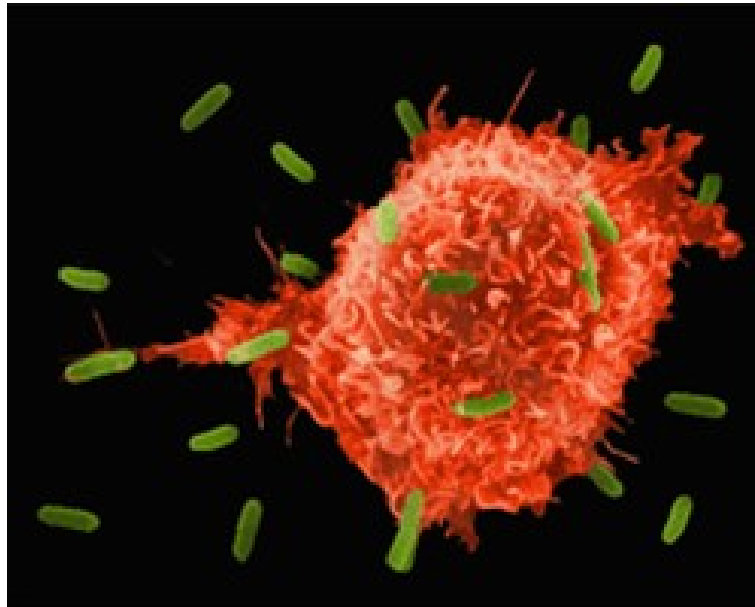


# FAGOCYTOZA





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

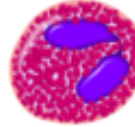
→ pohlceným materiálem mohou být cizorodé bakterie, poškozené, odumřelé buňky či jejich části, minerální částičky, atd.

# FAGOCYTUJÍCÍ BUŇKY

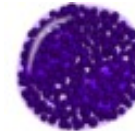
neutrofil



eosinofil



basofil



monocyt



makrofág



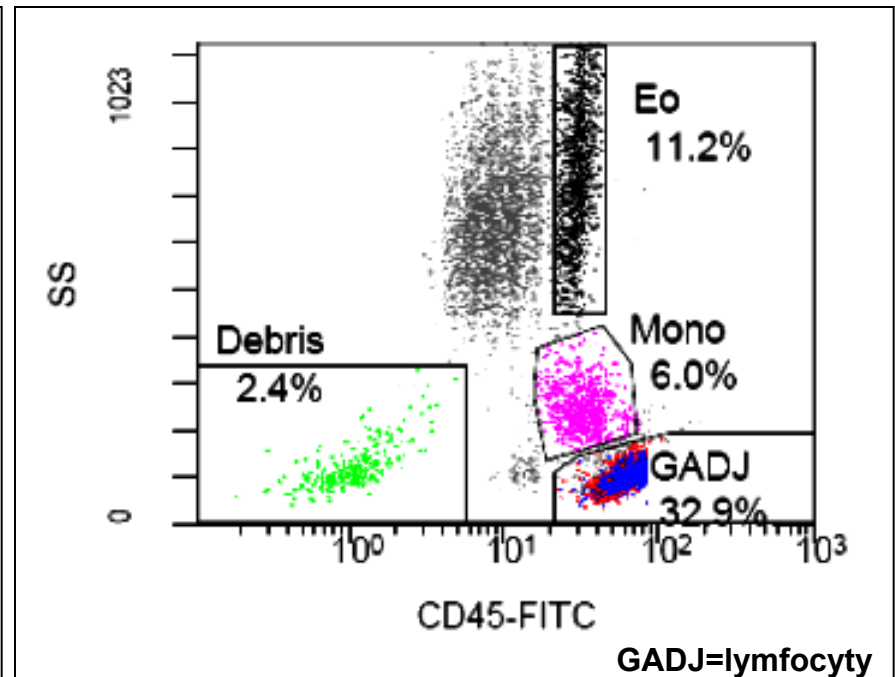
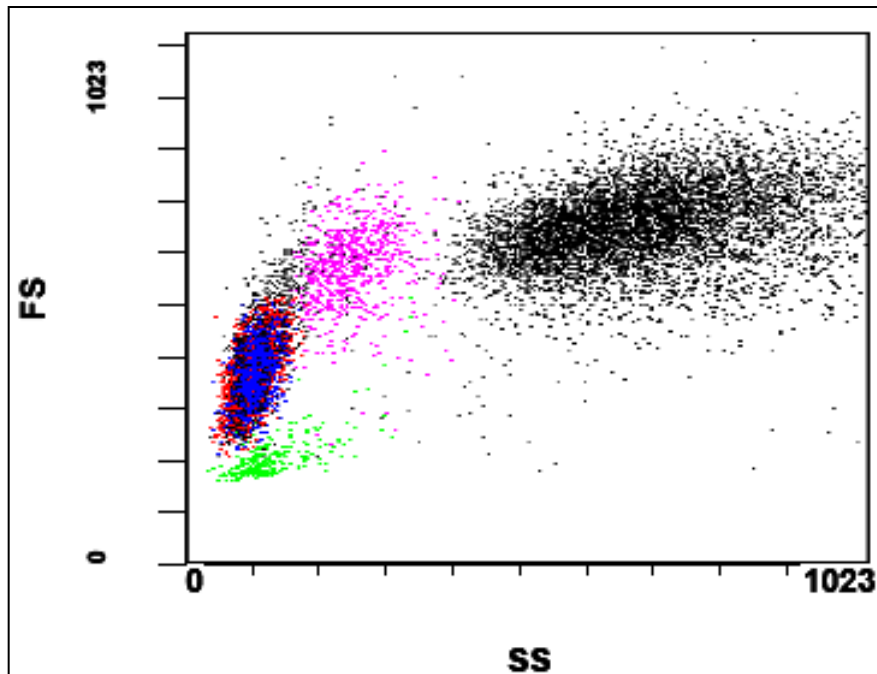
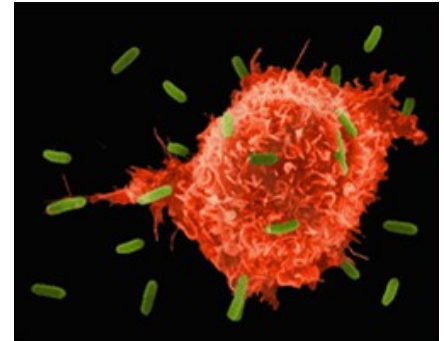
dendritická b.



