



# CHEMILUMINISCENČNÍ TEST

- **MEM:** **1ml** zásobního MEMu + **9ml** destil. H<sub>2</sub>O  
upravit pH – přidat **50μl** NaHCO<sub>3</sub>
- **Luminol:**  
**70μl** NaHCO<sub>3</sub> + **50μl** 0,1 M luminolu + **450μl** připraveného MEMu
- **Luminol 2:**  
**60μl** luminolu naředěného výše + **250μl** připraveného MEMu
- **Pipetovací schéma:**

AKTIVITA	řádky	MEM	luminol	škrob	krev
SPONTÁNNÍ	B,C,D	85 μl	10 μl	x	10 μl
STIMULOVANÁ	E,F,G	75 μl	10 μl	10 μl	10 μl



SPONTÁNNÍ

B

C

D

MEM

85  $\mu$ l

luminol

10  $\mu$ l

škrob

x

krev

10  $\mu$ l

STIMULOVANÁ

E

F

G

MEM

75  $\mu$ l

luminol

10  $\mu$ l

škrob

10  $\mu$ l

krev

10  $\mu$ l

AKTIVITA	řádky	MEM	luminol	škrob	krev
SPONTÁNNÍ	B,C,D	85 $\mu$ l	10 $\mu$ l	x	10 $\mu$ l
STIMULOVANÁ	E,F,G	75 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l



# **FAGOCYTOZA**

O.Tichá, FNuSA



**Fagocytóza je proces pohlcení a degradace částic větších než 0,5  $\mu\text{m}$ .**

→ pohlceným materiálem mohou být cizorodé bakterie, poškozené či odumřelé buňky či jejich části, minerální částičky, atd.

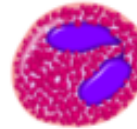


# FAGOCYTUJÍCÍ BUŇKY

neutrofil



eosinofil



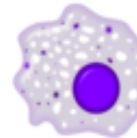
basofil



monocyt



makrofág



dendritická b.

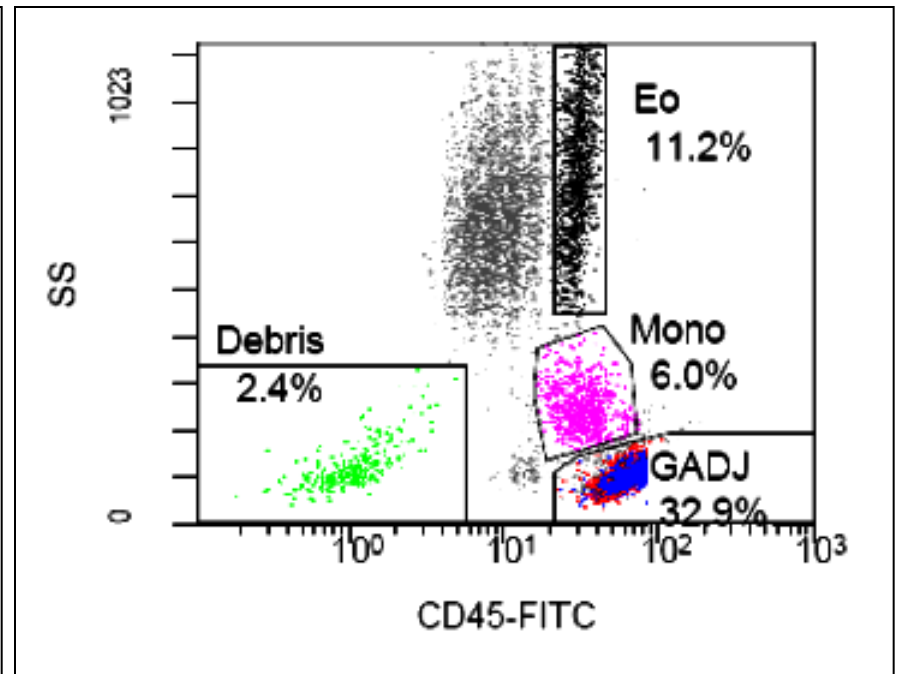
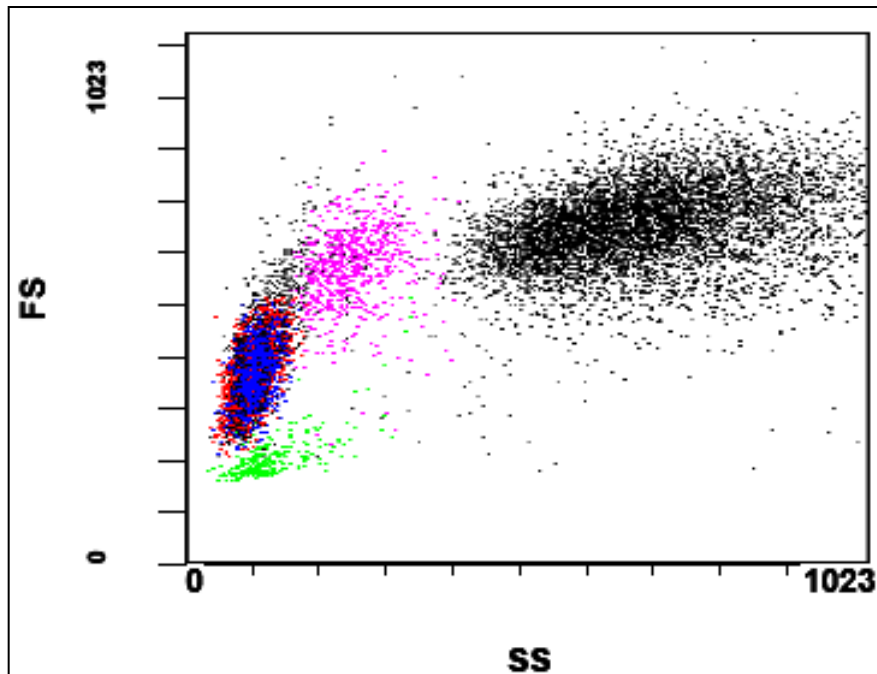


