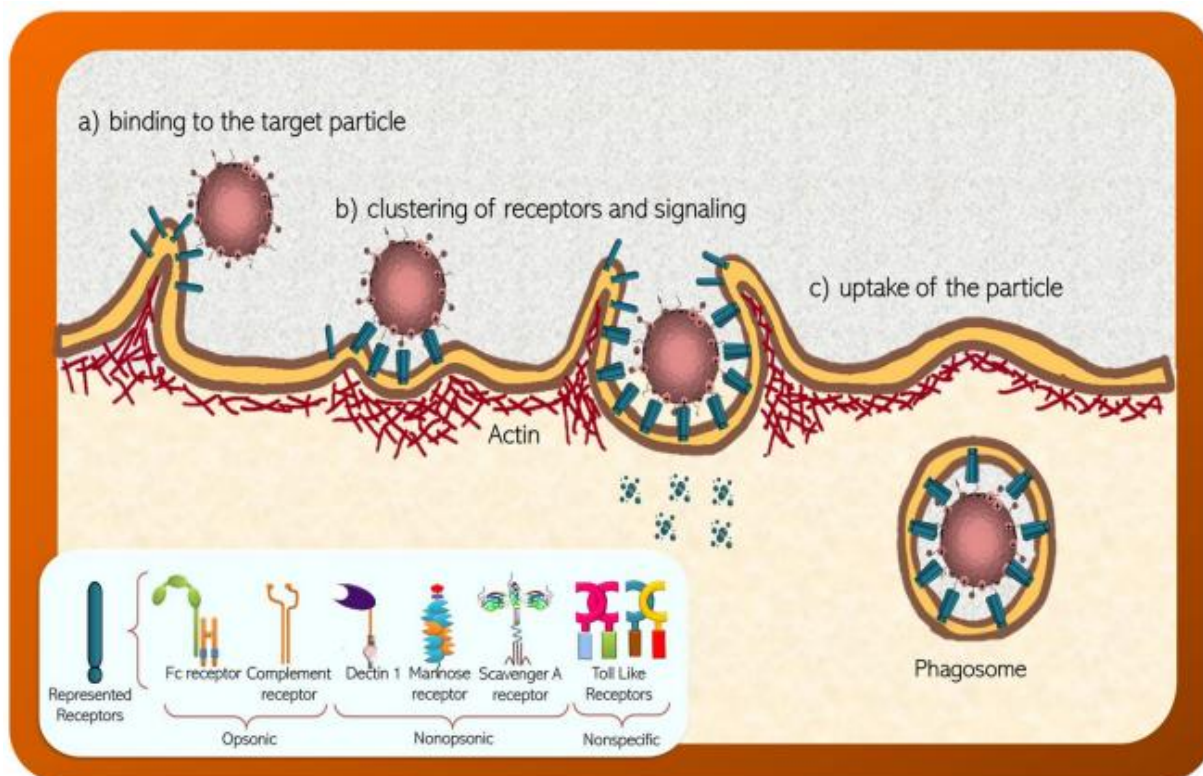
V této úloze budou studenti studovat fagocytózu mikročástic makrofágy pomocí fluorescenční mikroskopie, pro pochopení vztahu mezi povrchovými vlastnostmi částic a rychlostí jejich vychytávání do makrofágů.