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

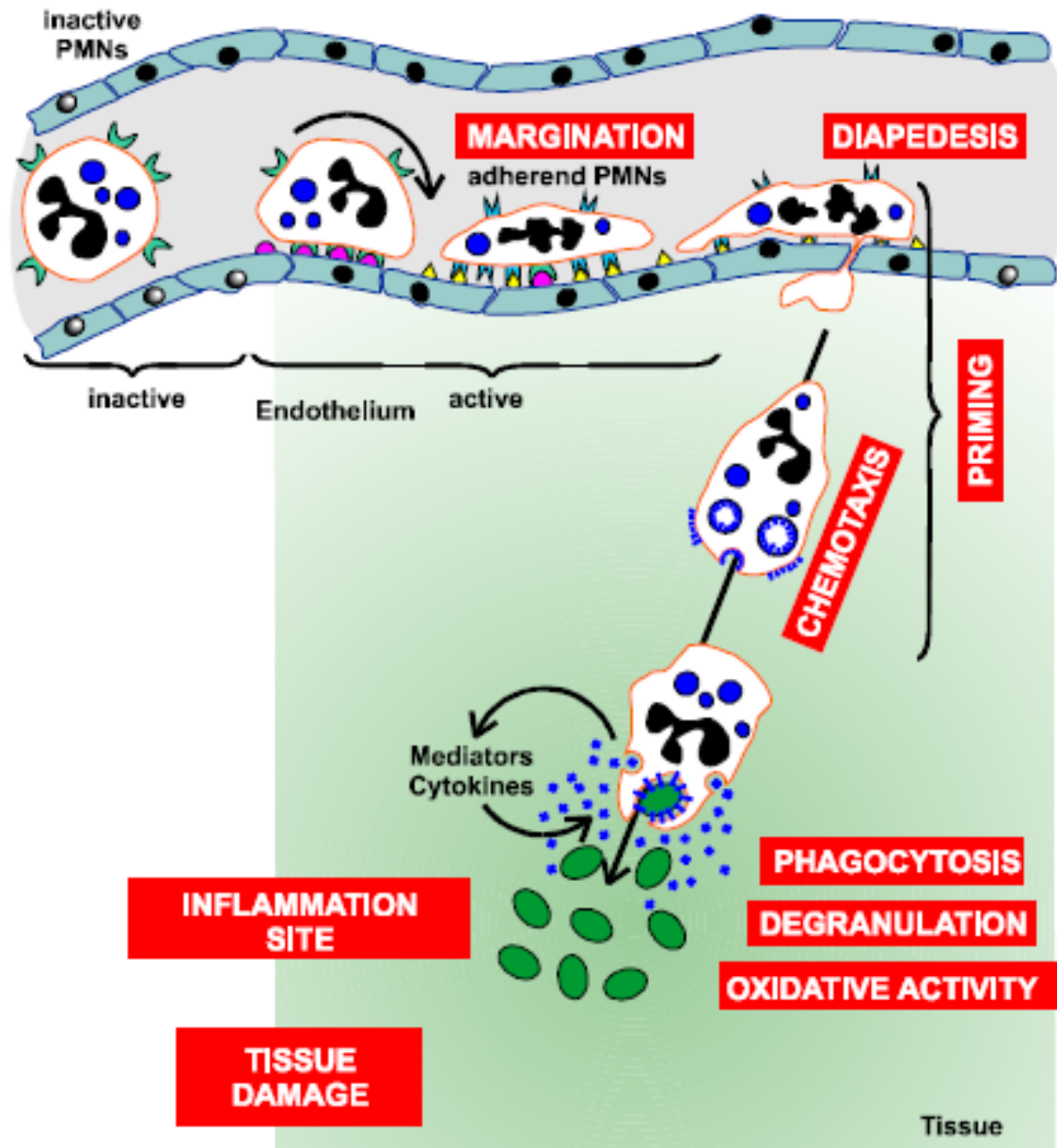
# KREVNÍ DIFERENCIÁL

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



# PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

- **ADHEZE** („rolling“) → cytometrie – defektní exprese leukocytárních integrinů -  
Leukocyte Adhesion Deficiency Syndromes (LAD1, LAD2)
- **DIAPEDÉZA** = průchod leukocytů cévní stěnou
- **ROZPOZNÁNÍ OPONIZOVANÝCH ČÁSTIC**
- **CHEMOTAXE** → test migrace pod agarózou
  - ve směru chemotaktického gradientu (chemotaktické faktory, např. IL-8, směřují fagocyty do místa zánětu)
