

## Úloha č. 11

## CHEMILUMINISCENČNÍ TEST

### Měření luminiscence mikrodestičkovým luminometrem

#### Teorie:

Fagocytující buňky jsou schopné pohltnout a zničit cizorodý materiál nebo vlastní - poškozené či odumřelé buňky. Odstraněným materiálem může být například bakterie či malé minerální částičky. Profesionálními fagocytujícími buňkami imunitního systému jsou neutrofilní a eosinofilní granulocyty, makrofágy, monocyty a dendritické buňky. Po fagocytování částic či buněk dochází k jejich dezintegraci hlavně pomocí hydrolytických enzymů a baktericidních látek v prostředí nízkého pH (4-5). U antigen prezentujících buněk (dendritické buňky, monocyty, makrofágy) pak dochází k vystavení peptidových fragmentů v interakci s MHCII molekulami na jejich povrchu.

Fagocytóza hraje významnou úlohu v imunitním systému a to jak v přirozené, tak i v adaptivní složce imunity. V případě role v přirozené imunitě hraje úlohu hlavně povaha fagocytované částice – pokud jde o cizorodou částici, fagocytující buňky indukují zánět. V adaptivní imunitní odpovědi hrají fagocytující buňky klíčovou roli – Th-lymfocytům musí být cizorodá částice prezentována navázaná na molekulách MHCII, aby mohly být aktivovány.

Chemiluminiscenčním testem hodnotíme jednu z fází fagocytární aktivity krevních elementů. Po stimulaci fagocytujících buněk vznikají v procesu respiračního vzplanutí kyslíkové deriváty se silnými oxidačními schopnostmi. Jejich tvorbu je možné sledovat po přidávku luminoforu, který využívá oxidační energie ke své excitaci do energeticky bohatšího, ale nestabilního stavu. Při následné stabilizaci je oxidačně získaná energie uvolňována ve formě luminometrem registrovatelných světelných kvant (chemiluminiscence).

#### Provedení:

1. Odebrat venózní krev do zkumavky s heparinem 5j/ml. Krev inkubovat 30min při 37°C. krev zpracovat za 45 min po odběru, ale nejpozději do 2 hodin.
2. Stanovit počet leukocytů a vyšetřit krevní diferenciaci u vyšetřované krve.
3. Připravit roztok MEMu: 1ml zásobního MEMu + 9ml destilované vody. Uzavřít proti oxidaci a nechat vytemperovat na laboratorní teplotu. Asi 10min před použitím upravit pH na hodnotu 7,4 pomocí 50μl 7,3% NaHCO<sub>3</sub>. Takto připravený MEM je třeba skladovat ve tmě!
4. Příprava roztoku luminolu:
  - a) **naředit zásobní roztok luminolu 1:9 připraveným MEMem**  
70μl NaHCO<sub>3</sub> + 50μl 0,1 M luminolu + 450μl připraveného MEMu
  - b) **další ředění luminolu z bodu a)**  
60μl luminolu naředěného v a) + 250μl připraveného MEMu
5. připravení mikrodestičky – do rámečku vsadit svisle tolik stripů, kolik je vzorků k vyšetření (2 po stranách jsou pro sledování luminiscenčního pozadí).

## 6. Schéma pipetování reagensů:

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

- Přístroj MeLiX sám měří v 3 min intervalech chemiluminiscenci při 37°C po dobu 45 min (tzn. 15x).
- Po zadání hodnot počtu leukocytů a procenta monocytů + granulocytů v krevním diferenciálu, přepočítá program počet záblesků na  $10^5$  fagocytujících buněk a vypočte index vzplanutí (počet záblesků na  $10^5$  fagocytujících buněk u škrobem stimulovaných vzorků děleno počtem záblesků na  $10^5$  fagocytujících buněk u nestimulovaných vzorků).