2. Teorie

Fagocytóza

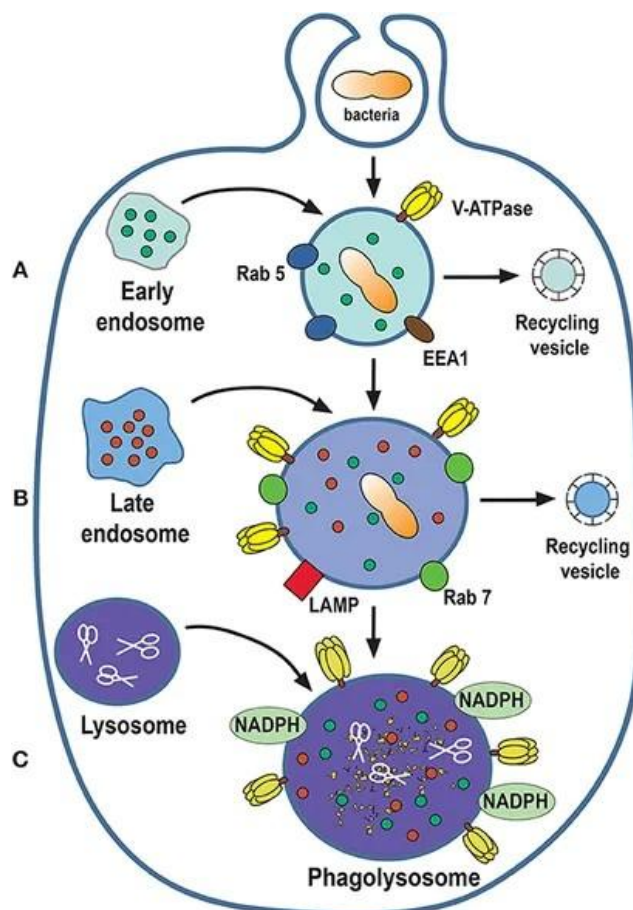
Fagocytóza je proces, při kterém buňky, zejména makrofágy a neutrofily, pohlcují cizorodé částice, mikroorganismy nebo apoptické buňky. Podle toho, jaké receptory jsou zapojeny, lze fagocytózu rozdělit na tři základní typy: **opsonickou, neopsonickou a nespecifickou** [1].

1. **Opsonická fagocytóza** probíhá tehdy, když jsou částice „označeny“ opsoniny – tedy protilátkami nebo komplementem. Specifické receptory na povrchu fagocytů, například Fc receptory a komplementové receptory, rozeznají tyto značky a usnadní internalizaci částice. I některé integriny na neprofesionálních fagocytech mohou pohlcovat opsonizovaná apoptická tělesa.
2. **Neopsonická fagocytóza** je proces, kdy fagocyty rozpoznávají částice přímo, bez předchozího označení. Typickými receptory jsou například C-typ lektinové receptory (**Dectin 1, mannóзовé receptory**) nebo scavengerové receptory, které rozpoznávají určité molekulární vzory na povrchu mikroorganismů či apoptických buněk.
3. **Nespecifická fagocytóza** se může uskutečnit prostřednictvím tzv. pattern recognition receptorů, například Toll-like receptorů (TLR). Tyto receptory přímo nerozpoznávají opsoniny, ale detekují typické molekulární vzory patogenů (PAMPs), jako jsou lipopolysacharidy (LPS - biofilm bakterií) nebo nukleové kyseliny a podporují fagocytózu ve spolupráci s neopsonickými receptory.



Obrázek 1 Zjednodušený proces fagocytózy částic [1]

V případě glukánových částic a zymosanu jsou využity neopsonické receptor Dectin 1 a receptor mannózy (MR), které rozpoznávají β -glukan a mannan. Po navázání ligandů dochází k přestavbě aktinového cytoskeletu, která vede k tvorbě výběžků plazmatické membrány tzv. **pseudopodií**. Tyto výběžky postupně obklopí částici a uzavřou ji do vnitrobuněčného měchýřku zvaného fagosom, který sám o sobě ještě nemá schopnost obsah degradovat.



Obrázek 2 Zrání (maturation) fagosomu [2]

Tuto schopnost získává postupně během procesu **maturace fagosomu** (Obrázek 2). Během této fáze fagosom putuje směrem do nitra buňky a postupně fúzuje s časnými endozomy (early endosomes), pozdními endozomy (late endosomes) a nakonec s lysozomy, čímž vzniká **fagolysozom**. Tyto kroky jsou nezbytné pro okyselení vnitřního prostoru fagosomu a pro aktivaci enzymatické degradace pohlceného materiálu [2].

Během maturace fagosom získává:

- **protonové pumpy (V-ATPázu)** —> okyselení lumen
- **hydrolytické enzymy** (katepsiny, proteázy, lipázy, lysozym) – štěpí makromolekuly
- **antimikrobiální molekuly** (př. NADPH oxidázu) – produkují reaktivní formy kyslíku (ROS)
- **schopnost účinně destruovat patogeny a buněčné zbytky**

Maturace fagosomu je přesně regulována molekulami na jeho membráně. Malé GTPázy **Rab5** a **Rab7** určují, s jakou organelou fagosom fúzuje, **SNARE proteiny** zajišťují fyzické splnutí membrán, **tetheringové komplexy** (např. EEA) přibližují membrány k sobě a **fosfoinositidy** (PI(3)P) vytvářejí rozpoznávací signály, které usměrňují fúzi.