- **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



# 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:

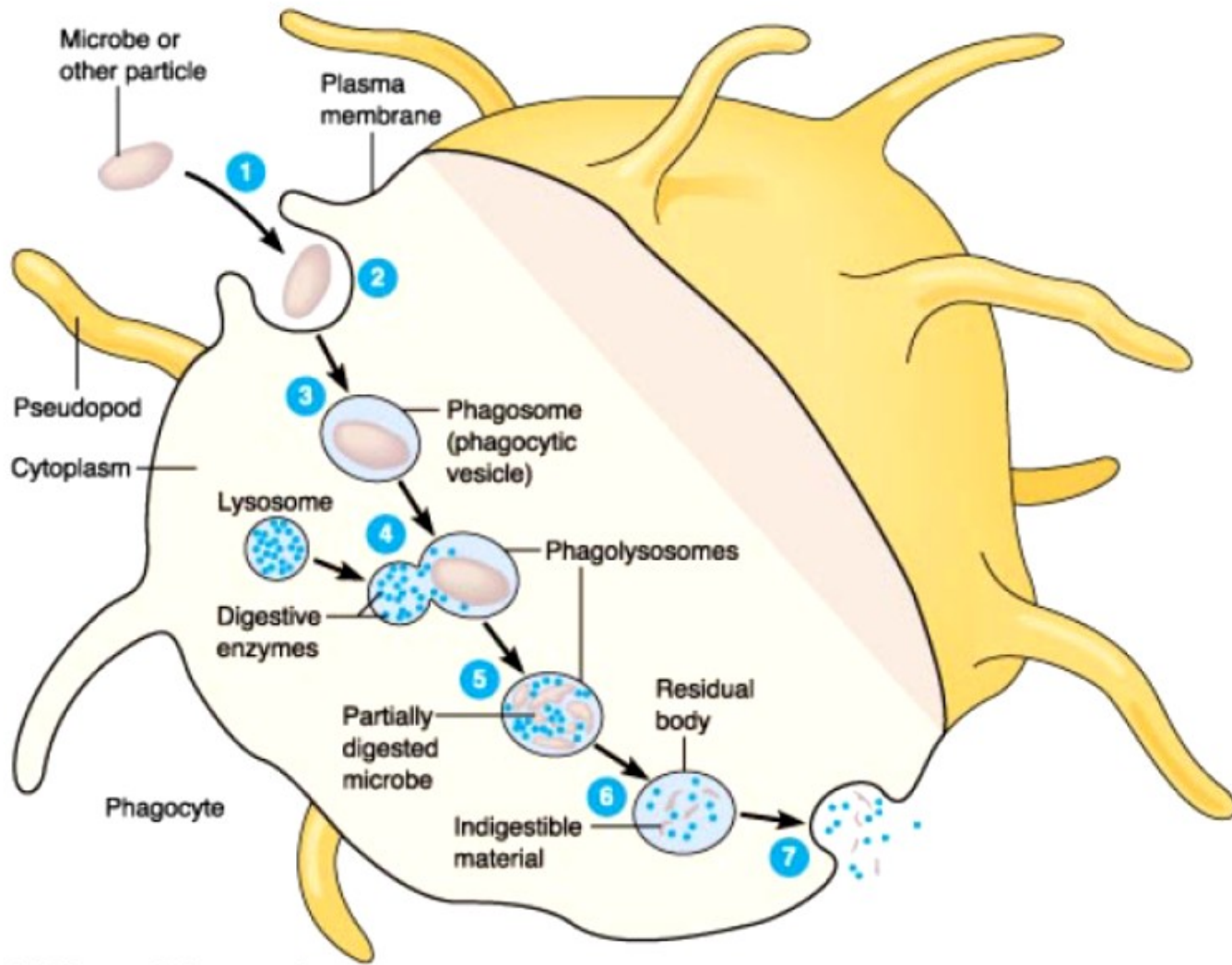
- **LPS** (G-bakterie), **peptidoglykany** (G+ bakterie), **glukany a manany** (kvasinky a plísně)
- **Opsoniny** – komplementové fragmenty (C3b), protilátky (Fc fragment IgG)
- **Fosfolipidy** - na povrchu vlastních apoptotických buněk (za normálních okolností se nacházejí výhradně na vnitřní straně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

