



Fagocytóza a metody jejího sledování

Bi5220c Imunologie - cvičení 2021

Fagocytóza

- Profesionální fagocyty
 - Přímá likvidace škodlivin
 - Zpracování a prezentace antigenu

<i>Krok fagocytózy</i>	<i>Metoda k jeho detekci</i>
1) Chemotaxe	Boydenova komůrka, Rebuckovo kožní okénko
2) Rozpoznání / navázání	MSHP test
3) Pohlcení	MSHP test
4) Degradace / usmrcení	Detekce oxidativního vzplanutí, baktericidní test

Stanovení chemotaxe

Pro průběh chemotaxe je nutný:

- 1) podnět (chemokiny, leukotrieny apod.)
- 2) receptory pro výše uvedené signální molekuly (podněty)
- 3) cytoskelet umožňující lokomoci buněk

Boydenova komůrka

- průchodu fagocytů přes nitrocelulózovou membránu

Rebuckovo kožní okénko

- migrace leukocytů do místa zánětu (poškození tkáně)

Stanovení míry ingesce

MSHP test

- **Mikrosférické hydrofilní partikule**

Hodnocení: krevní nátěr

Výhody: Jednoduchost, přístrojová a časová nenáročnost, nízká cena

Nevýhody: Nutná zkušenost s vyhodnocováním, krev musí být čerstvá, měřit lze pouze snížení hodnot

- Ke snížení fagocytózy dochází pouze za velmi vážných stavů, jako jsou například konečná stádia nádorových onemocnění nebo těžké imunodeficence

Celkový průběh fagocytózy

Baktericidní test

- Stejný princip jako u MSHP, ale využívá živých bakterií

Hodnocení: výsev bakterií na živnou půdu, počítání bakteriálních kolonií

Výhody: Vyhodnocení celkového průběhu fagocytózy pomocí přirozených patogenů

Nevýhody: Metoda je náročná na práci a těžko standardizovatelná


Detekce oxidativního vzplanutí

NBT test

- substrát **nitroblue-tetrazolium chlorid** > formazán (modrý)
- schopnost fagocytů tvořit kyslíkové radikály aktivací NADPH oxidázy

Hodnocení: mikroskopicky, spektrofotometricky

Výhody: Metoda je levná, nenáročná



V. Úloha – Stanovení
fagocytárních schopností
leukocytů *in vitro* metodou
chemiluminiscence

Princip

- Fagocyty > oxidativní vyplanutí > ROS > baktericidní účinek
- Luminiscence

*luminofor + energie → přirozeně nestabilní excitovaný luminofor
→ luminofor + **světlo** (425 nm)*

- Měření pomocí luminometru
- Výsledkem je hodnota vzniklého světelného kvanta, která je přímo úměrná míře fagocytózy

Chemikálie a roztoky

- Hanksův roztok (**HBSS**, Hanks Ballanced Salt Sollution) pH 7,4
- zásobní roztok **zymosanových partikulí** (ZP; **2,5 mg/ml**).
- 0,01 M **luminol**
- **Türkův roztok**
- Měřený vzorek – **lidská krev**

Přístroje a pomůcky

- Bürkerova komůrka
- luminometr
- šablona s jednorázovými stripy

Postup

1. Pipetujeme na desku v pořadí dle následujícího schématu:

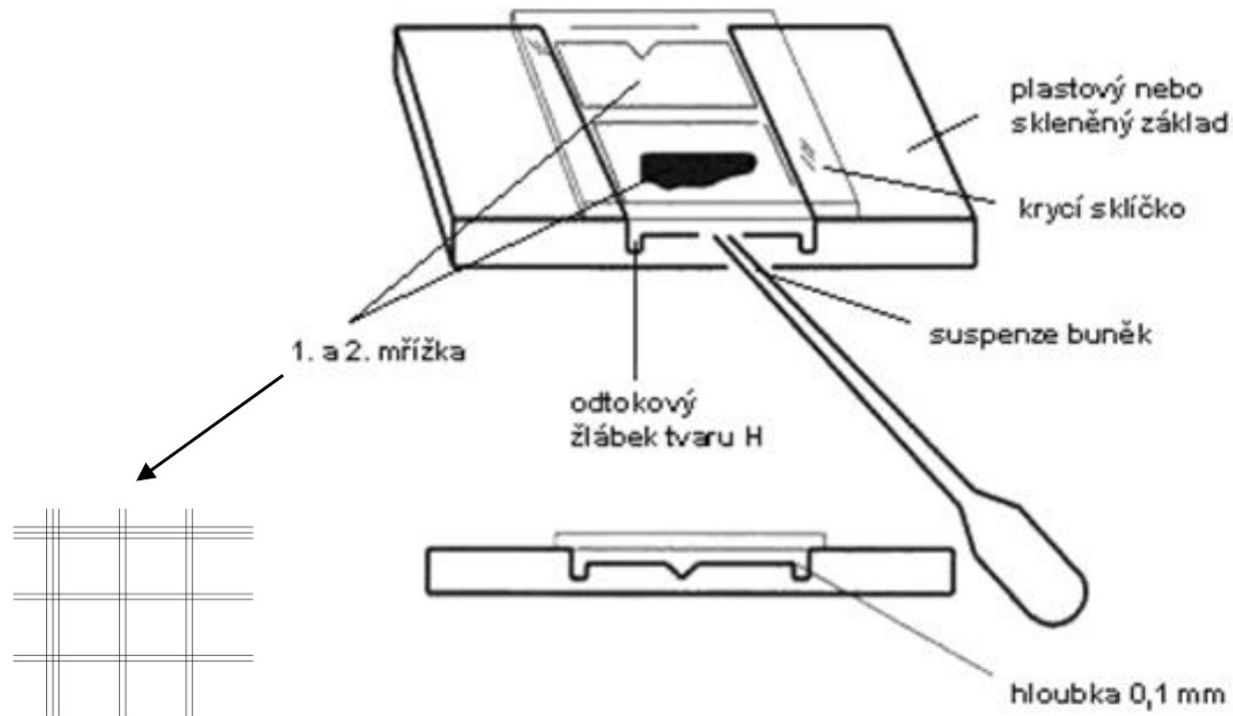
	Jamka	[μl]			
		HBSS	Luminol	Plná krev	Aktivátor
Spontánní CL	A	273	25	2	-
	B	273	25	2	-
Aktivovaná CL	C	248	25	2	25
	D	248	25	2	25

Pořadí pipetování na destičku: 1. 2. 3. 4.

