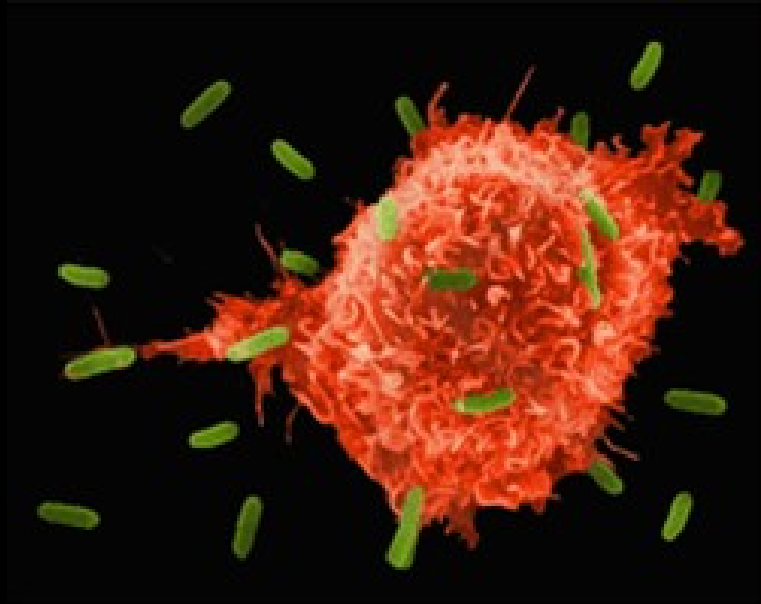
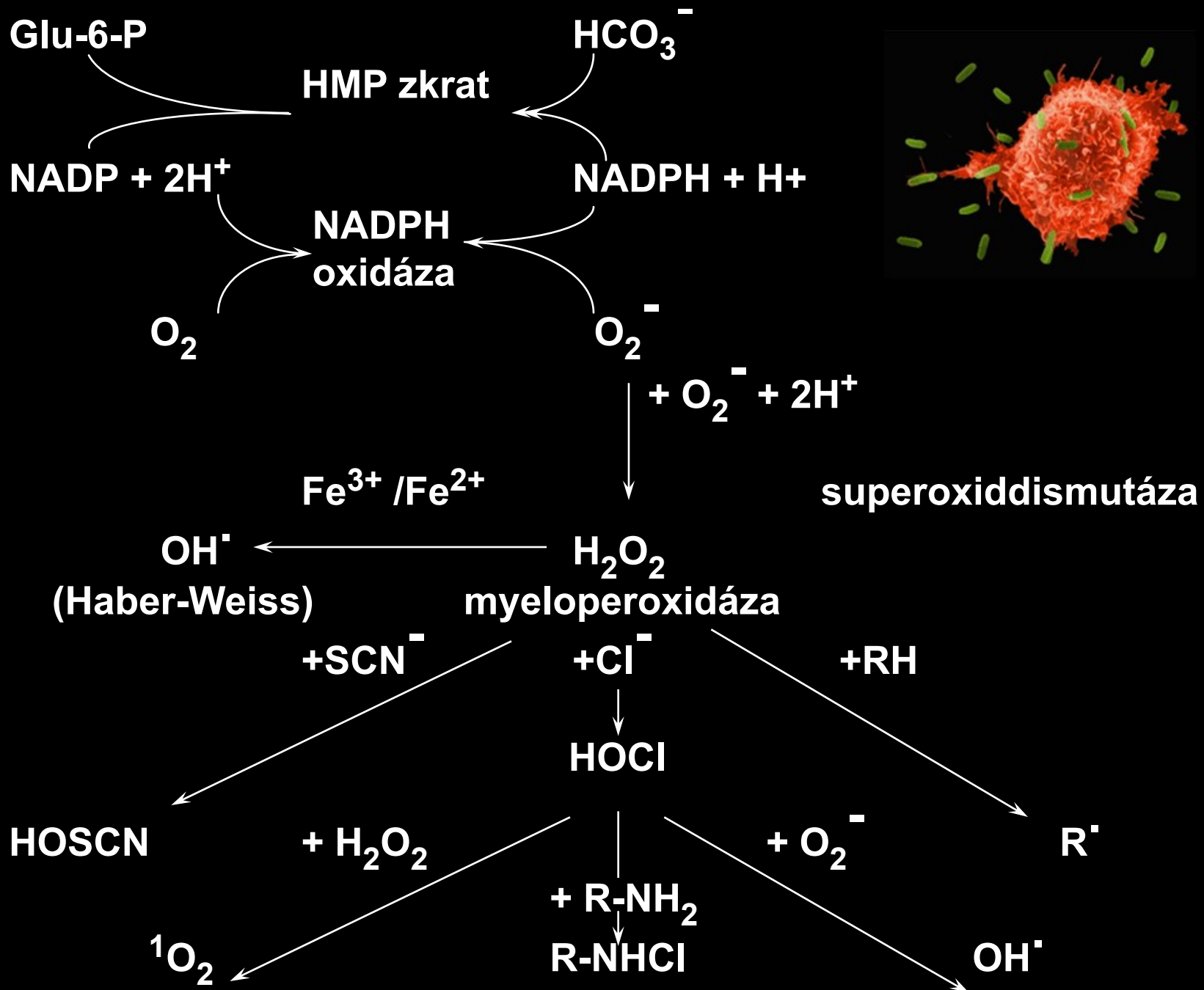


