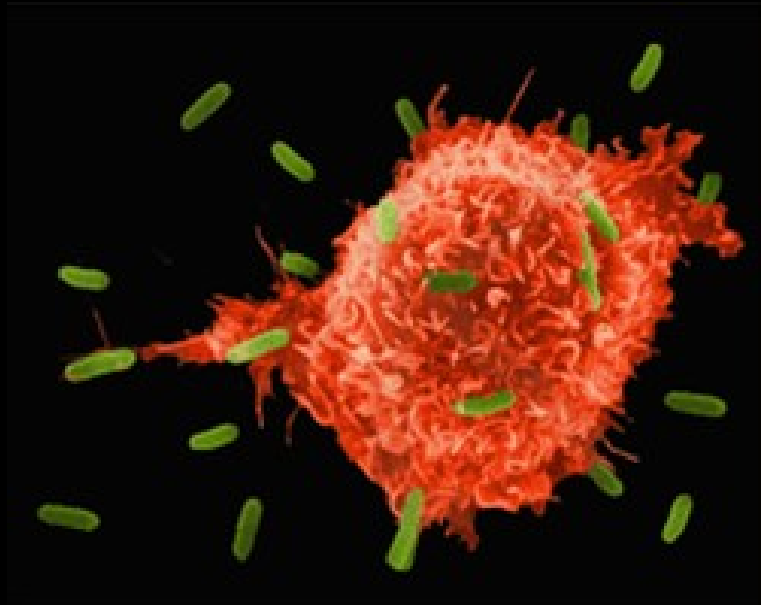
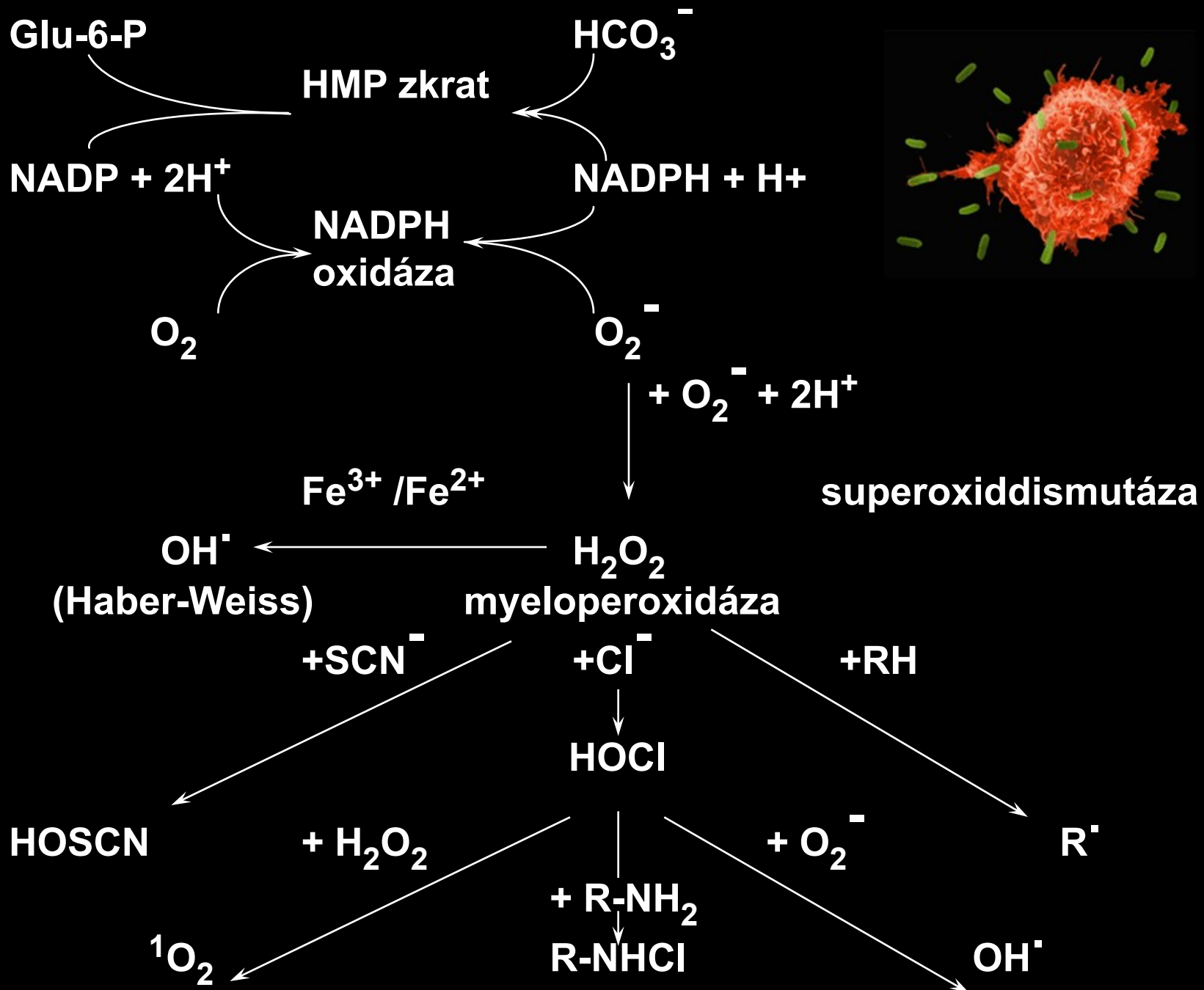