Nízké pH a enzymatická výbava fagolysozomu umožňují efektivní degradaci pohlceného materiálu a zároveň podporují produkci reaktivních forem kyslíku, což je klíčové pro buněčnou obranu a udržování homeostázy [2].

Částice

Pro využití částic jako nosičů léčiv ve farmaceutické průmyslu je důležité pochopit, jak jejich fyzikálně-chemické vlastnosti ovlivňují distribuci v těle. Základní vlastností je velikost částice. Částice menší než 15 nm jsou rychle filtrovány ledvinami, částice mezi 15-200 nm jsou vychytávány jaterními buňkami (Kupfferovy buňky) a makrofágy ve slezině a částice mezi 200-500 nm zůstávají v červené dřeni sleziny [3]. Se zvyšující se velikostí částic se snižuje cévní permeabilita. Dalším důležitým parametrem je tvar částic. Změnou tvaru je možné potlačit, ale i podpořit fagocytózu částic, ovlivnit biodistribuci a jejich interakci s buňkami. Zkoumání vlivu tvaru částic bylo inspirováno širokým portfoliem morfologií virů a bakterií v přírodě. [4, 5].

Velký význam při fagocytóze mají vlastnosti povrchu částic, protože určují, jak částice interaguje s makromolekulami a buňkami v biologickém prostředí. Elektrický náboj, hydrofilita a přítomnost specifických ligandů nebo povrchových úprav ovlivňují nejen efektivitu pohlcení částic profesionálními i neprofesionálními fagocyty, ale také jejich osud a distribuci v těle po aplikaci různými cestami [6, 7].

V experimentální imunologii se k vyvolání fagocytární odpovědi využívají standardizované částice odvozené z buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

- **Zymosan:** Jedná se o komplexní, nerozpustný preparát tvořený směsí β -glukanů, mannanů a proteinů. Pro makrofágy představuje silný stimulační signál, neboť kromě jiného obsahuje vysokou hustotu molekulárních vzorců spojených s patogeny (PAMPs), které aktivují široké spektrum buněčných receptorů (Dectin-1, MR a TLR2).
- **Glukanové částice (GP):** Jsou vysoce purifikované duté mikro-sféry tvořené primárně β -1,3-D-glukanem. GP slouží jako modelový systém pro studium interakcí specificky s receptorem Dectin-1 a díky své uniformní velikosti a struktuře umožňují přesnější kvantifikaci fagocytární kapacity buňky.

V této úloze jsou zymosanové částice kojgovány s pH-senzitivním barvivem pHrodo™. Na rozdíl od konvenčních fluoroforů je intenzita fluorescence pHrodo™ nepřímo úměrná pH okolního prostředí. Zatímco při neutrálním pH média (pH ~7,4) barvivo nevykazuje téměř žádnou fluorescenci, při vstupu do kyselého prostředí fagolysozomu se jeho fluorescenční signál mnohonásobně zesílí. Tato vlastnost umožňuje specificky detekovat pouze internalizované částice a eliminuje falešně pozitivní výsledky způsobené částicemi, které jsou na buňku pouze neaktivně adharovány zvenčí.

K vizualizaci procesu fagocytózy se využívá principu fluorescence, tedy schopnosti určitých molekul (fluoroforů) absorbovat světlo o kratší vlnové délce (excitace) a následně jej vyzářit o vlnové délce delší (emise).

Fluorescence je typ luminiscence, při které dochází k emisi světla látkou (fluoroforem) v důsledku předchozí absorpce elektromagnetického záření. Tento proces lze rozdělit do tří základních fází, které probíhají v řádech nanosekund.

1. **Excitace:** Foton dopadajícího světla z externího zdroje (např. laseru nebo rtuťové výbojky mikroskopu) je absorbován fluoroforem. Tím dojde k přechodu elektronu z energeticky základního stavu (S_0) do stavu excitovaného (S_1).
2. **Doba životnosti v excitovaném stavu:** V tomto krátkém okamžiku (typicky 1-10 ns) dochází k částečné ztrátě energie v důsledku vnitřní konverze a kolizi s molekulami okolního prostředí (vibrační relaxace).
3. **Emise:** Elektron se vrací do základního energetického stavu, přičemž zbývající energii vyžáří ve formě fotonu.

Klíčovým jevem pro fluorescenční mikroskopii je Stokesův posun. Jelikož fluorofor během doby života v excitovaném stavu část přijaté energie ztrácí (tepelná ztráta), má emitovaný foton vždy nižší energii než foton absorbovaný. Podle Planckova vztahu

$$(E = h \cdot \frac{c}{\lambda})$$

platí, že nižší energie odpovídá delší vlnové délce.