# FAGOCYTOZA II



Mgr. Olga Tichá, LF MU

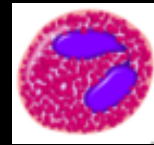


# FAGOCYTUJÍCÍ BUŇKY

neutrofil



eosinofil



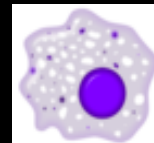
basofil



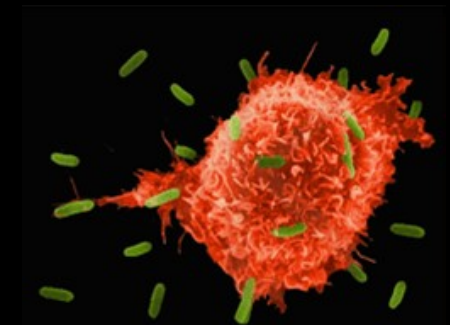
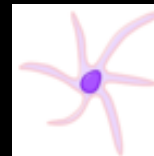
monocyt



makrofág



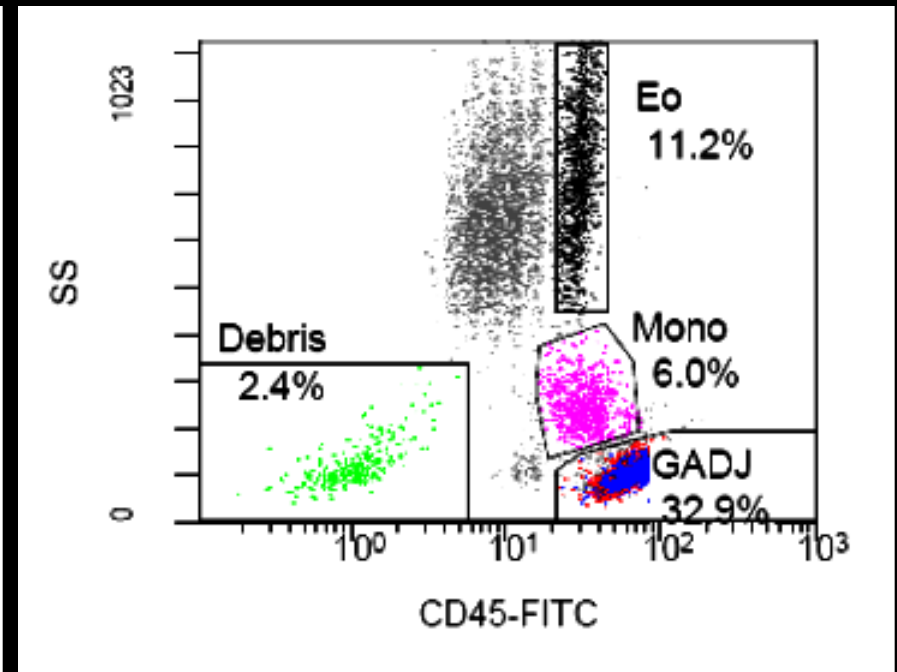
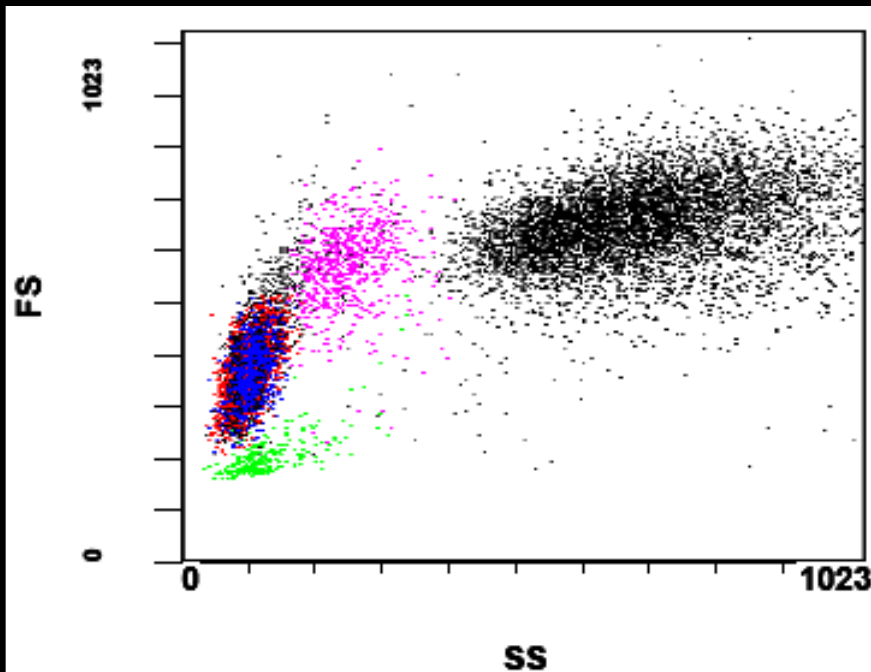
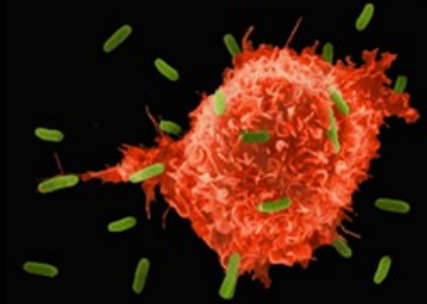
dendritická b.



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

# KREVNÍ DIFERENCIÁL

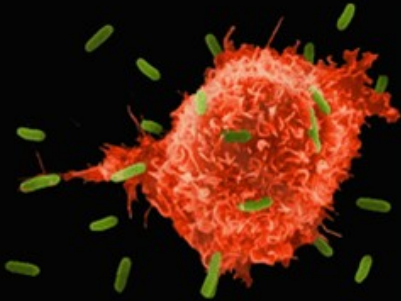
- využití průtokové cytometrie
- s mAb nebo bez nich
- granulocyty tvoří 40-65% všech leukocytů periferní krve



# PRŮBĚH FAGOCYTÓZY

- **ADHEZE** („rolling“) → cytometrie – exprese LAD1, LAD2