# FAGOCYTOZA



Mgr. Olga Tichá, LF MU



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

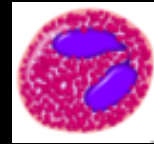
→ pohlčeným materiálem mohou být cizorodé bakterie, poškozené či odumřelé buňky či jejich části, minerální částičky, atd.

# FAGOCYTUJÍCÍ BUŇKY

neutrofil



eosinofil



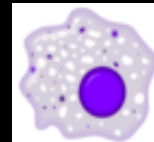
basofil



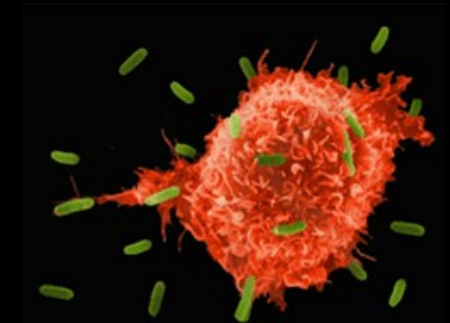
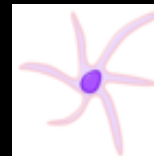
monocyt



makrofág



dendritická b.

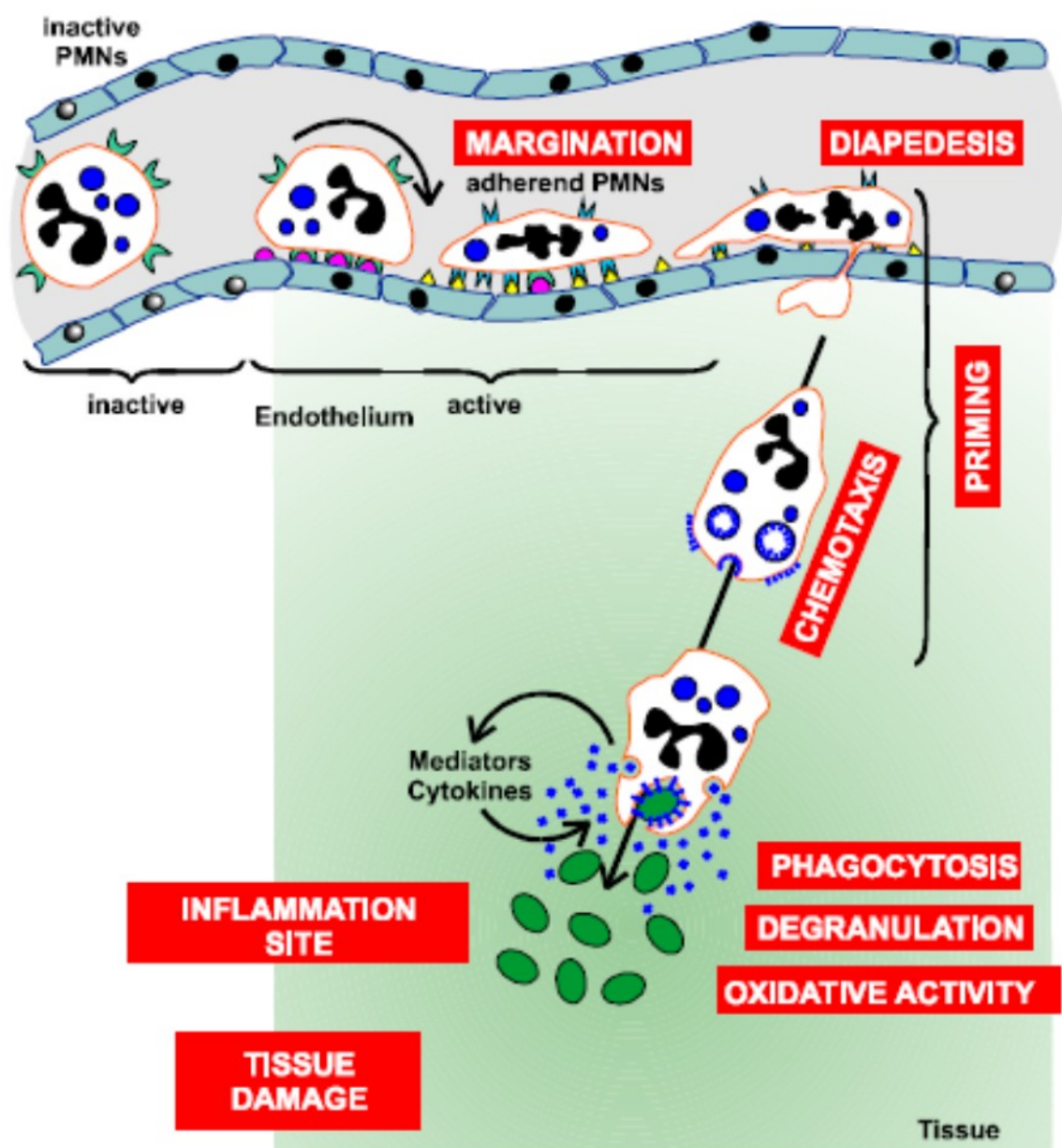


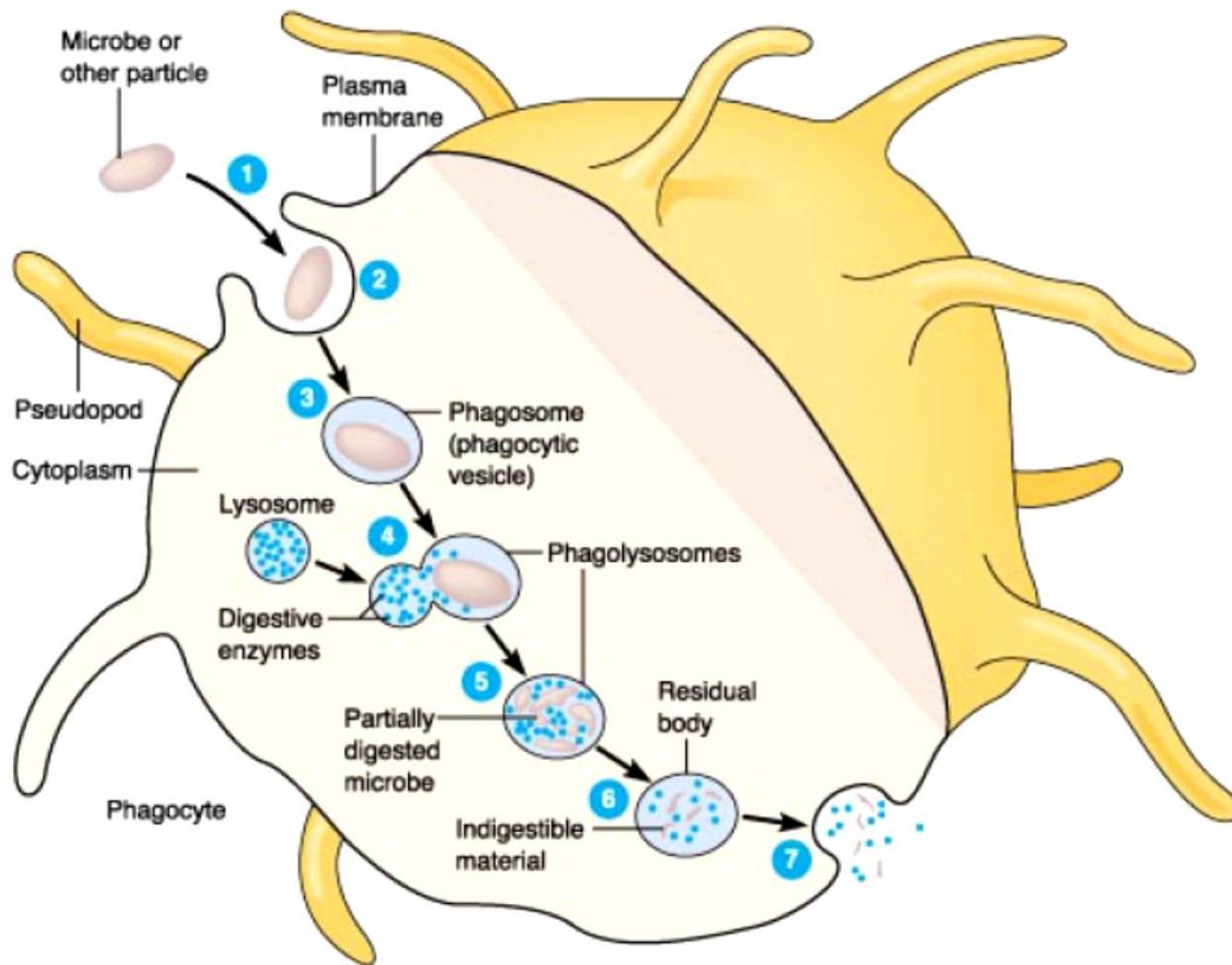
