

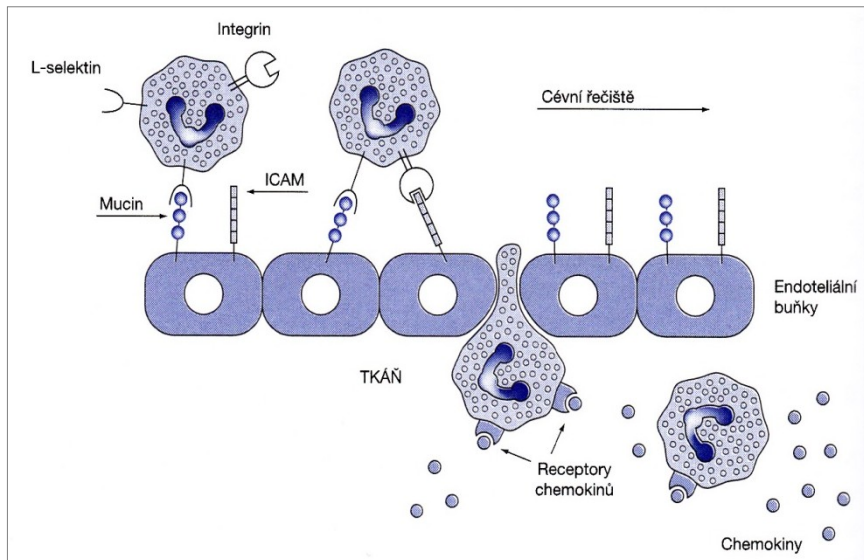
Imunologie cvičení

Fagocytóza a metody jejího sledování

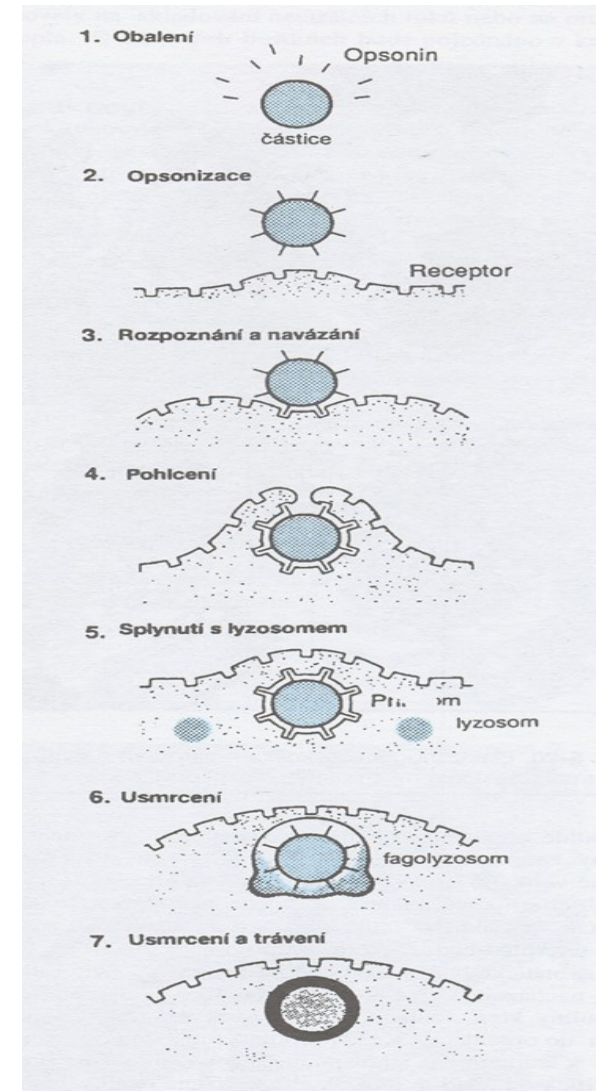
MVDr. Mgr. Monika Dušková, Ph.D.

Fagocytó za

- profesionální fagocyty: využívají fagocytózu k jinému účelu než je získání potravy
- neutrofily, eozinofily – destrukce patogena
- monocyty, dendritické buňky, makrofágy – navíc antigen prezentující funkce
- fáze fagocytózy: chemotaxe, adheze, ingesce a degradace škodliviny



