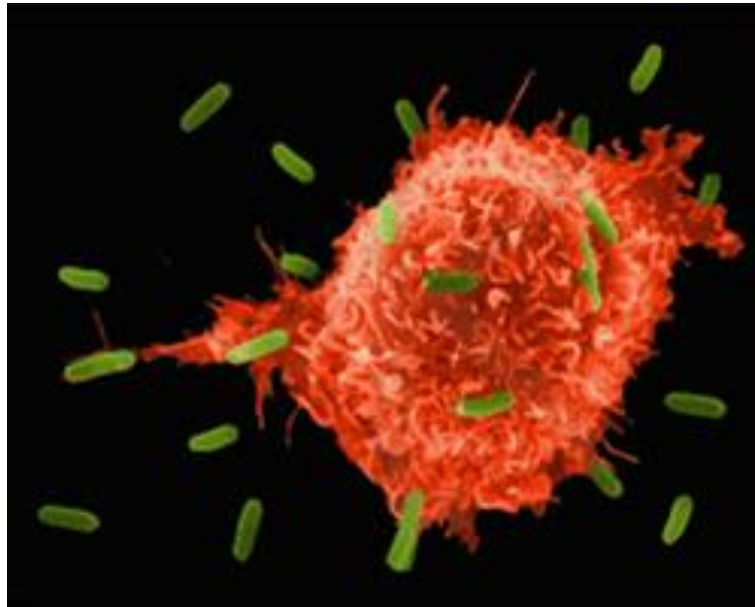


FAGOCYTOZA





Fagocytóza je proces pohlcení a degradace částic větších než 0,5 μm .

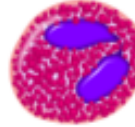
→ pohlceným materiálem mohou být cizorodé bakterie, poškozené, odumřelé buňky či jejich části, minerální částičky, atd.

FAGOCYTUJÍCÍ BUŇKY

neutrofil



eosinofil



basofil



monocyt



makrofág



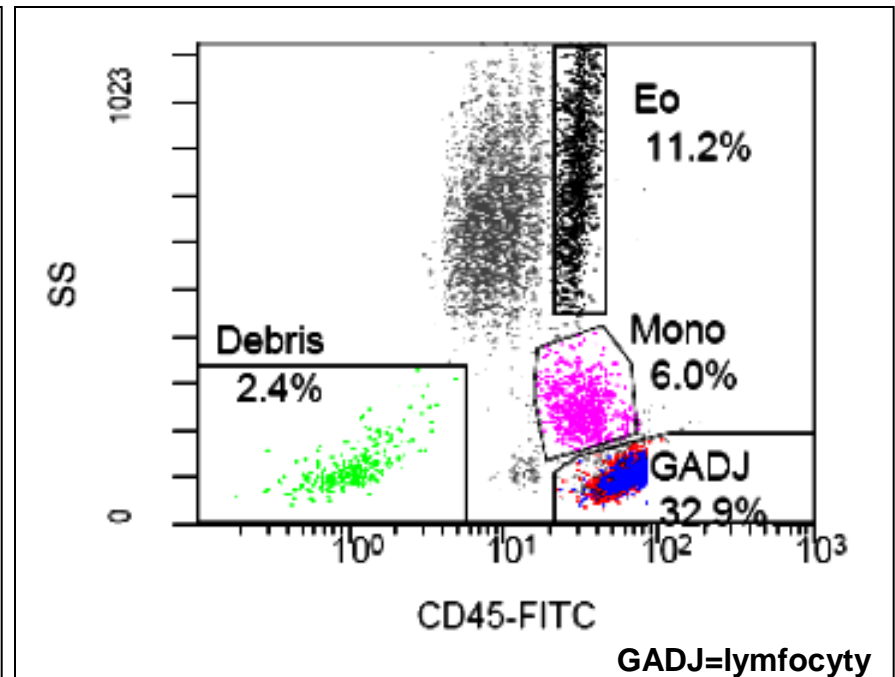
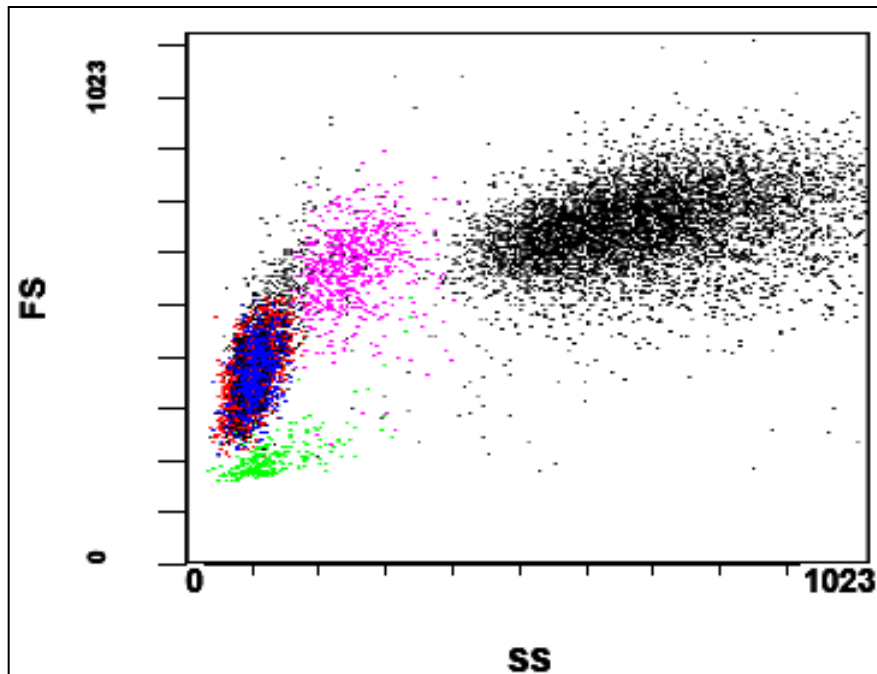
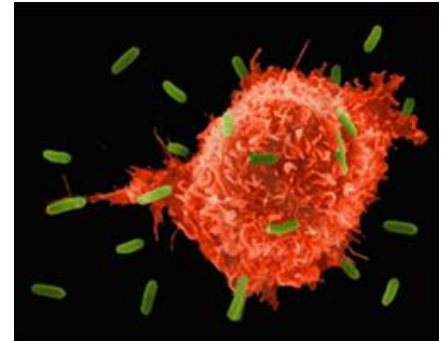
dendritická b.