V periférii je cca 7% celkového množství fagocytů, zbytek je v kostní dřeni, odkud se průběžně vyplavují a zároveň doplňují.

# PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

- **ADHEZE** („rolling“) → cytometrie – exprese CD11/CD18 – LAD syndrom (leukocyte adhesion deficiency)
- **DIAPEDÉZA**
- **ROZPOZNÁNÍ OPONIZOVANÝCH ČÁSTIC**
- **CHEMOTAXE** → test migrace pod agarózou – schopnost odpovídat na chemotaktickou stimulaci)
- **INGESCE** → pohlcení mikroorganismů nebo inertních částic
- **DIGESCE** - mechanismus nezávislý na kyslíku
  - mikrobicidní test, detekce enzymů
  - mechanismus závislý na kyslíku

• mikrobicidní test NBT INT detekce myeloperoxidázy



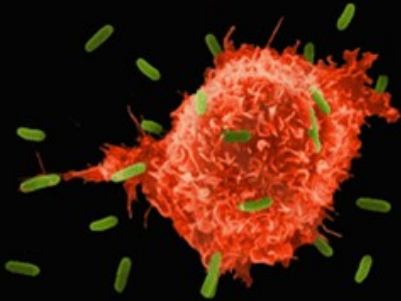


- 1** Chemotaxis and adherence of microbe to phagocyte.
- 2** Ingestion of microbe by phagocyte.
- 3** Formation of a phagosome.
- 4** Fusion of the phagosome with a lysosome to form a phagolysosome.
- 5** Digestion of ingested microbe by enzymes.
- 6** Formation of residual body containing indigestible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