V periférii je cca 7% celkového množství fagocytů, zbytek je v kostní dřeni, odkud se průběžně vyplavují a zároveň doplňují.



# KREVNÍ DIFERENCIÁL

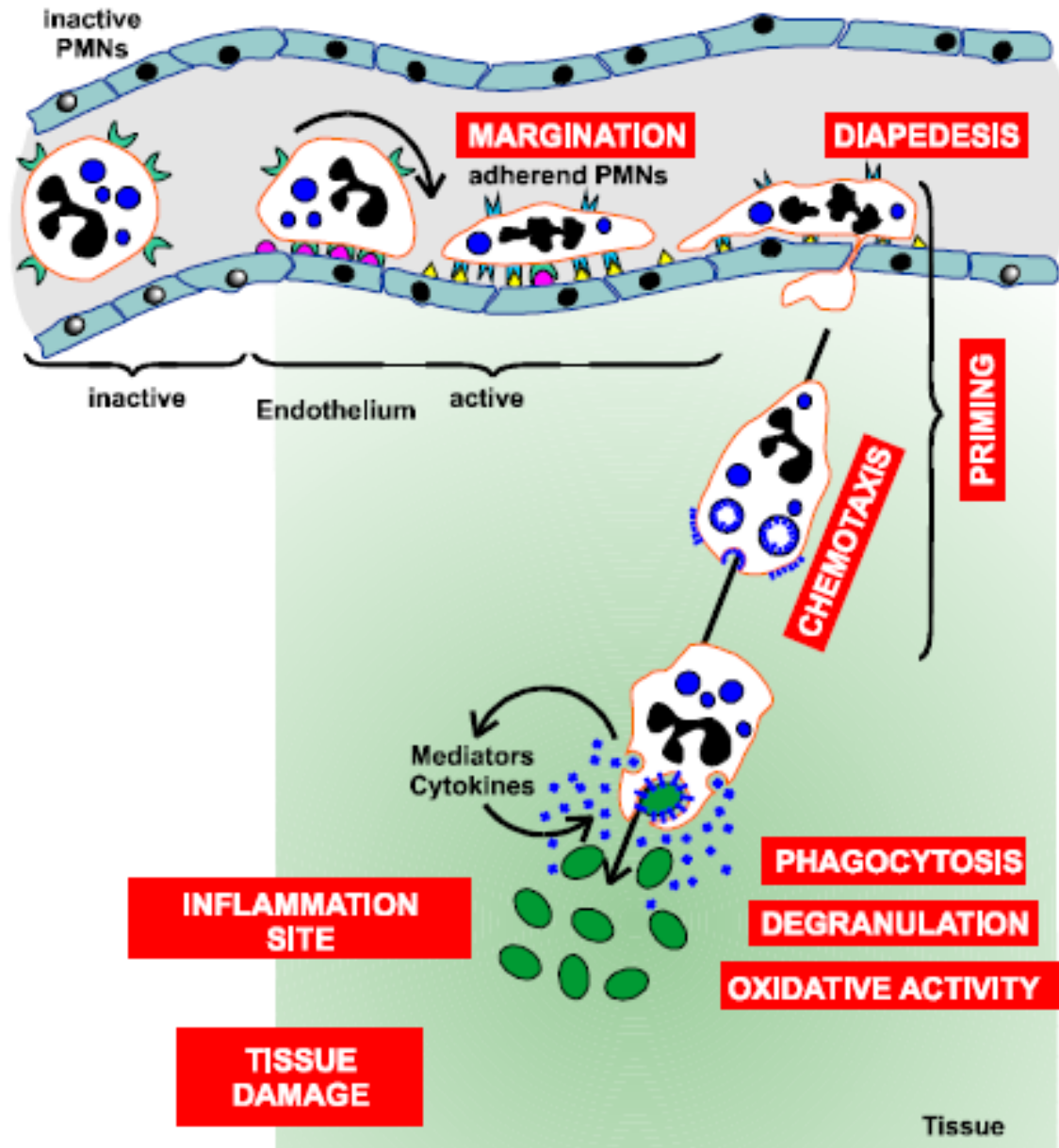
- využití průtokové cytometrie
- s mAb nebo bez nich
- granulocyty tvoří 40-65% všech leukocytů periferní krve