Zachycení fagocytů na endotel a průnik do tkáně



Zachycení, pohlcení a destrukce patogena ve fagocytu

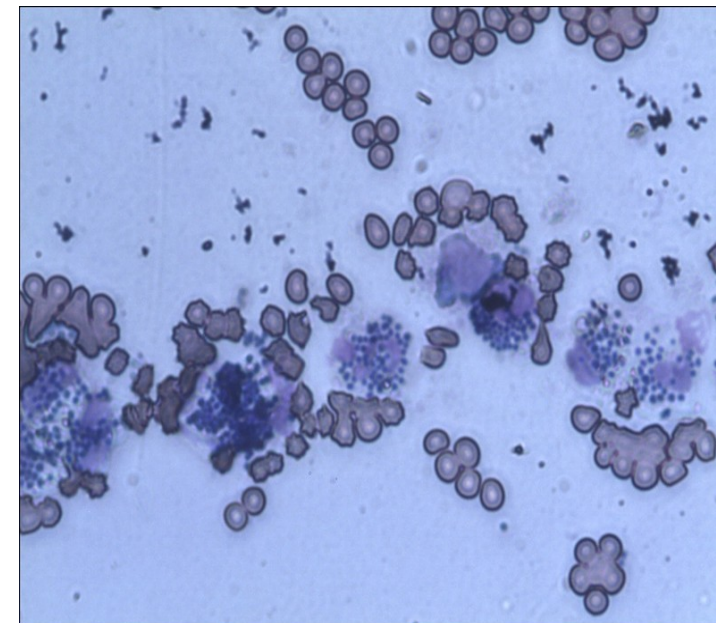
Krok fagocytózy	Metoda k jeho detekci
1) Chemotaxe	Boydenova komůrka, Rebuskovo kožní okénko
2) Rozpoznání / navázání	MSHP test
3) Pohlcení	MSHP test
4) Degradace / usmrcení	Detekce oxidativního vzplanutí, baktericidní test

MSHP test: *mikrosférické hydrofilní partikule*

Slouží k detekci míry pohlcování (ingesce)

Částice, které se v tomto testu používají jsou z hydroxyethylmetakrylátu.

1. Plná krev se po dobu cca 60 min inkubuje s částicemi (mírného třepání, 37 °C).
2. Ze suspenze se zhotoví krevní nátěr, který se obarví.
3. Intenzita fagocytózy se poté hodnotí vizuálně ve světelném mikroskopu.
Jako pozitivní se zpravidla označují buňky, které pohltní 3 a více partikulí.

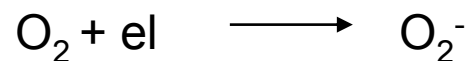


Zdroj: VFU Brno

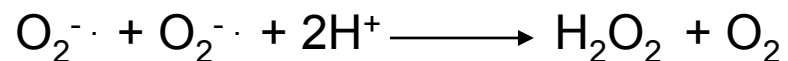
V průběhu degradace se uplatňují **reaktivní kyslíkové metabolity (RKM)**, neboli kyslíkové radikály, které vytváří fagocyt za účelem rozložení škodliviny. RKM mohou napadat molekuly lipidů, proteinů i nukleových kyselin patogena, ale hrozí i poškození vlastních tkání při nadprodukci RKM.

Reakce tvorby RKM:

1. Vznik superoxidového radikálu (NADPH oxidáza)

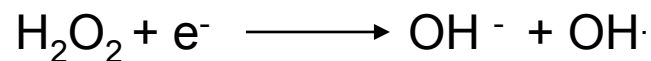


2. Ze dvou molekul superoxidového radikálu vzniká peroxid vodíku



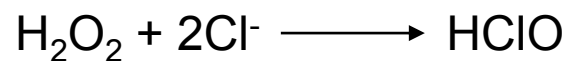
(v kyselém pH přímo, v neutrálním vyžaduje katalýzu SOD superoxiddismutázami)

3. Peroxid vodíku přijetím elektronů (redukci) dává vznik hydroxilovému radikálu



Buď tzv. Fentonovou reakcí – elektron poskytuje železnatý kationt, nebo Haber-Weisova reakce – elektron se získá ze superoxidového radikálu

4. Mimo to může peroxid vodíku reagovat s chloridovými anionty za vzniku kyseliny chlorné



Katalyzuje to myeloperoxidáza, je v neutrofilech

Metody detekce oxidativního vzplanutí

Všechny uvedené RKM působí jako oxidanty. Toho lze využít pro jejich detekci

NBT test: Při stanovení se využívá substrát NBT – nitroblue-tetrazolium chlorid. Detekce oxidačního metabolismu je založena na přeměně bezbarvé tetrazoliové soli (NBT) na barevný formazán. NBT vstupuje do buněk a po jejich aktivaci se vlivem RKM mění na barevnou formu – tmavě modrý formazán. Změnu barvy lze měřit vizuálně v mikroskopu nebo spektrofotometricky

Chemiluminiscenční analýza: je založena na reakci luminoforu (**luminol** nebo lucigenin) s oxidanty, zejména s peroxidem vodíku.