V praxi to znamená, že emitované světlo má jinou barvu než světlo excitační (např. buňku osvítime modrým světlem, ale ona září zeleně). Tento posun vlnových délek umožňuje pomocí optických filtrů v mikroskopu oddělit budící záření od mnohem slabšího signálu emitovaného vzorkem, čímž získáme vysoce kontrastní obraz na tmavém pozadí.

3. Cíl práce

Budeme studovat fagocytózu fluorescenčních mikročástic (Phrodo-zymosan a glukonové částice) makrofágy pomocí mikroskopie a obrazové analýzy.

4. Popis zařízení

Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop (Obrázek 3) je optické zařízení umožňující pozorování (Obrázek 4) biologických vzorků označených fluorescenčními barvivy (fluorofory), které po excitaci světlem o určité vlnové délce emitují světlo o delší vlnové délce.



Obrázek 3 Fluorescenční mikroskop Nikon ECLIPSE LV100D s laserem ZYLA



Obrázek 4 Popis mikroskopu Nikon ECLIPSE LV100D

Fluorescenční mikroskop využívá (Obrázek 5):

- Zdroj excitačního světla
- Excitační filtr, který propouští pouze světlo požadované vlnové délky
- Dichroické zrcadlo, které odráží excitační světlo směrem ke vzorku
- Emisní filtr, který propouští pouze fluorescenční světlo vyzářené vzorkem