# PRO ROZPOZNÁNÍ RŮZNÉ DRUHY RECEPTORŮ

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

- **manóзовé 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**





- 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



# RESPIRAČNÍ VZPLANUTÍ

Stimulace povrchové membrány fagocytů

– **aktivace NADPH oxidázy** –

zvýšená spotřeba kyslíku a jeho přeměna na reaktivní kyslíkové deriváty

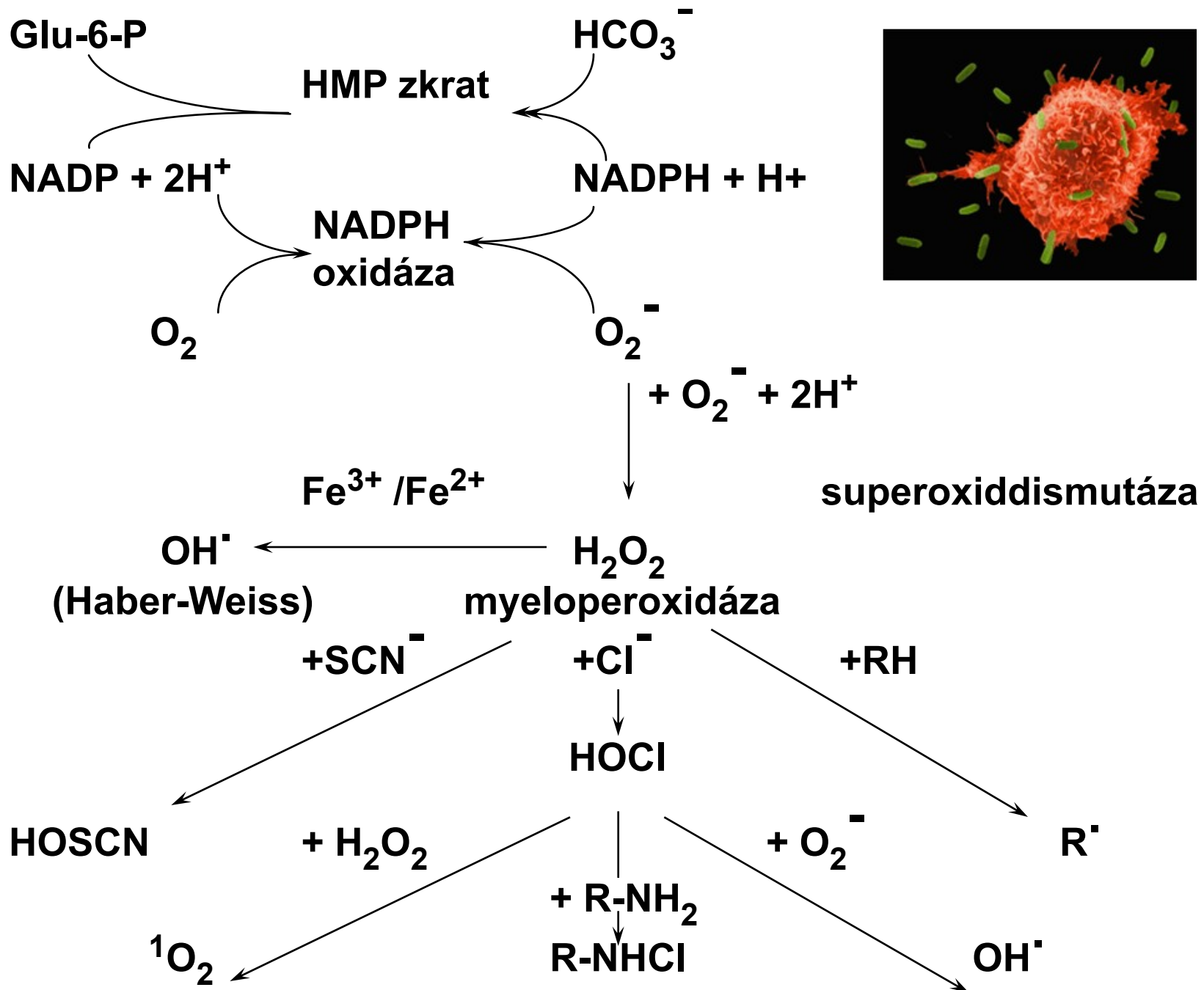
$O_2^-$  ... superoxidový anion

$H_2O_2$  ... peroxid vodíku

$^1O_2$  ... singletový kyslík

HOCl ... kyselina chlorná

OH $\cdot$  ... hydroxylový radikál



# 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)

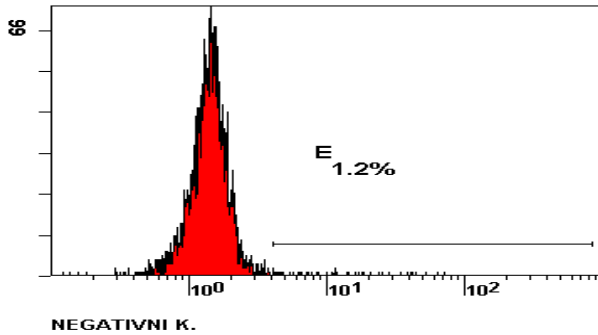
# Burst test

- Kvantitativní test pro vyhodnocení oxidačního vzplanutí u granulocytů a monocytů
- Fagocytující buňky se stimulují *E. coli*, fMLP a PMA (3 různé zkumavky)-dochází k oxidačnímu vzplanutí
- Ke vzorkům přidán DHR (dihydrorhodamin 123), který je kyslíkovými radikály oxidován na zeleně fluoreskující rhodamin 123
- Na průt. cytometru sledován počet (procento) zeleně fluoreskujících granulocytů a monocytů

# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA

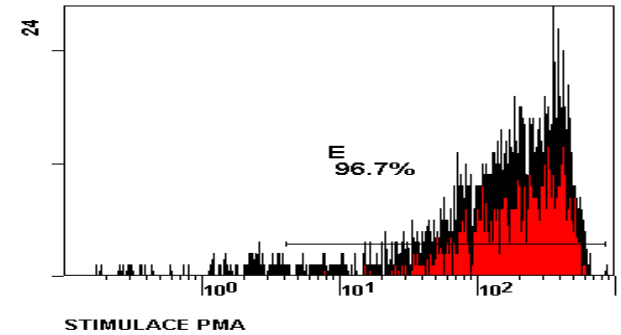
## BEZ STIMULACE

(1):20021459.LMD FL1 LOG A



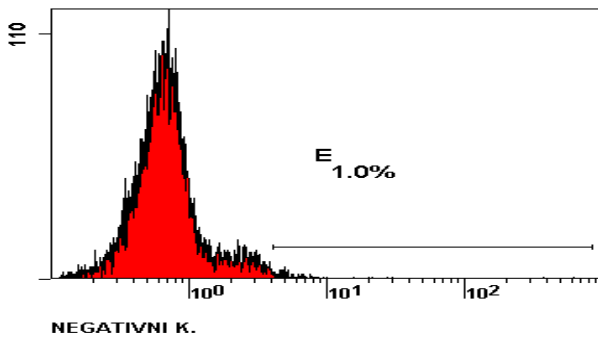
## STIMULACE PMA

(4):20211867.LMD FL1 LOG A



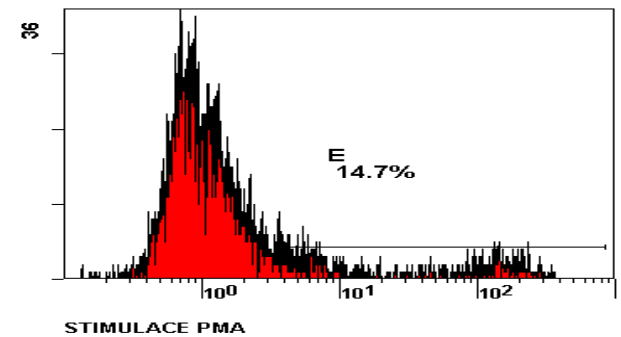
ZDRAVÁ  
KONTROLA  
STIMULACE PMA  
97%

(3):20224644.LMD FL1 LOG A