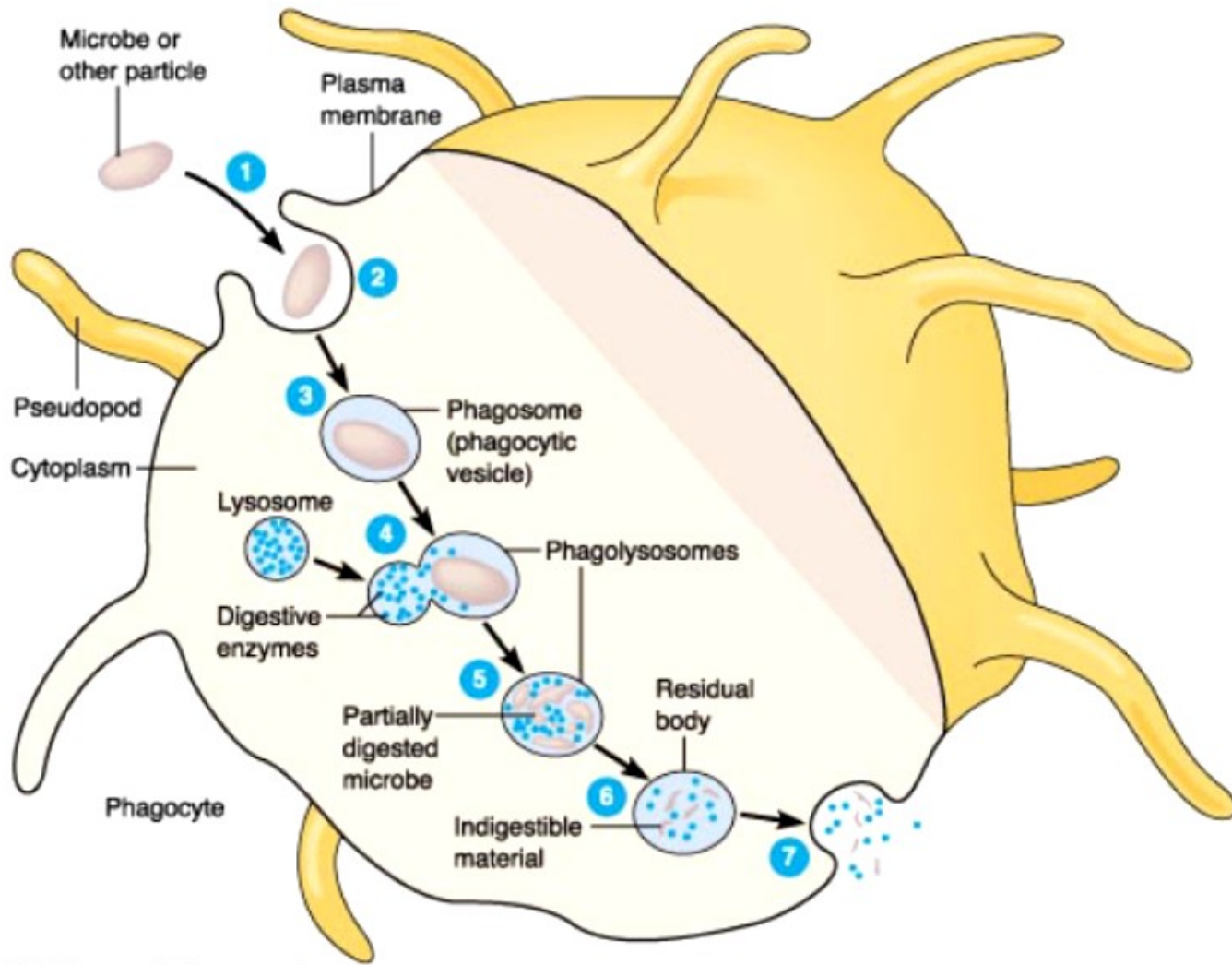


# PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

- ADHEZE („rolling“) → cytometrie – exprese LAD1, LAD2
- EXTRAHAZACE A DIAPEDÉZA
- ROZPOZNÁNÍ OPONIZOVANÝCH ČÁSTIC
- CHEMOTAXE → test migrace pod agarózou
- INGESCE → fagocytóza mikroorganismů nebo inertních částic
- DIGESCE - mechanismus nezávislý na kyslíku
  - mikrobicidní test, detekce enzymů
  - mechanismus závislý na kyslíku
    - mikrobicidní test, NBT, INT, detekce myeloperoxidázy, chemiluminiscenční test, „burst“ test







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

(a) Phases of phagocytosis



# ROZPOZNÁVACÍ MECHANISMY FAGOCYTŮ

Fagocyty jsou schopné rozpoznat struktury, které se nacházejí na povrchu mikroorganismů, ale ne na buňkách vlastních. Tyto struktury jsou evolučně konzervované, sdílené různými mikroorganismy a nezbytné pro jejich život.

## Příklady:

- **LPS** (G-bakterie), **peptidoglykany** (G+ bakterie), **glukany a manany** (kvasinky a plísně)
- **Opsoniny** – komplementové fragmenty (C3b), protilátky (Fc fragment)
- **Fosfolipidy** - na povrchu vlastních apoptotických buněk (za normálních okolností se nacházejí výhradně na vnitřní straně membrány)



# PRO ROZPOZNÁNÍ RŮZNÉ DRUHY RECEPTORŮ

Pro rozpoznání charakteristických mikrobiálních nebo apoptotických komponent slouží fagocytům různé druhy receptorů:

- **manózové receptory** rozeznávající cukerné struktury na povrchu bakterií a některých virů
- scavengerové receptory – rozeznávají acetylované LDL
- chemotaktické receptory (fMLP)
- **Toll-like receptory**
- **komplementové receptory**
- **Fc receptory**