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

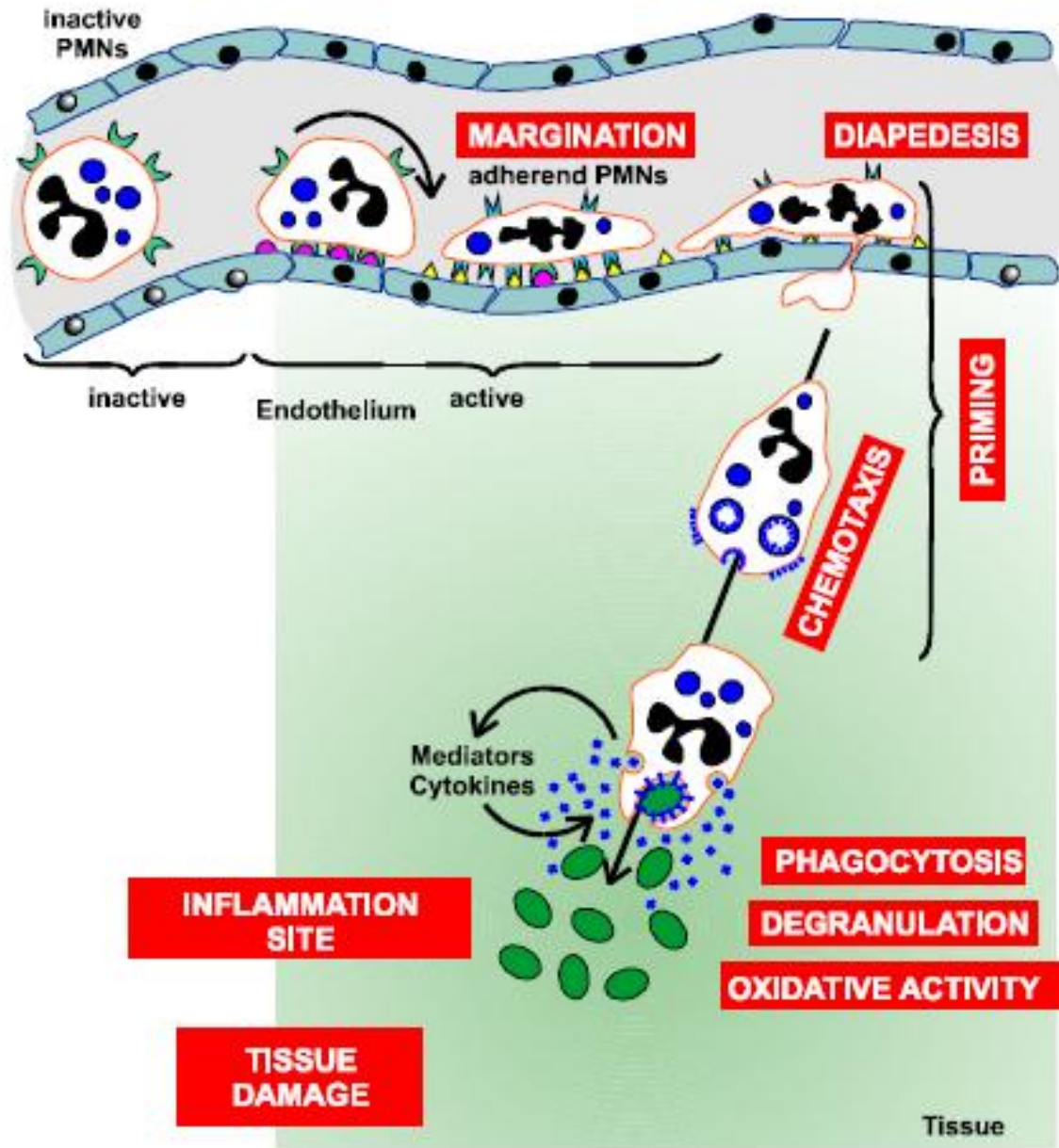
KREVNÍ DIFERENCIÁL

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



PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

- **ADHEZE** („rolling“) → cytometrie – defektní exprese leukocytárních integrinů -