PACIENT  
STIMULACE PMA:  
12%

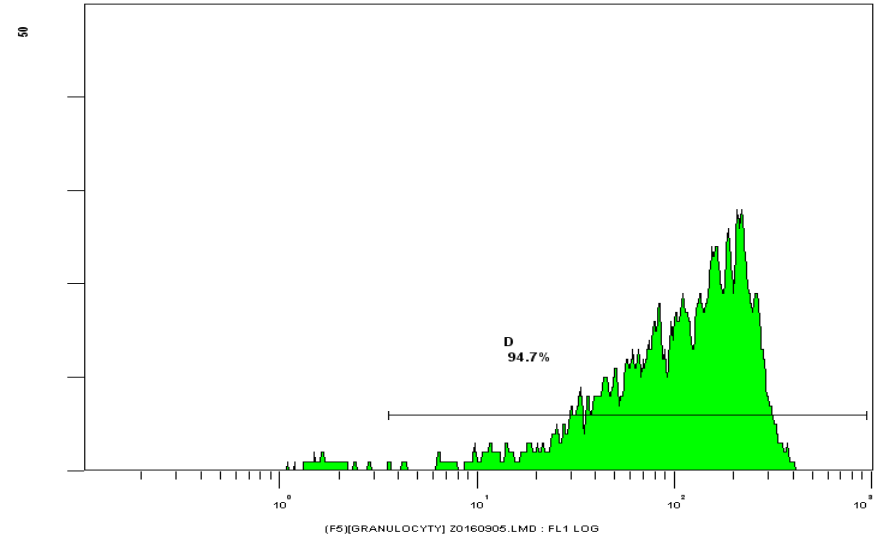
(2):20021462.LMD FL1 LOG A



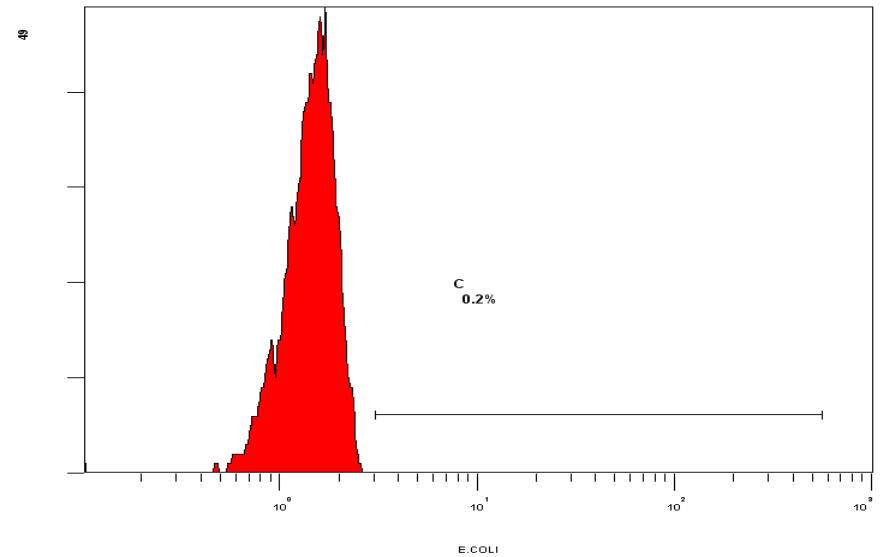
# STIMULACE *E.Coli*

[F8][A] Z0160901.LMD : FL1 LOG

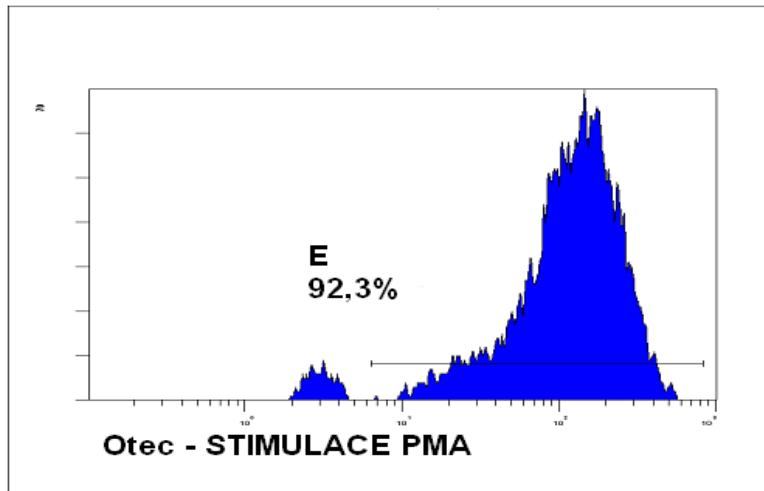
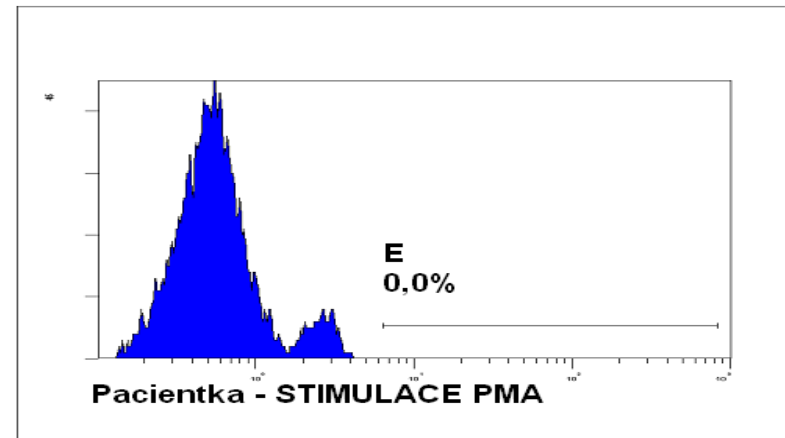
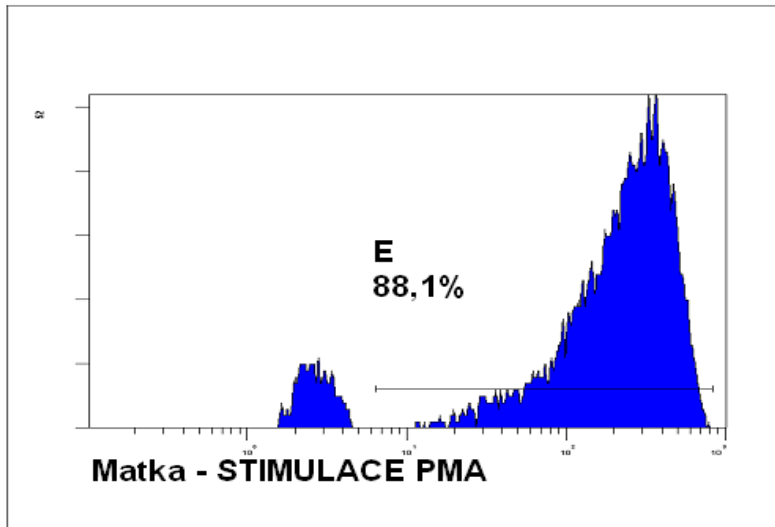
## ZDRAVÁ KONTROLA