- **EXTRAHAZACE A DIAPEDÉZA**
- **ROZPOZNÁNÍ OPONIZOVANÝCH ČÁSTIC**
- **CHEMOTAXE** → test migrace pod agarózou
- **INGESCE** → fagocytóza mikroorganismů nebo inertních částic
- **DIGESCE** - mechanismus nezávislý na kyslíku
  - mikrobicidní test, detekce enzymů
  - mechanismus závislý na kyslíku
    - mikrobicidní test, NBT, INT, detekce myeloperoxidázy, chemiluminiscenční test, „burst“ test

# ROZPOZNÁVACÍ MECHANISMY FAGOCYTŮ



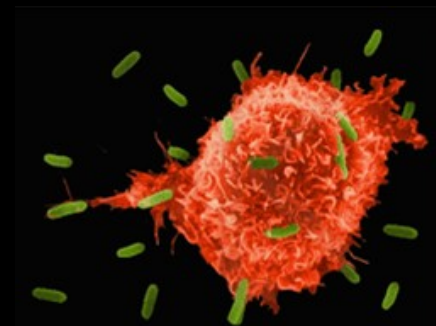
Fagocyty jsou schopné rozpoznat struktury, které se nacházejí na povrchu mikroorganismů, ale ne na buňkách vlastních. Tyto struktury jsou evolučně konzervované, sdílené různými mikroorganismy a nezbytné pro jejich život.