Při reakci dochází k oxidaci luminolu na nestabilní meziprodukt, který vyzařuje energii v podobě modrého světla. Konečným produktem vzniklým z luminolu je aminoftalát.

Vzniklé světlo je okem nepozorovatelné, je ho však možné registrovat na speciálním přístroji – luminometru.

Míra produkce světla je přímo úměrná produkci RKM a přímo úměrná intenzitě fagocytózy.

Výstup chemiluminiscenčního měření míry fagocytózy

Stanovení RKM chemiluminiscenční reakcí:

více RKM = větší aktivita fagocytů

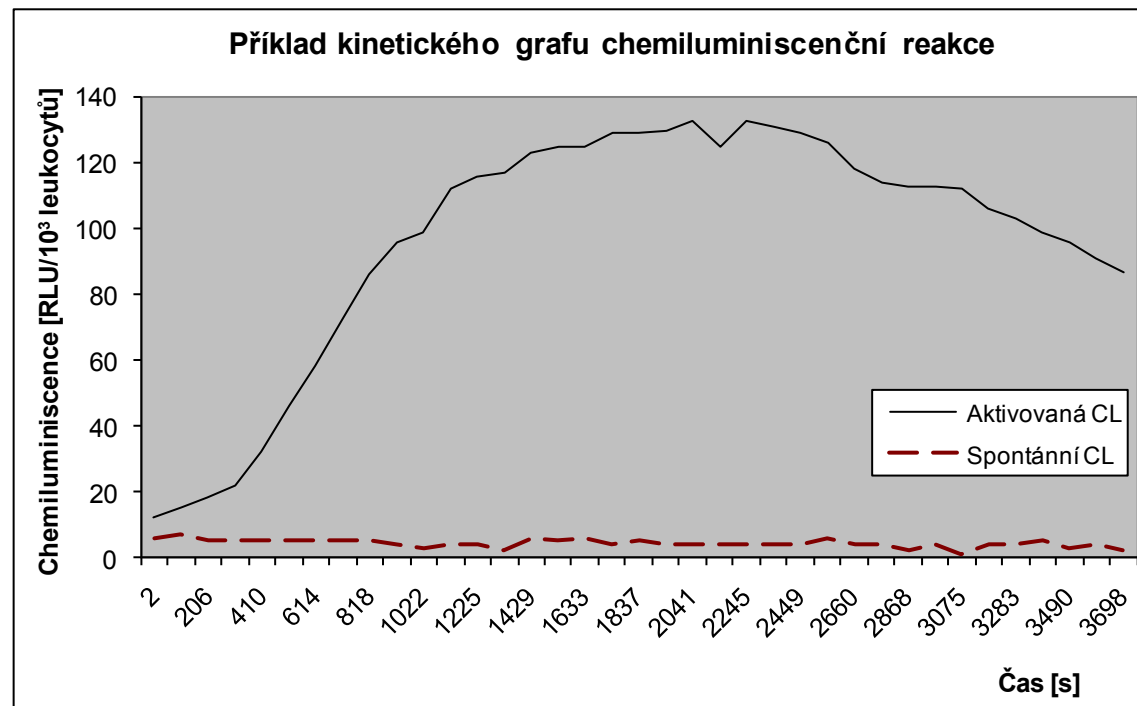
Komponenty reakční směsi:

Fagocyty (plná krev)

Luminol

Aktivátor (u spontánní reakce pufr)

Pufr



Měří se obvykle **spontánní a aktivovaná fagocytóza**

Aktivátor: substance, kterou fagocyty pohlcují a tím se zahajuje fagocytární proces

např. škrobová zrna, bakterie, aktivní uhlí, složky buněčných stěn bakterií nebo kvasinek)

Vyhodnocení výsledku do protokolu

Z dodaných hodnot CL signálu spočítat vždy průměr ze dvou paralelek pro každý měřený čas

Z metodiky zjistíme jaké množství krve bylo fakticky v jamce a vypočteme, kolik z toho představují fagocyty
Počet fagocytů/μl máte uvedený u výsledků, vypočítali jsme ho z absolutního počtu leukocytů a diferenciálu

Pomocí trojčlenky přepočteme naměřený CL signál na 1 000 fagocytů

Naměřený CL signál (průměr ze 2 jamek)..... Počet fagocytů / μl x 2 (v jamce byly 2 μl krve)
 X.....1 000 fagocytů

Tento přepočtený signál vyneseme do grafu a určíme velikost píku a času píku pro spontánní a aktivovanou reakci

Integrál křivek máme uvedený ve výsledcích, do protokolu je ho třeba také přepočítat na 1 000 fagocytů