Leukocyte Adhesion Deficiency Syndromes (LAD1, LAD2)
- **DIAPEDÉZA** = průchod leukocytů cévní stěnou
- **ROZPOZNÁNÍ OPSONIZOVANÝCH 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 – respirační (oxidační) vzplanutí
 - 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.

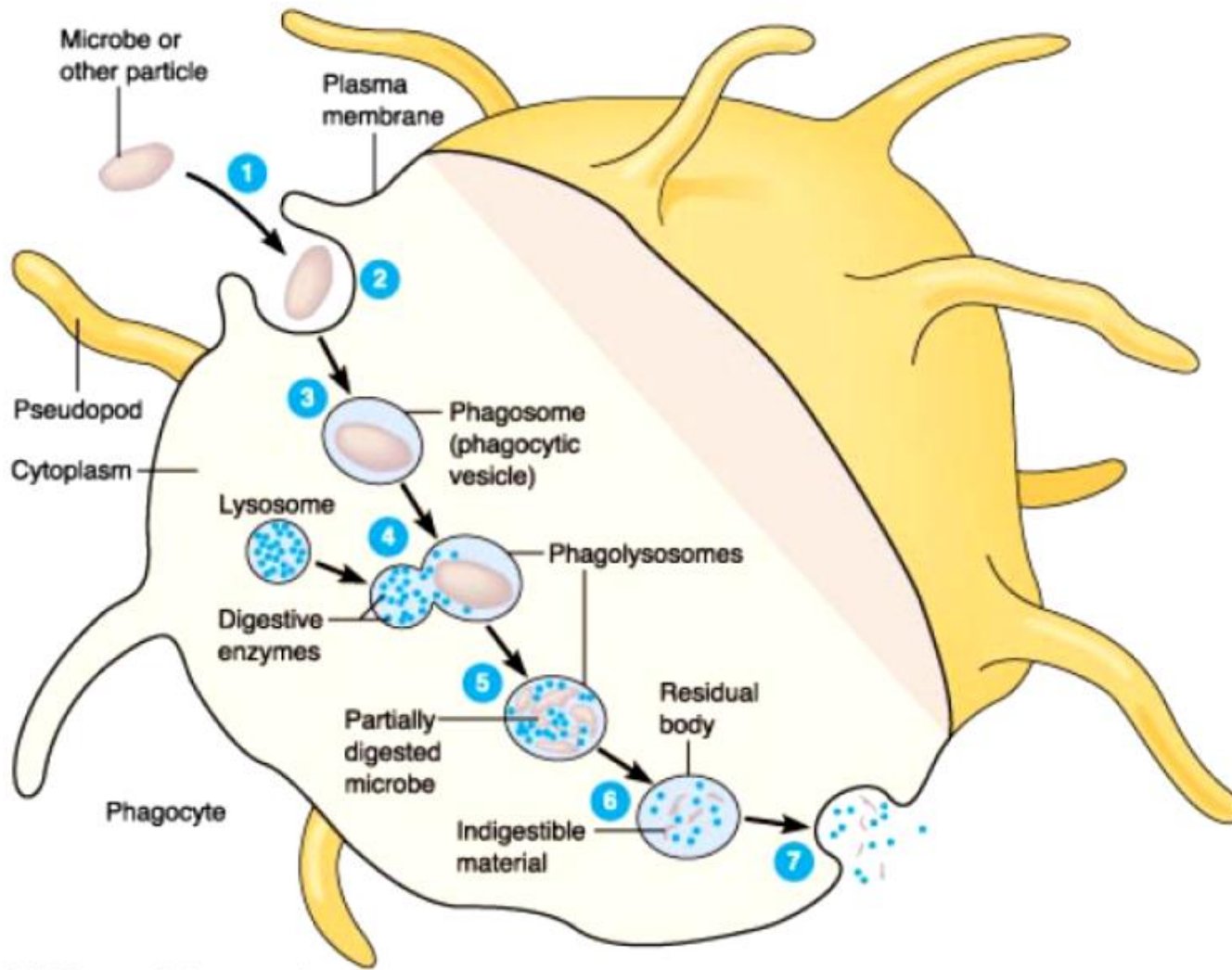
Příklady:

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



- 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

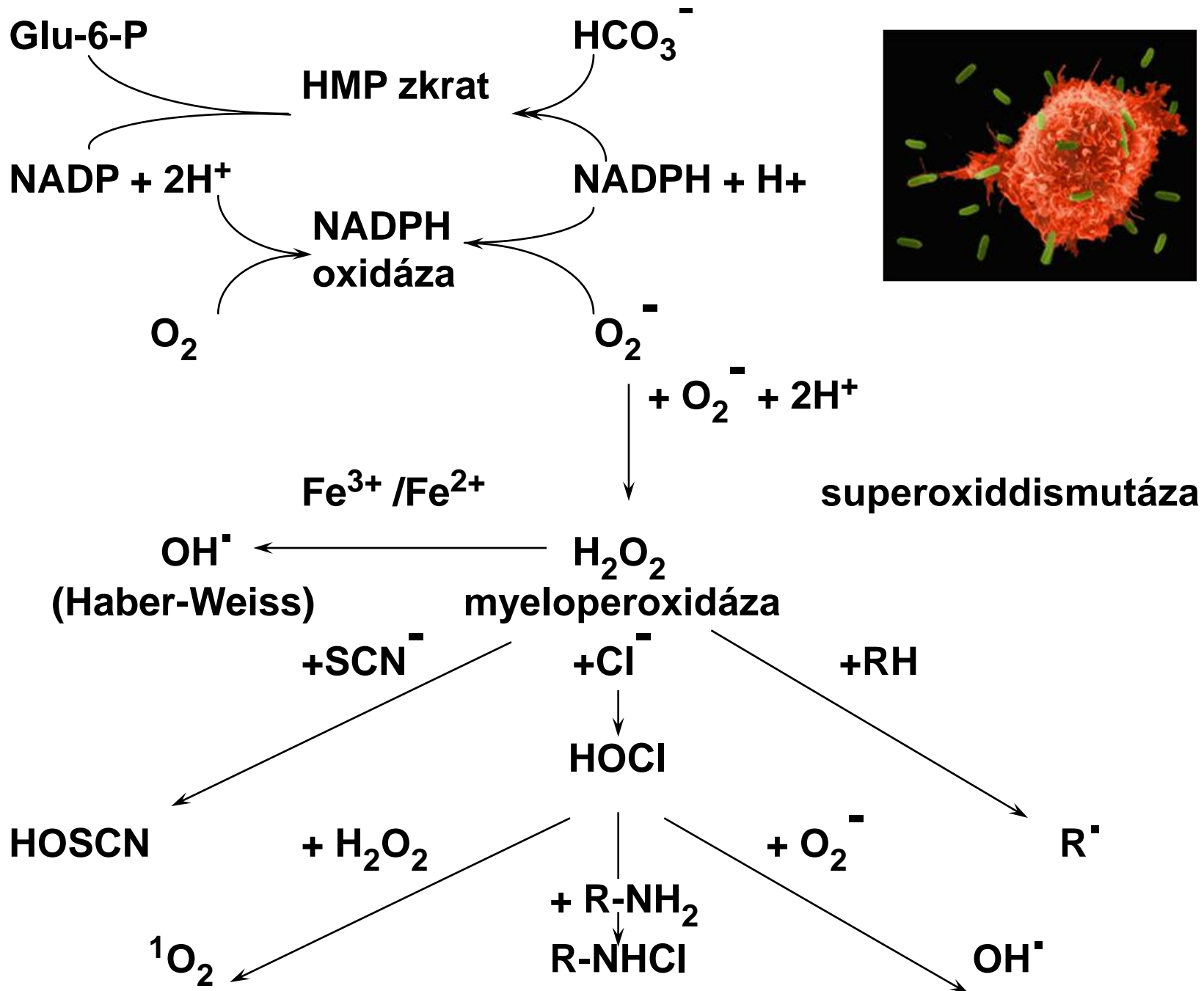
O_2^- ... superoxidový anion

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)