# RESPIRAČNÍ VZPLANUTÍ

Stimulace povrchové membrány fagocytů

– **aktivace NADPH oxidázy** –

zvýšená spotřeba kyslíku a jeho přeměna na reaktivní kyslíkové deriváty

$O_2^-$  ... superoxidový anion

$H_2O_2$  ... peroxid vodíku

$^1O_2$  ... singletový kyslík

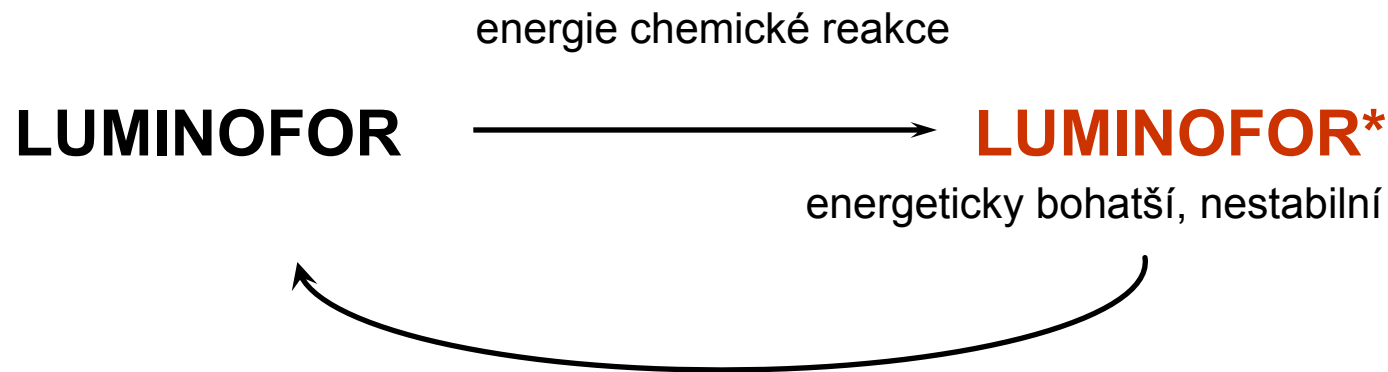
HOCl ... kyselina chlorná

OH $\cdot$  ... hydroxylový radikál

# DETEKCE KYSLÍKOVÝCH DERIVÁTŮ VZNIKLÝCH V PROCESU RESPIRAČNÍHO VZPLANUTÍ



Zesílení přirozené chemiluminiscenční aktivity fagocytů  
přídavkem luminoforu.



Uvolnění přebytečné energie ve formě světelných kvant  
registrovatelných fotonásobičem luminometru.



# TEST CHEMILUMINISCENCE

- **Fagocytující buňky**

plná krev

izolované polymorfonukleární buňky

- **Luminofory**

luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione)

lucigenin (bis-N-methylacridinium nitrát)