2. Ihned po napipetování všech jamek měříme destičku na luminometru v režimu:
 - interval mezi jednotlivými měřeními: 60 s
 - počet měřících cyklů: 130
 - teplota: 37 °C
 - bez třepání

Postup

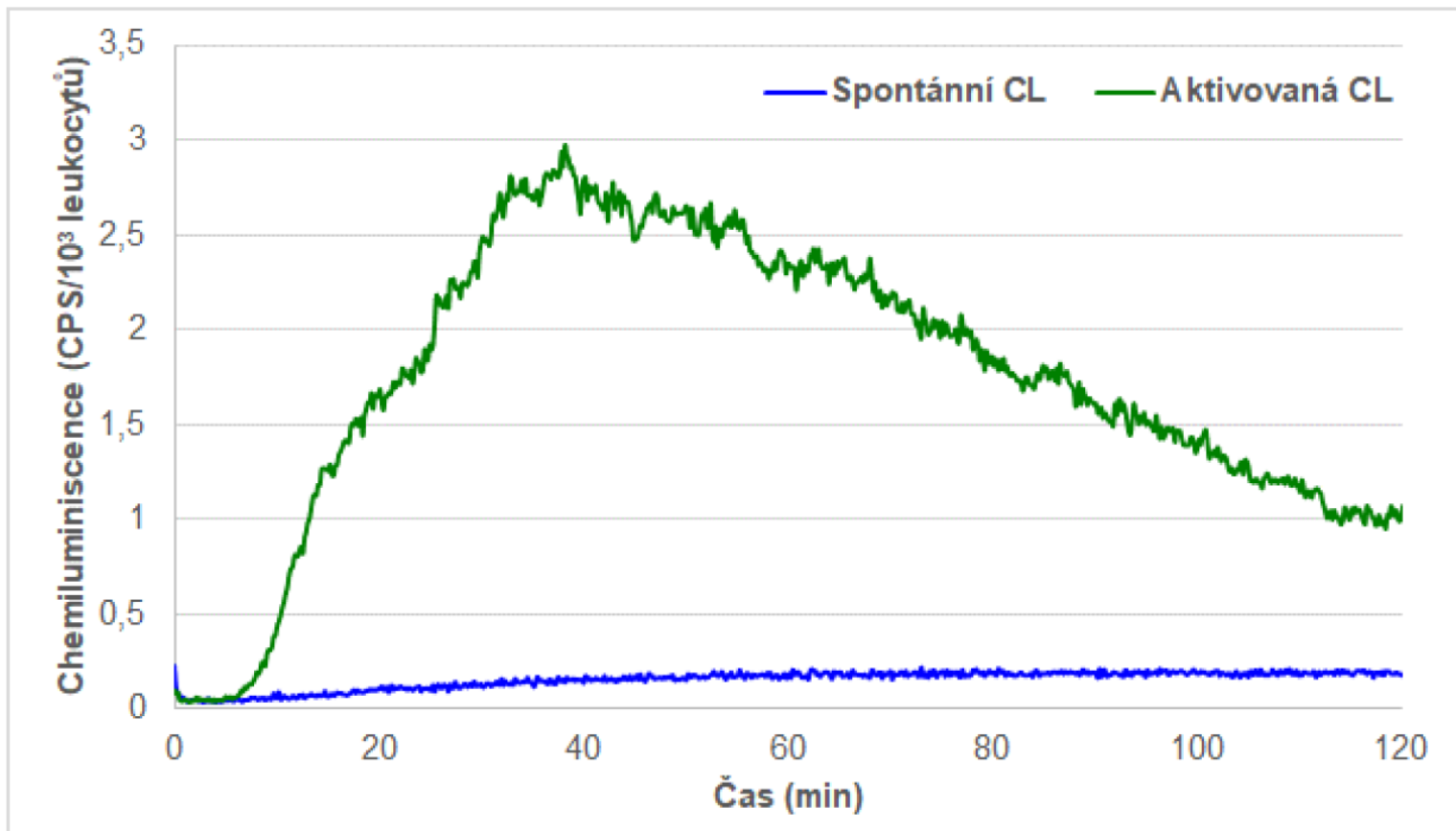
- Pomocí Bürkerovy komůrky koncentraci leukocytů ve zkoumaném vzorku lidské krve v ředění 1 : 20
(10 μ l krve + 190 μ l Türkova roztoku)



Hodnocení

- Ze získaných výsledků vytvořte **zjednodušenou tabulku**
 - Průměrné hodnoty duplikátů
 - Přepočet na 1000 **fagocytujících** leukocytů (CPS/10³ leu)
 - Pozor – v každé jamce 2 ul krve
- Ze získaných hodnot vytvořte **graf kinetiky**
 - průběh CL v čase pomocí křivky

Výstup



Obr. 5.2: Graf kinetiky spontánní a aktivované CL.

Výstup

- **Graf kinetiky**
- **Tabulka**
 - Maximum CL
 - Čas dosažení maxima
 - Intergrál (přepočtený na 1000 leukocytů)