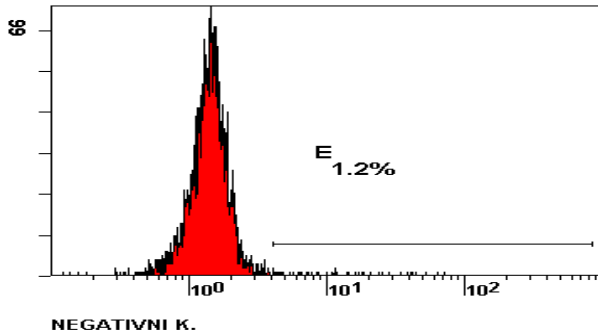
Burst test

- 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

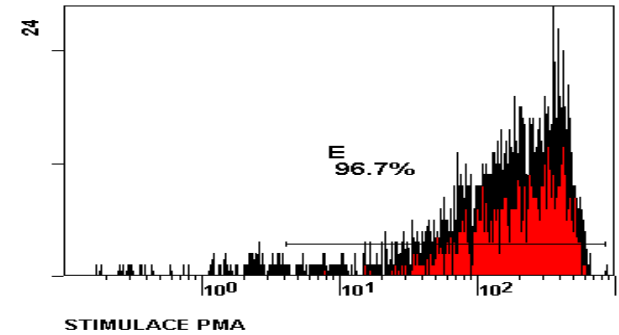
BEZ STIMULACE

(1):20021459.LMD FL1 LOG A



STIMULACE PMA

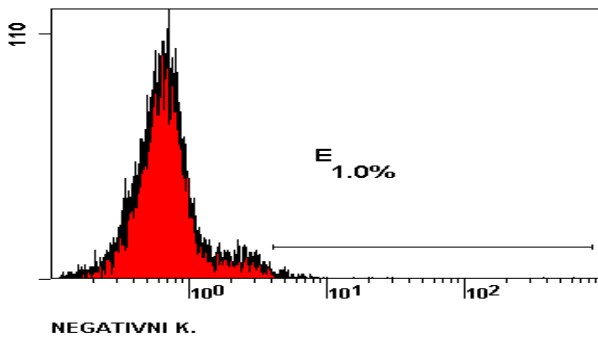
(4):20211867.LMD FL1 LOG A



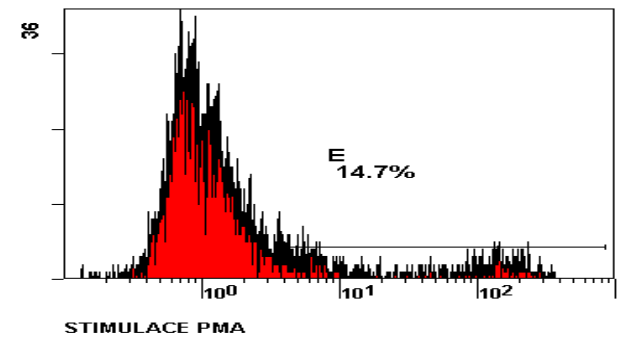
ZDRAVÁ
KONTROLA
STIMULACE PMA

97%

(3):20224644.LMD FL1 LOG A



(2):20021462.LMD FL1 LOG A



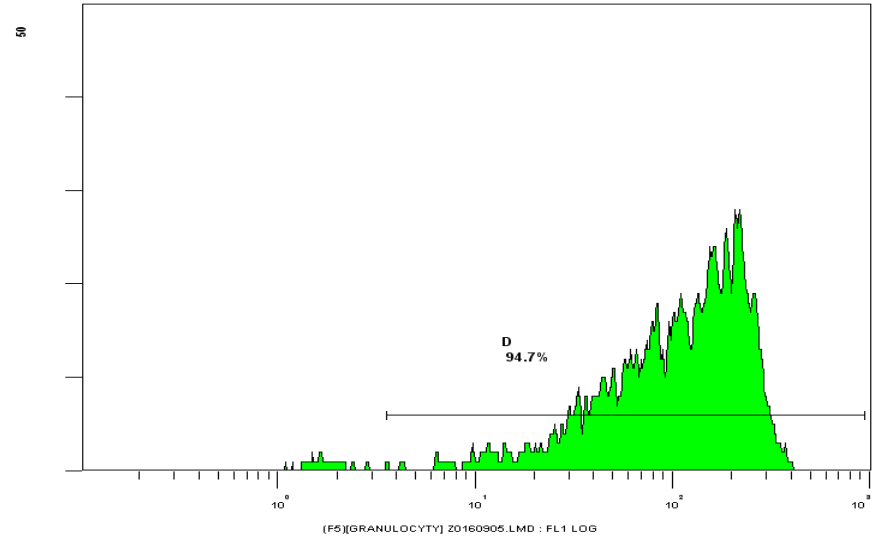
PACIENT
STIMULACE PMA:

12%

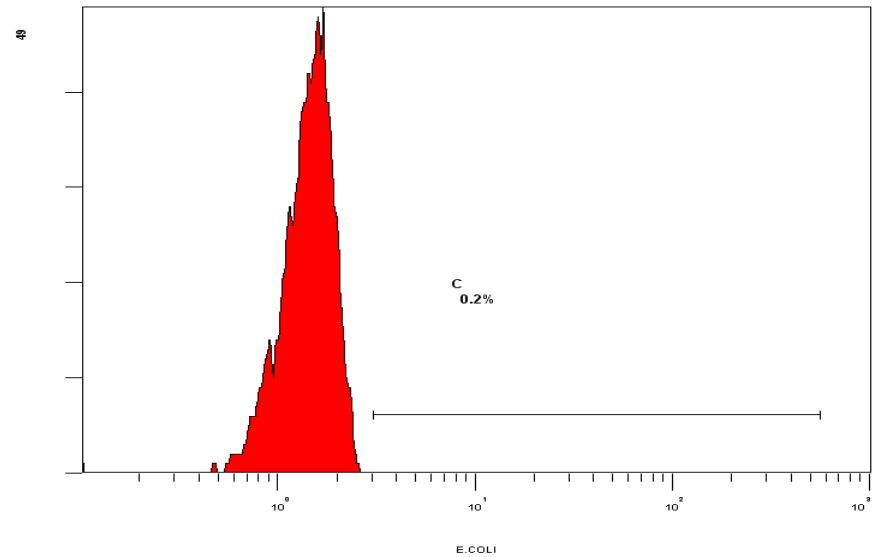
STIMULACE *E.Coli*

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

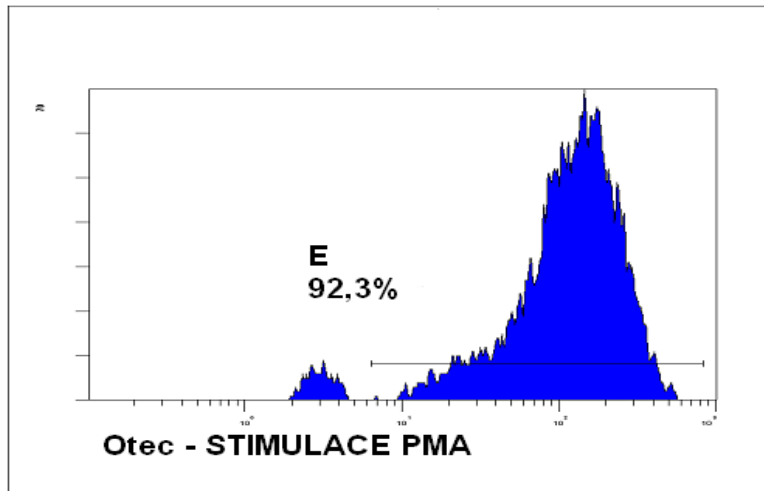
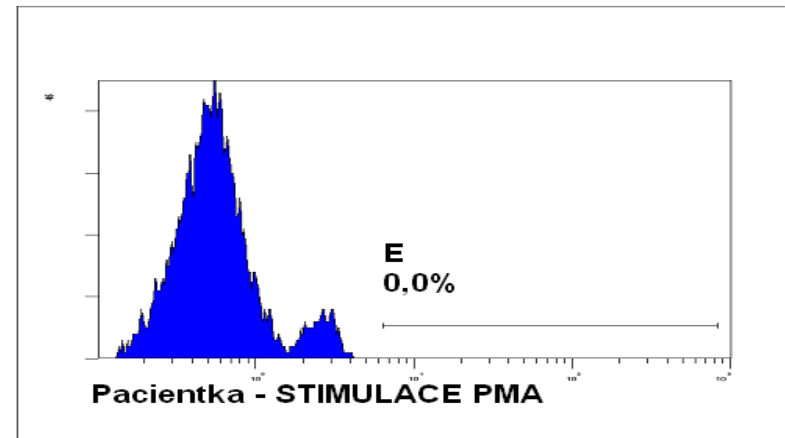
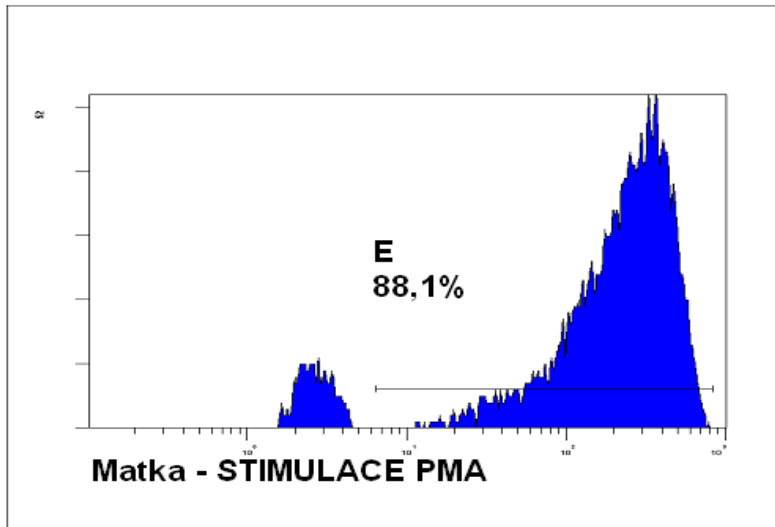
ZDRAVÁ KONTROLA