## PACIENT S CGD

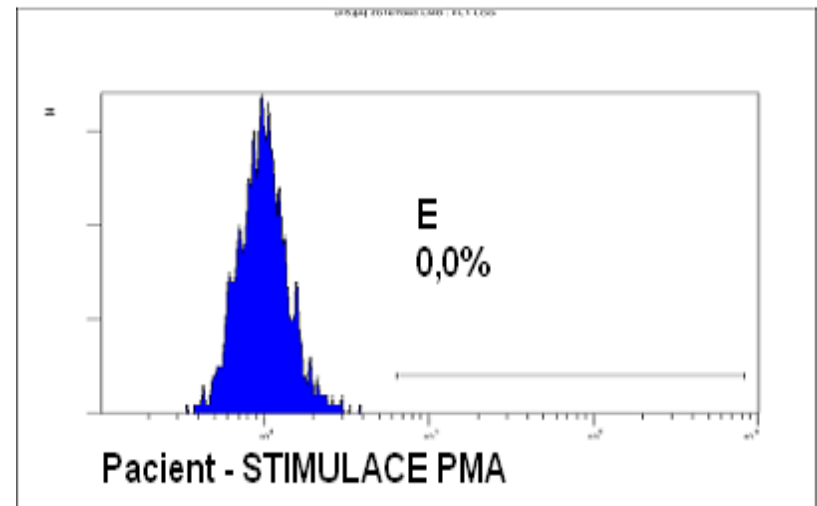
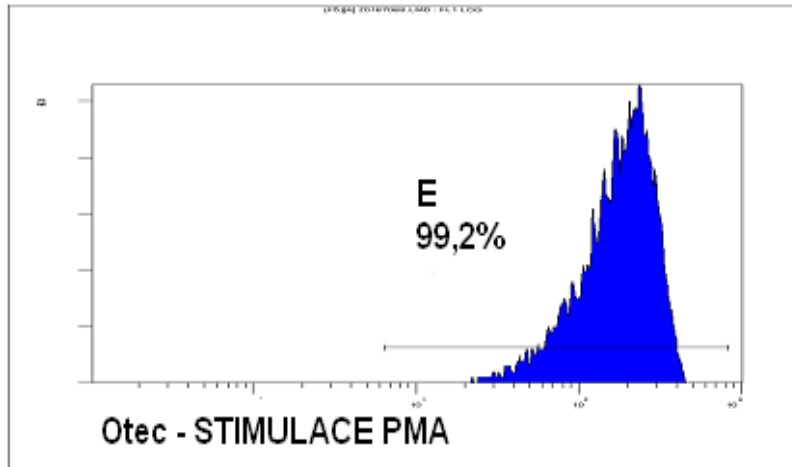
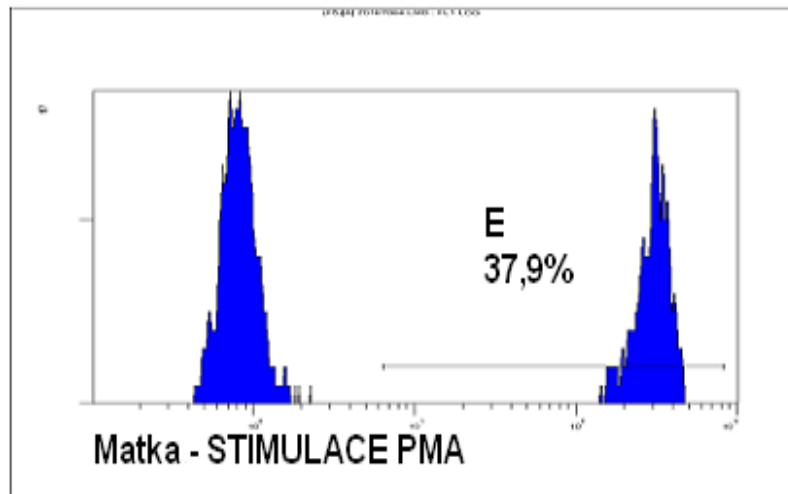


# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ)





# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (X-VÁZANÁ)



# DALŠÍ VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY

- MIKROBICIDNÍ TEST

- zahrnuje všechny fáze fagocytárního děje
- sledování schopnosti fagocytů pohlcovat a usmrcovat živé kvasinky (*C. albicans*); usmrcené kvasinky se z fagocytů uvolní deoxycholátem a jejich množství se určí obarvením methylenovou modří (modré=usmrcené, bílé=živé)

- NBT (INT) TEST

- poruchy v NADPH-oxidázovém systému
- 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



# TEST CHEMILUMINISCENCE

Chemiluminiscence je jev, kdy dochází v důsledku chemické reakce k emisi světla

Při procesech redukce molekulárního kyslíku vznikají elektronově excitované stavy, které emitují fotony (světlo).