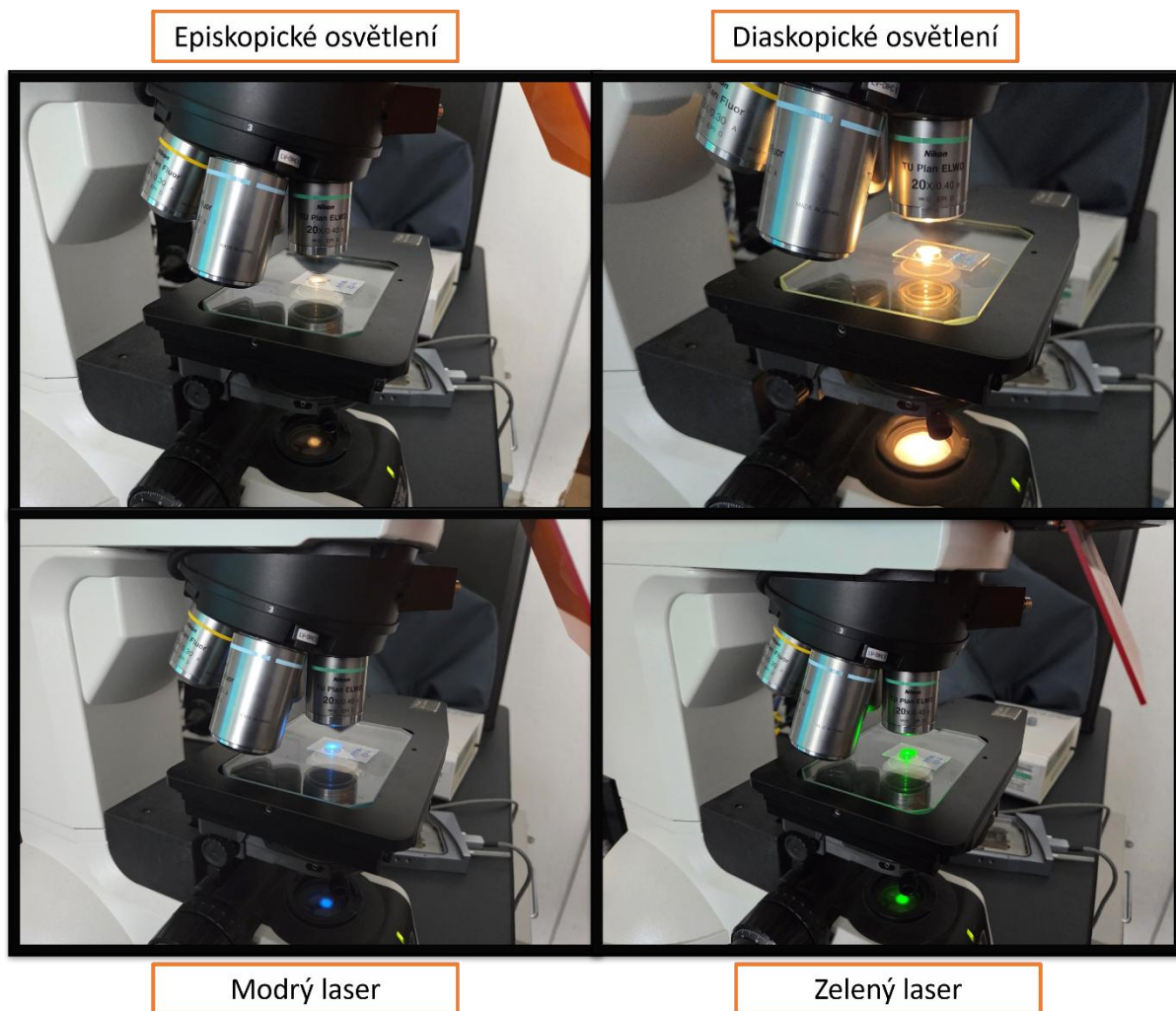


Obrázek 5 Popis ovládání nastavení mikroskopu

Fluorofory ve vzorku přejdou po pohlcení excitačního světla do excitovaného stavu a při návratu do základního stavu emitují světlo s delší vlnovou délkou (Stokesův posun), které je zachyceno objektivem a pozorováno okulárem nebo kamerou. Vzorky mohou být fixované nebo živé, při použití vhodných barviv a podmínek.

Zásady práce:

- Vzorek musí být fluorescenčně označen vhodným fluoroforem.
- Používá se správná kombinace filtrů odpovídající danému fluoroforu (Obrázek 6).
- Pracuje se s minimální nutnou intenzitou světla, aby se omezilo fotoblednutí.
- Nejprve se zaostří ve světelném poli, poté se přepne do fluorescenčního režimu.
- Po ukončení práce se světelný zdroj vypne.



Obrázek 6 Ukázka různých zdrojů světla fluorescenčního mikroskopu

5. Postup práce

Studium fagocytózy a obrazová analýza

Na mikroskopických preparátech budeme studovat fagocytózu fluorescenčních mikročástic pomocí mikroskopie a obrazové analýzy.

Potřebné nádobí a zařízení:

Mikroskopické a podložní sklíčko

Pipeta

Fluorescenční mikroskop

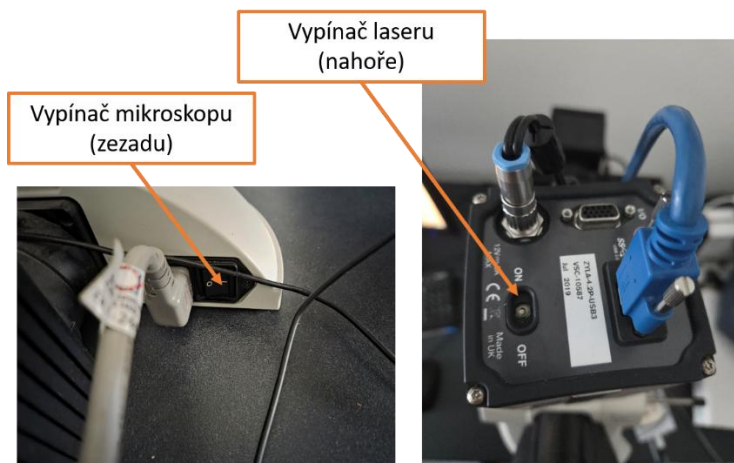
Potřebné chemikálie:

Kultivační médium

Fluorescenční částice (pHrodo Zymosan a glukonové částice)