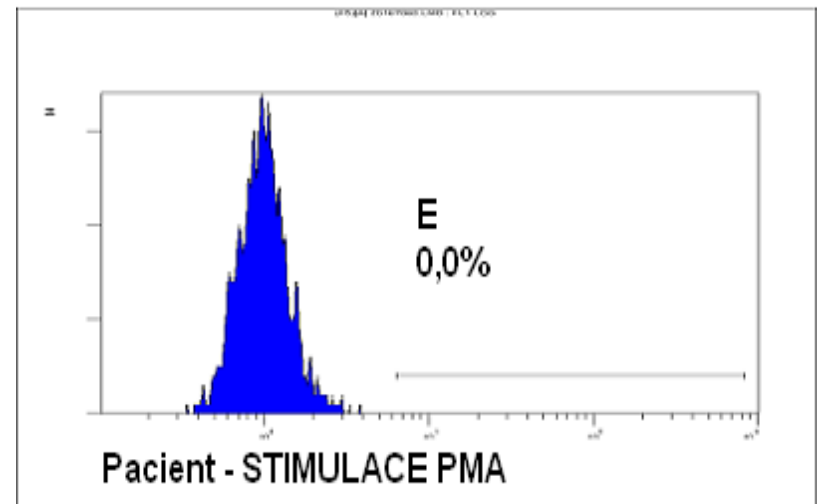
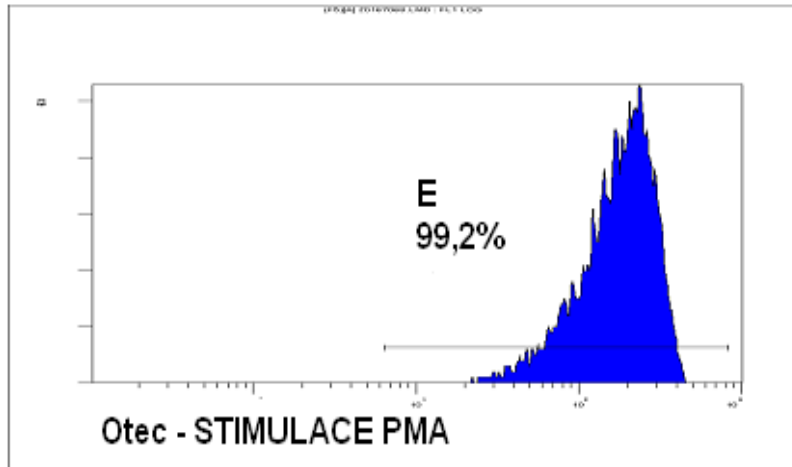
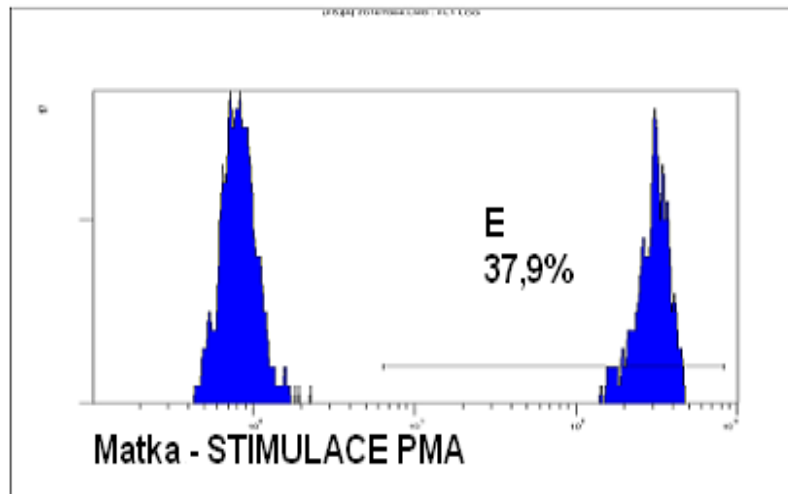
PACIENT S CGD