- **Aktivita**

spontánní

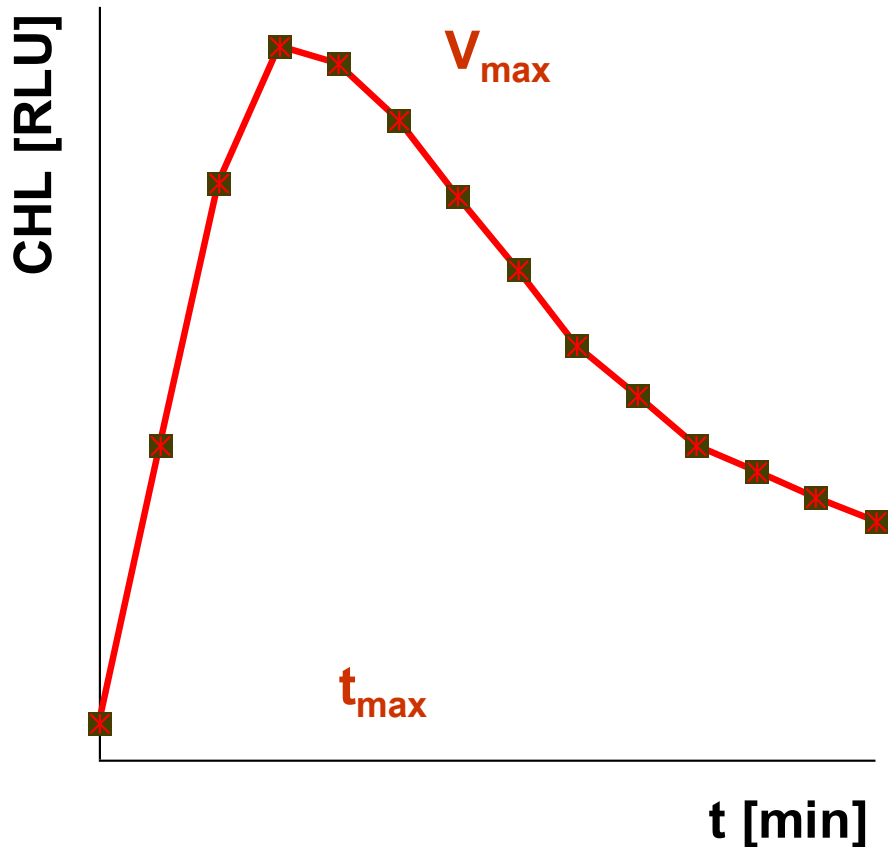
stimulovaná

- **Stimulátory**

korpuskulární: škrob, opsonizovaný zymoza

solubilní: phorbol myristát acetát

# KINETIKA RESPIRAČNÍHO VZPLANUTÍ



- $V_{max}$  ... maximální produkce fotonů
- $t_{max}$  ... čas nutný k dosažení maximální produkce fotonů
- **Hodnota integrované plochy pod křivkou** ... vyjádření celkového množství fotonů vyprodukovaných systémem za definovaných podmínek



# PRACOVNÍ POSTUP

- Odběr venózní krve do heparinu (5j heparinu/1ml krve). Krev 30 min inkubovat v termostatu při 37°C. Materiál zpracovat do 120 min po odběru.
- Krev vyšetřit hematologicky (celkový počet leukocytů, KO).
- U každého pacienta vyšetřit: spontánní aktivitu (bez stimulace) i stimulovanou aktivitu (stimulace 1% rýžovým škrobem).
- Pipetovací schéma:

AKTIVITA	řádky	MEM	luminol	škrob	krv
SPONTÁNNÍ	B,C,D	85 µl	10 µl	x	10 µl
STIMULOVANÁ	E,F,G	75 µl	10 µl	10 µl	10 µl





- Měření chemiluminiscence luminometrem ve 3 minutových intervalech po dobu 45 min při teplotě 37°C.
- Hodnocení výpočtem integrované plochy pro spontánní i stimulovanou aktivitu a její přepoččet na  $10^5$  fagocytujících buněk.
- Výpočet indexu metabolického vzplanutí (IMV).
- Klinický význam vyšetření:
  - diagnostika chronické granulomatózy (defekt NADPH oxidázy )
  - defekt myeloperoxidázy (srovnání chemiluminiscence lucigenin-luminol)
  - vliv léčiv na fagocytózu
  - septické stavy

# DALŠÍ VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY

- **MIKROBICIDNÍ TEST**

- sledování schopnosti fagocytů pohlcovat a usmrcovat živé kvasinky; usmrcené kvasinky se z fagocytů uvolní deoxycholátem a jejich množství se určí obarvením methylenovou modří

- **NBT (INT) TEST**

- při aktivaci fag. vznikají kyslíkové deriváty (peroxid vodíku, superoxidový radikál) – tato aktivita je hodnocena redukcí tetrazoliových solí;
- bezbarvý roztok soli proniká při fagocytóze do buňky, kde je redukován na nerozpustný barevný formazan; při extrakci měřitelný spektrofotometricky.

NBT = nitrobluetetrazolium

INT = iodonitrotetrazolium



# KLINICKÝ VÝZNAM FAGOCYTÓZY

- **Správná funkce** fagocytů je pro organismus nezbytná!!!  
(hlídání adekvátnost zánětlivé reakce na cizorodou částici: cizorodá vs. vlastní)
- Naopak **hyperaktivace fagocytů** – problémy:  
poškození okolních buněk a tkání reaktivními metabolity a proteolytickými enzymy
- **Deficience** ve funkcích fagocytů = těžký průběh banálních infekcí  
příklad: **CGD** (chronická granulomatóza) –  
defektní NADPH oxidáza (častá bakteriální a fungální onemocnění)