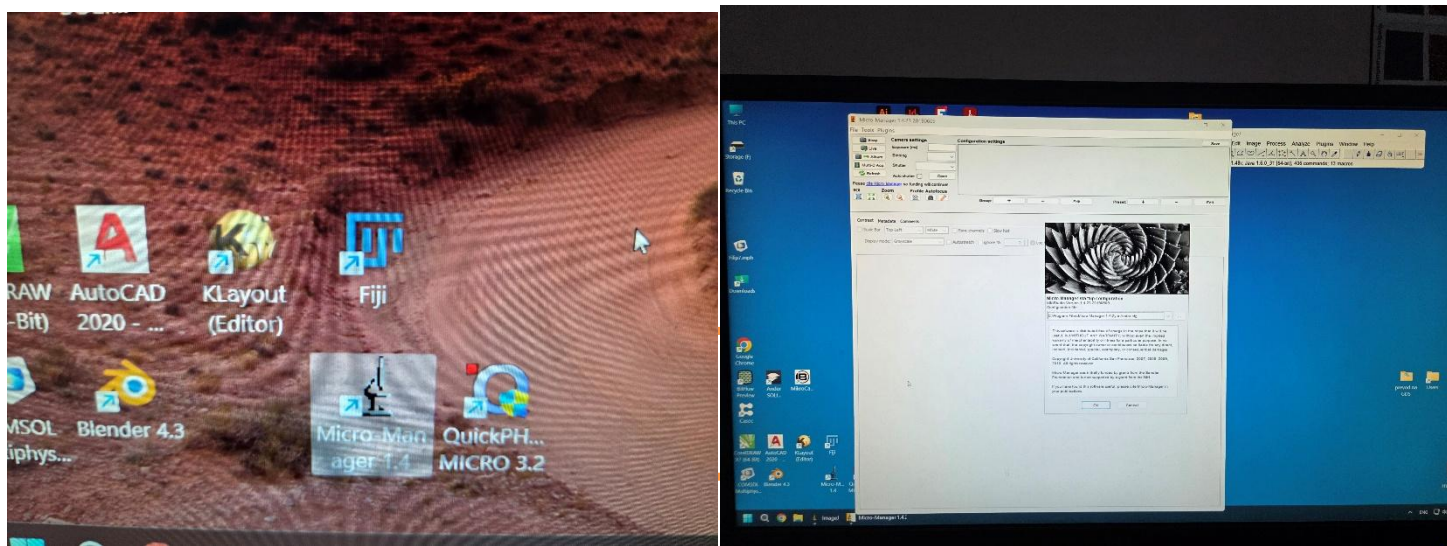
Postup:

1. K připravené suspenzi buněk z úlohy *Práce s buněčnými kulturami ve sterilních podmínkách* – [BK] p5id8te fluorescenční mikročástice. Destičky umístíte do inkubátoru (37°C) na 1-2h a mezitím analyzujete 24h vzorky z předchozího dne.
Pozn.1: Při práci s fluorescenčními reagenty je třeba pracovat ve tmě (stačí zhasnout), aby nedocházelo k zbytečnému vysvěcování (fotoblednutí).
Pozn.2: Výsledky je možné sledovat i v jiných časech.
2. Odeberte vzorek z destičky, který napipetujete na podložní sklíčko a přikryjete mikroskopickým sklíčkem. Pokud máte více systémů s různými podmínkami, připravíte si pro každý z nich samostatný preparát.
3. Mikroskopické preparáty budete pozorovat na fluorescenčním mikroskopu - pHrodo™ Red Zymosan BioParticles™ Conjugate nejsou vně buňky fluorescenční, fluorescence je aktivována až v kyselém prostředí fagosomů ($\lambda_{\text{ex}}=560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=585 \text{ nm}$). Glukonové částice nejsou sami o sobě fluorescenční, v této úloze však budou fluorescence označeny (informace o značení získáte od asistenta).
4. Zapnete mikroskop a laser (Obrázek 7). POZOR!: Je nutné nejprve zapnout mikroskop a laser a až poté spustit program Micro-Manager 1.4 na PC, jinak nedojde k propojení s mikroskopem. POZOR!!: Laser nesmíte zapomenout na konci měření vypnout, používáním se zkracuje jeho životnost.