**(a)** Phases of phagocytosis

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

# 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.

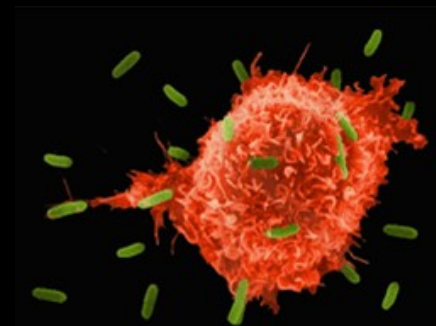
- **LPS** (G-bakterie), **peptidoglykany** (G+ bakterie), **glukany a manany** (kvasinky a plísně)
- **Opsoniny** – komplementové fragmenty (C3b), protilátky (Fc fragment)
- **Fosfolipidy** - na povrchu vlastních apoptotických buněk (za normálních okolností se nacházejí výhradně na vnitřní straně membrány)



# PRO ROZPOZNÁNÍ RŮZNÉ DRUHY RECEPTORŮ

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

- **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**



# 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

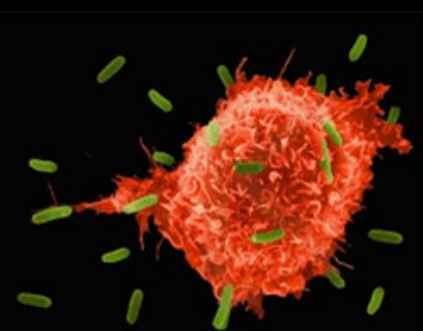
$HOCl$  ... kyselina chlorná

$OH\cdot$  ... 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)



# DALŠÍ VYŠETŘENÍ FAGOCYTÓZY

- MIKROBICIDNÍ TEST

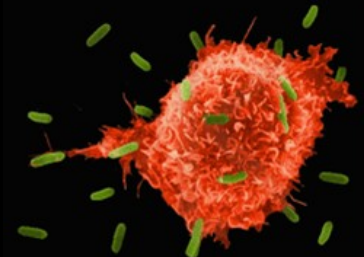
- sledování schopnosti fagocytů pohlcovat a usmrcovat živé kvasinky; usmrcené kvasinky se z fagocytů uvolní deoxycholátem a jejich množství se určí obarvením methylenovou modří – mikroskopické vyhodnocení

- NBT (INT) TEST (testy redukce tetrazoliových solí)

- 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



# Burst test I.

- 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 radikály oxidován na zeleně fluoreskující rhodamin 123
- Na průt. cytometru sledován počet (procento) zeleně fluoreskujících granulocytů a monocytů

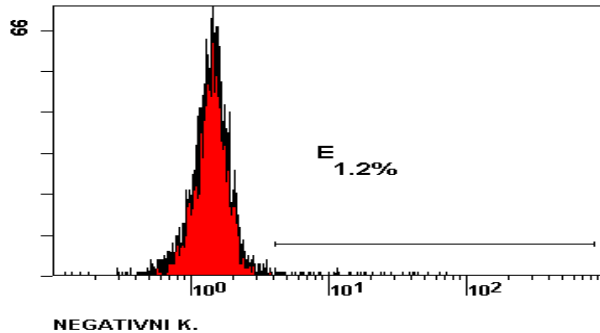
# Burst test II.

- Inkubace vyšetřované heparinizované krve při 37°C za přítomnosti dihydrorhodaminu 123
- **Stimulans:** A) (opsonizované) *E.coli*  
B) PMA  
C) fMLP
- **Výsledek:**
- 1. % aktivních fagocytujících buněk:  
**Normální hodnoty:** A) (opsonizované) *E.coli*: 80-100%  
B) PMA : 90-100%
- 2. Stimulační index:  
$$SI = \frac{\text{mean intenzity fluorescence stimulovaných buněk}}{\text{mean intenzity fluorescence nestimulovaných buněk}}$$
- **Normální hodnoty:** A) opsonizované *E.coli*: 30 a více  
B) PMA : 30 a více

# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA

BEZ STIMULACE

(1):20021459.LMD FL1 LOG A



ZDRAVÁ

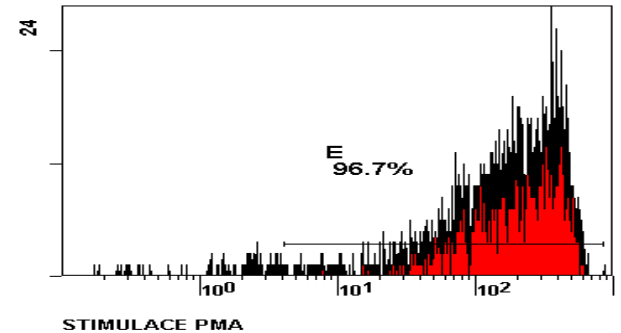
KONTROLA

STIMULACE PMA

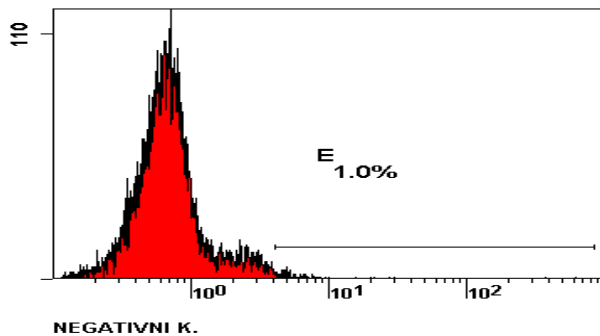
97%

STIMULACE PMA

(4):20211867.LMD FL1 LOG A



(3):20224644.LMD FL1 LOG A

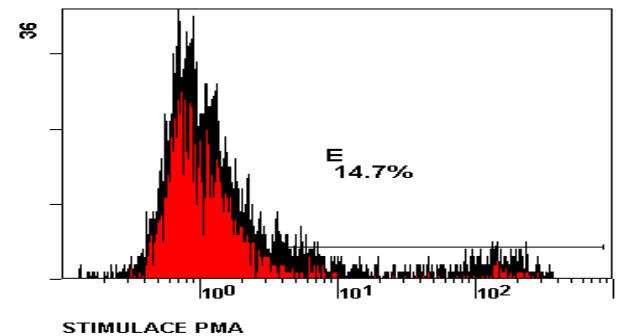


PACIENT

STIMULACE PMA:

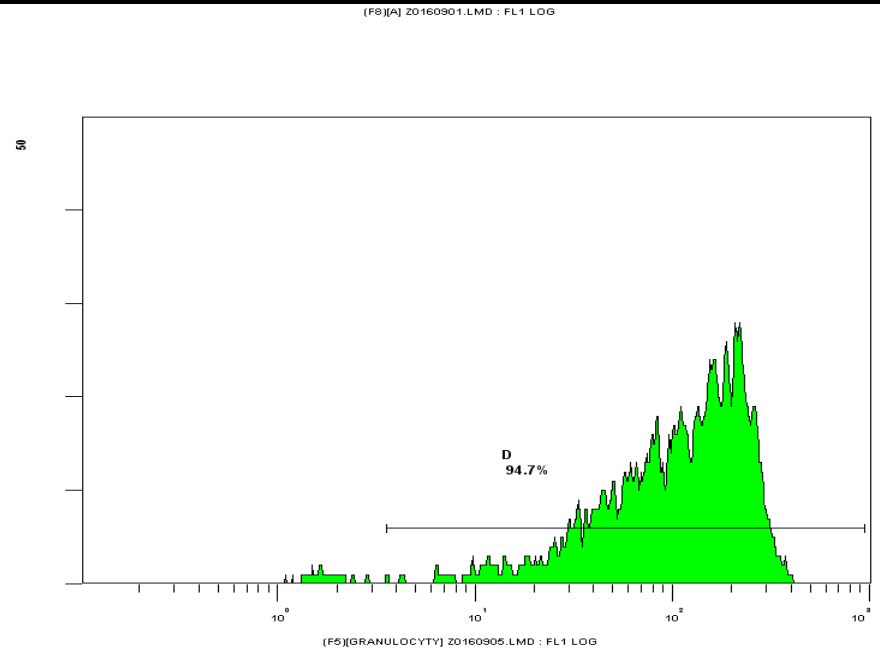
12%

(2):20021462.LMD FL1 LOG A

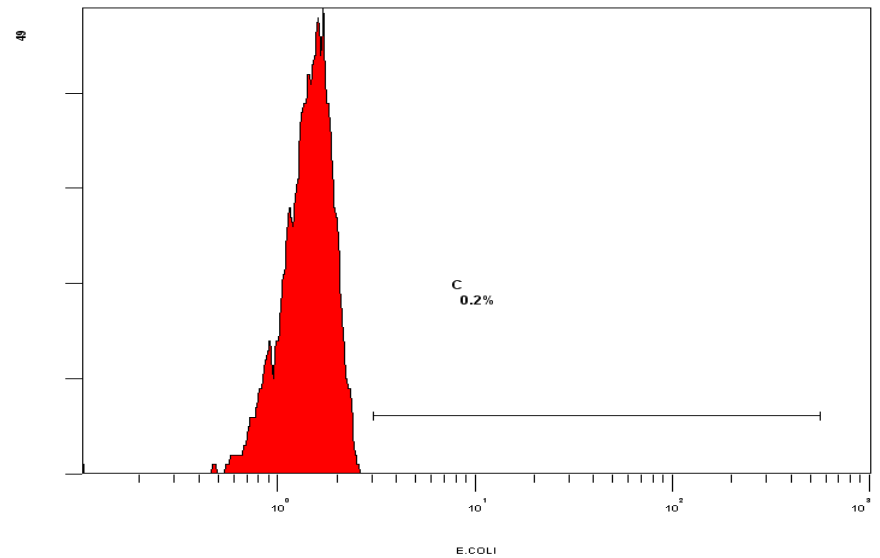


# STIMULACE *E.Coli*

ZDRAVÁ KONTROLA

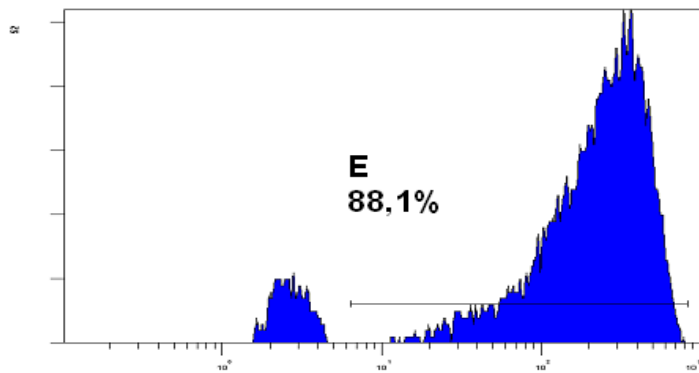


PACIENT S CGD

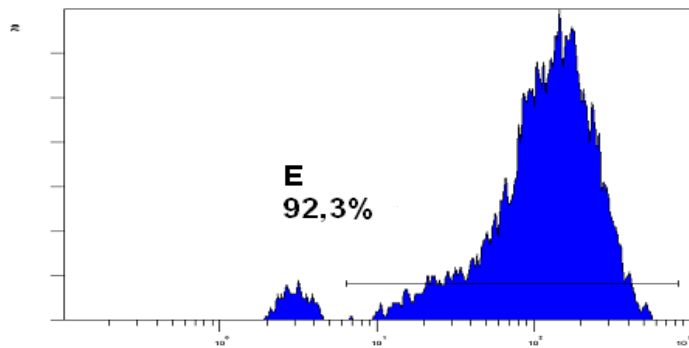




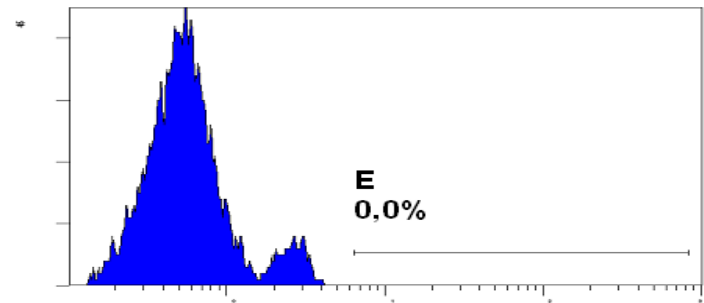
# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ)



Matka - STIMULACE PMA



Otec - STIMULACE PMA



Pacientka - STIMULACE PMA

# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (X-VÁZANÁ)