Kvantitativní sledování oxidačního vzplanutí fagocytů

- **Fagocytující buňky**

plná krev

izolované polymorfonukleární buňky

- **Luminofory**

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

lucigenin (bis-N-methylacridinium nitrát)

- **Stimulátory**

korpuskulární: škrob, opsonizovaný zymozan

solubilní: phorbol myristát acetát (PMA)

- **Aktivita**

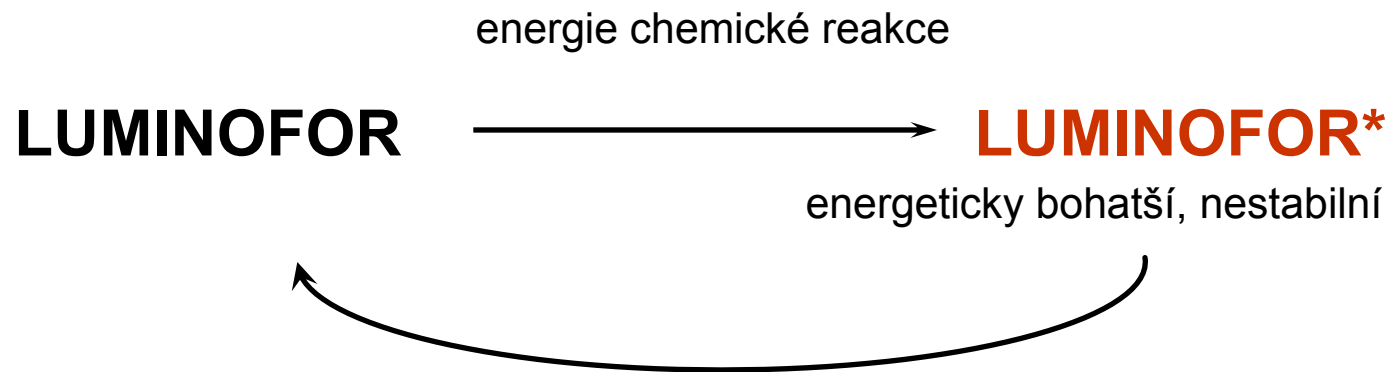
spontánní

stimulovaná

# 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.



# PRACOVNÍ POSTUP

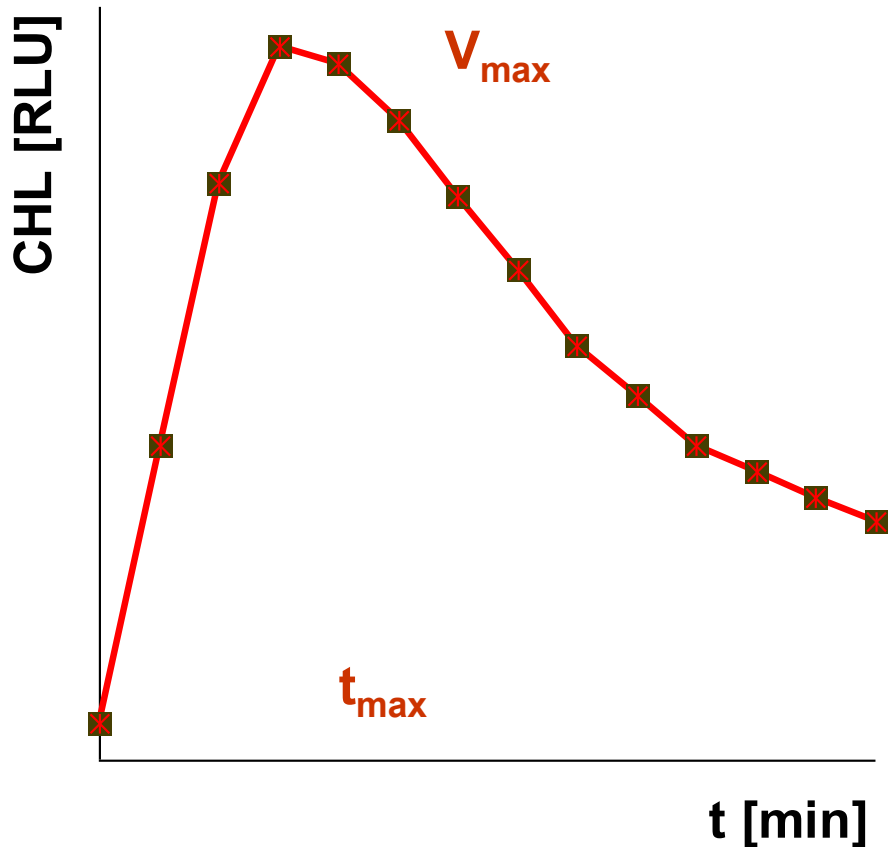
- Odběr venózní krve do heparinu (5j heparinu/1ml krve). Krev 30 min inkubovat v termostatu při 37°C. Materiál zpracovat do 120 min po odběru.
- Krev vyšetřit hematologicky (celkový počet leukocytů, KO).
- U každého pacienta vyšetřit: spontánní aktivitu (bez stimulace) i stimulovanou aktivitu (stimulace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

# KINETIKA RESPIRAČNÍHO VZPLANUTÍ



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