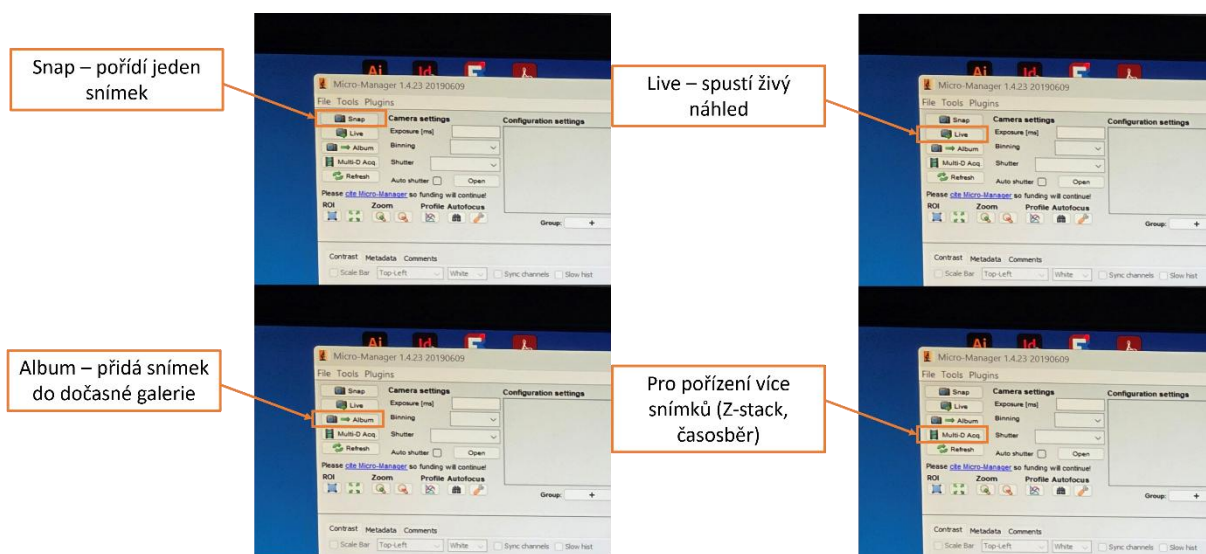
Obrázek 7 Zapínání mikroskopu a laseru

5. Otevřete program Micro-Manager 1.4 na ploše PC (Obrázek 8). Automaticky se otevře i program ImageJ na obrazovou analýzu (Micro.Manager běží jako plugin v ImageJ, ale má vlastní ovládací okno).



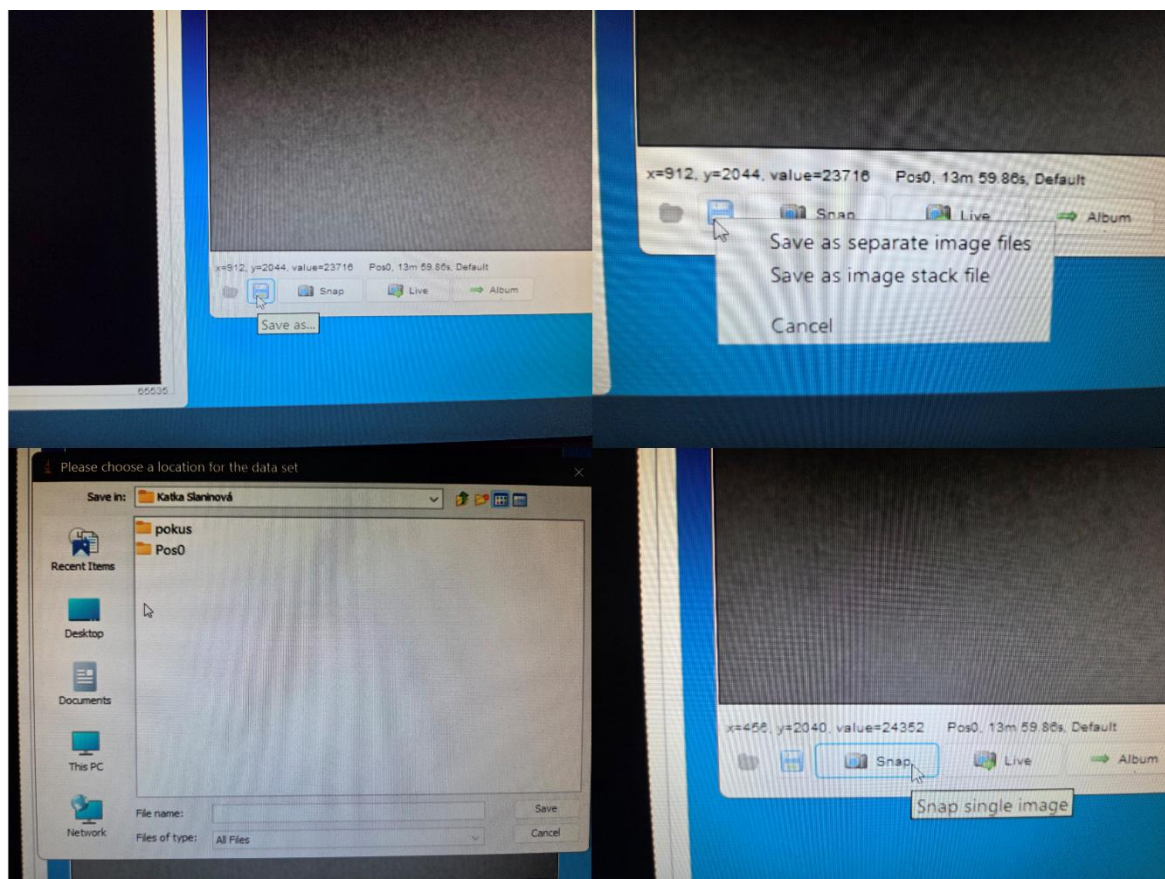
Obrázek 8 Program Micro-Manager (a ImageJ) na ovládání mikroskop a analýzu snímků

