



# 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



# 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

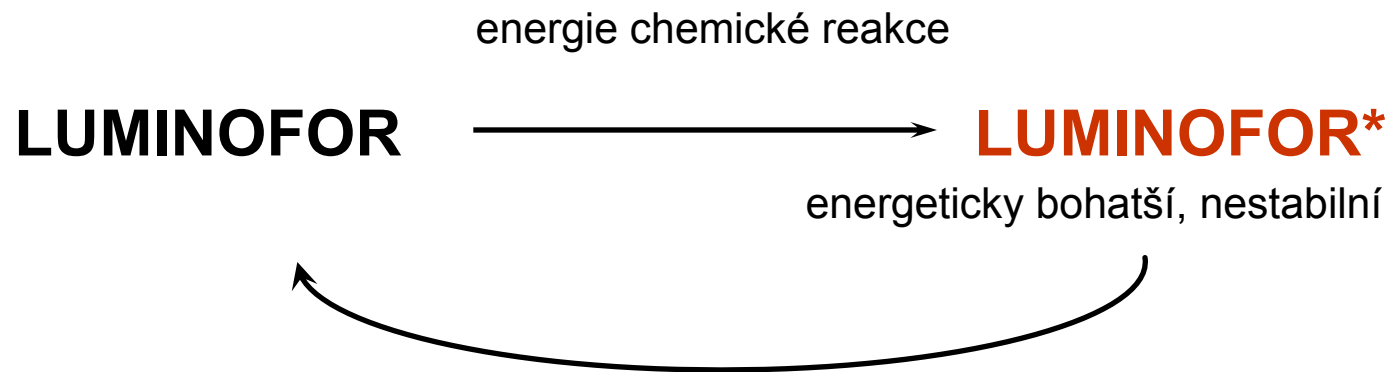
$HOCl$  ... kyselina chlorná

$OH^\cdot$  ... 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

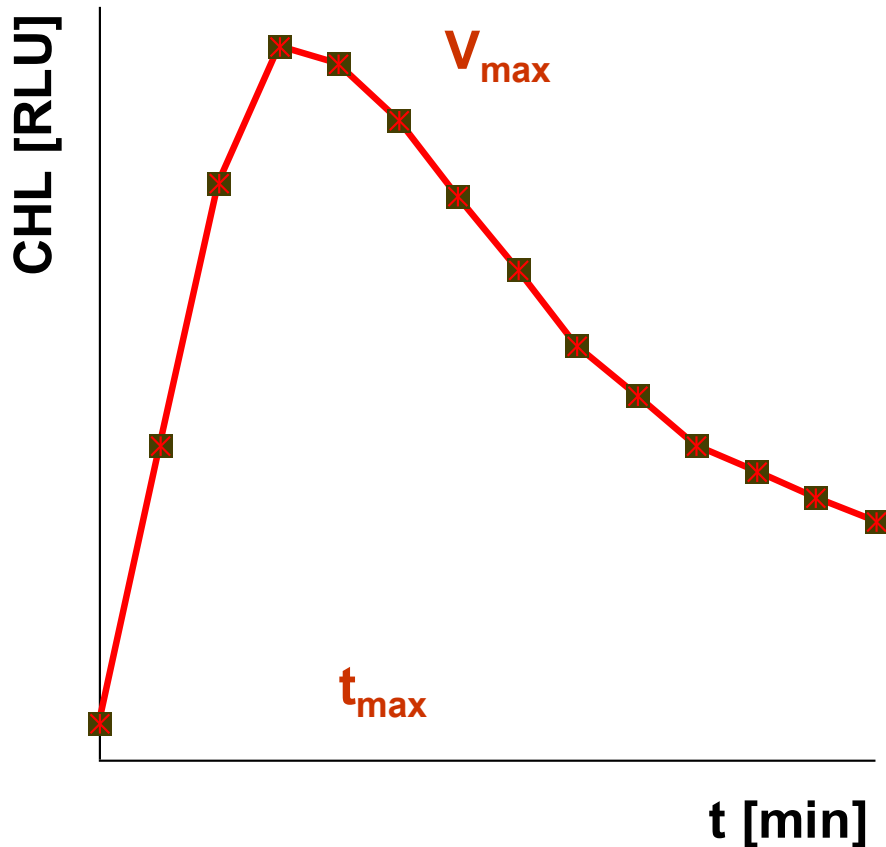
stimulovaná

- **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