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**

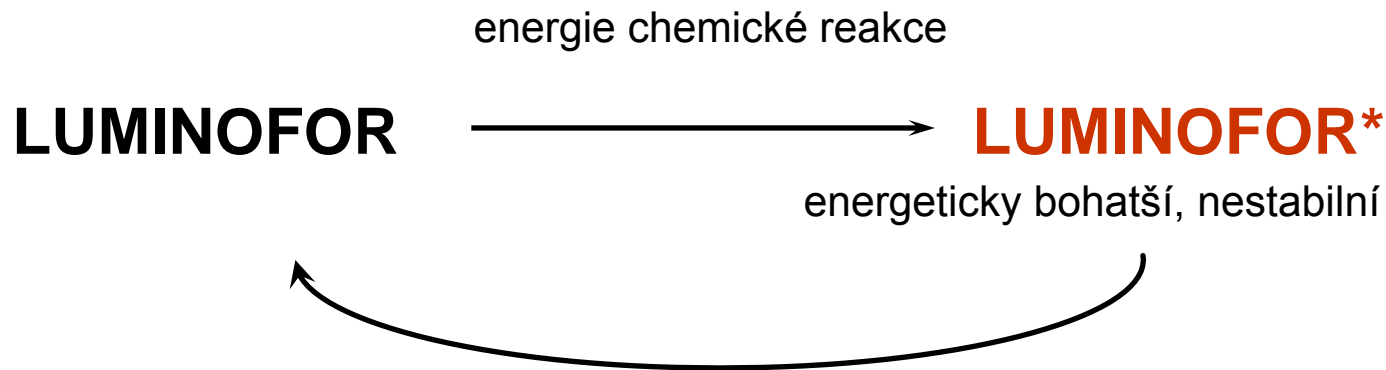
spontánní

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

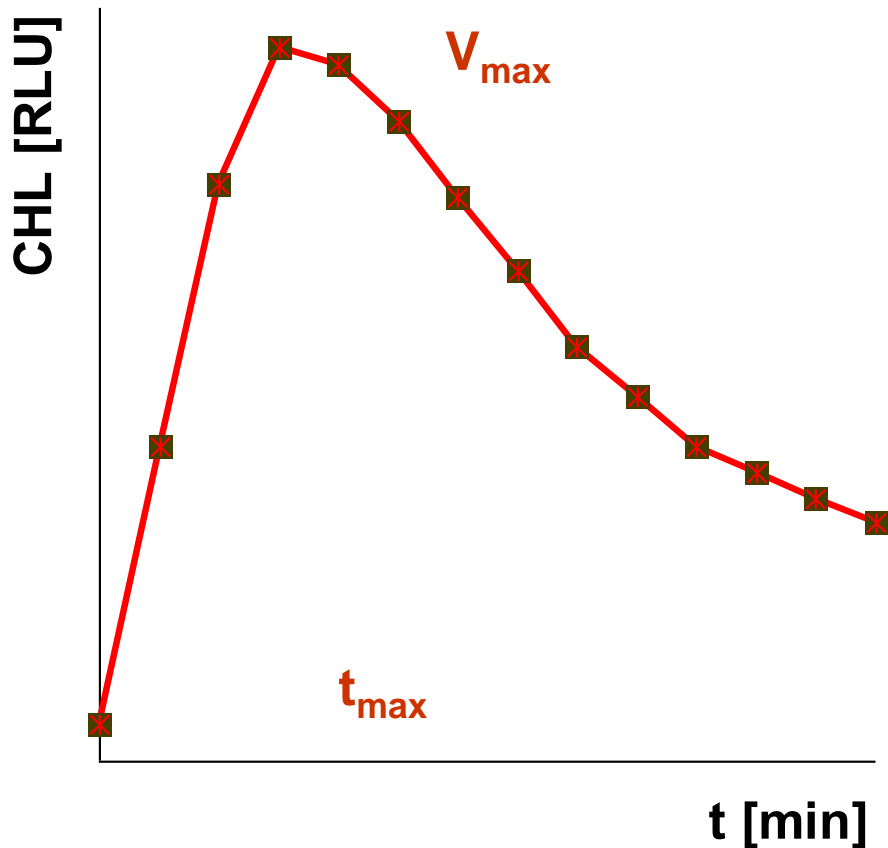
- Odběr venózní krve do heparinu (5j heparinu/1ml krve). Krev 30 min inkubovat v termostatu při 37°C. Materiál zpracovat do 120 min po odběru.
- Krev vyšetřit hematologicky (celkový počet leukocytů, KO).
- U každého pacienta vyšetřit: spontánní aktivitu (bez stimulace) i stimulovanou aktivitu (stimulace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