6. V programu je možné sledovat live image z mikroskopu, pořizovat snímky a ukládat je pro pozdější úpravy a analýzu (Obrázek 9).



Obrázek 9 Hlavní ovládací panel

7. Live image z mikroskopu se otevře v novém okně (Obrázek 10), ve kterém se znovu nachází stejné příkazy jako v hlavním ovládacím panelu (snap, live, album a save). Vytvoříte si složku, do které budete ukládat pořízené obrázky. V původním okně uvidíte histogram, který vám usnadní zaostření.



Obrázek 10 Postup uložení snímku

8. Data ve formátu .tif budete analyzovat a upravovat v ImageJ. Nejprve si snímky upravte a odeberte šum. Pomocí Prahování (Threshold) si zvýrazníte pHrodo částice, které poté můžete analyzovat pomocí Analyze > Analyze Particles > Add to Manager > získáte seznam nalezených částic. Z ROI Manageru pak spočítáte počet částic připadajících na jednoho makrofága.
9. Dále můžete sledovat vliv pH na pHrodo částice. Phrodo částice zvyšují jas s klesajícím pH. V ROI Manager > Measure > Mean Graz Value (průměrný jas) – čím vyšší hodnota, tím kyslejší ("zralejší") je fagozom.
10. Možnost sledování kinetiky v čase. Pořízení časosběru (video) > Plugins > Stacks > Plot Z-axis Profile, sledujete jak se v čase zvyšuje jas v místě, kde makrofág pohltil zymosan.
11. V protokolu by se měly nacházet tyto údaje: kolik částic makrofág snědl (Analyze Particles), jak moc je fagozom kyselý (Measure > Mean Graz Value), velikost fagozomů/shlukovaných částic (Measure > Area).

6. Zpracování výsledků

Proveďte obrazovou analýzu mikroskopických preparátů. Přiložte obrázky a diskutujte rozdíly ve fagocytovaném podílu částic (př. mezi různými buněčnými liniemi, mezi různými částicemi, mezi částicemi s úpravou povrchu, po různých časových intervalech). Uveďte postup ředění mikročástic na požadovanou koncentraci (výpočet).

7. Bezpečnostní pokyny

Nedívejte se přímo do laseru, hrozí poškození zraku.

8. Kontrolní otázky

Co je to fagocytóza?

Na jakém principu funguje fluorescenční mikroskopie?

Jak probíhá degradace částic a MO uvnitř makrofágů?

Co je to zymosan a glukonové částice?

Jaké vlastnosti částic ovlivňují jejich fagocytózu a transport v lidském těle?

Symboly a zkratky

Literatura

1. Moreno-Mendieta, S., et al., *Understanding the Phagocytosis of Particles: the Key for Rational Design of Vaccines and Therapeutics*. Pharmaceutical Research, 2022. **39**(8): p. 1823–1849.
2. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1066.
3. Hoshyar, N., et al., *The effect of nanoparticle size on pharmacokinetics and cellular interaction*. Nanomedicine, 2016. **11**(6): p. 673–692.
4. Tabei, Y., et al., *Effect of calcium carbonate particle shape on phagocytosis and pro-inflammatory response in differentiated THP-1 macrophages*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017. **490**(2): p. 499–505.
5. Garapaty, A. and J.A. Champion, *Tunable particles alter macrophage uptake based on combinatorial effects of physical properties*. Bioengineering & Translational Medicine, 2017. **2**(1): p. 92–101.
6. Lizonová, D., et al., *Surface stabilization determines macrophage uptake, cytotoxicity, and bioactivity of curcumin nanocrystals*. International Journal of Pharmaceutics, 2022. **626**.
7. Jeon, S., et al., *Surface Charge-Dependent Cellular Uptake of Polystyrene Nanoparticles*. Nanomaterials, 2018. **8**(12).