- **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:

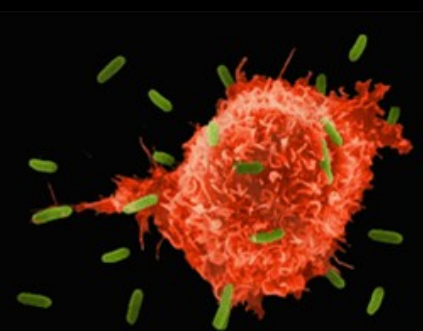
- **manóзовé receptor** rozeznávající cukerné struktury na povrchu bakterií a některých virů
- scavengerové receptory – rozeznávají acetylované LDL
- chemotaktické receptory (fMLP)
- **Toll-like receptor**
- **komplementové receptor**
- **Fc receptor**



# 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

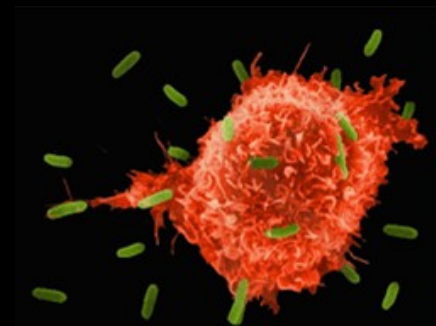
- sledování schopnosti fagocytů pohlcovat a usmrcovat živé kvasinky; usmrcené kvasinky se z fagocytů uvolní deoxycholátem a jejich množství se určí obarvením methylenovou modří

- NBT (INT) TEST

- 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

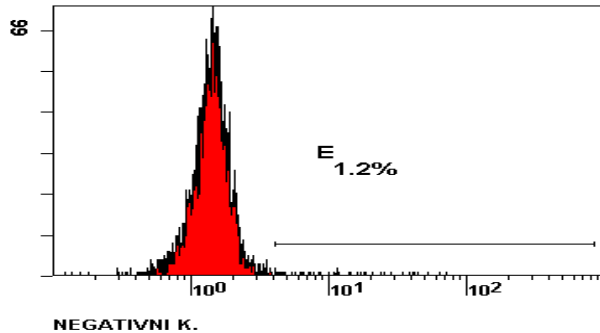
# Burst test II.

- 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

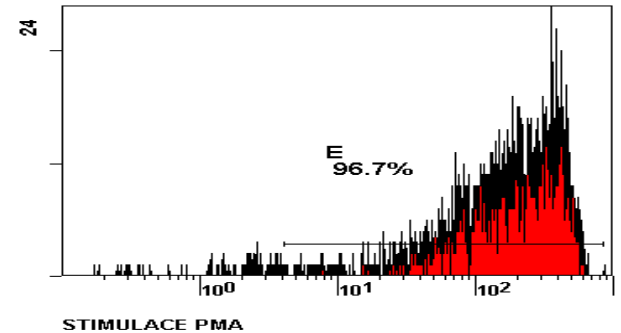
KONTROLA

STIMULACE PMA

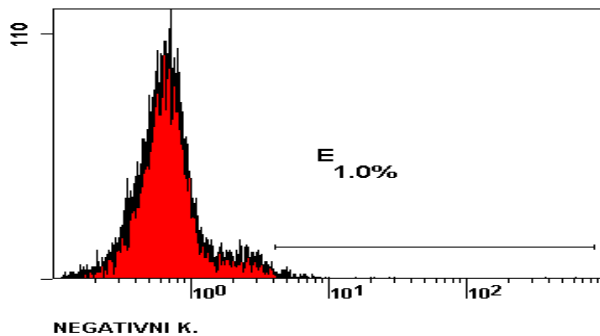
97%

STIMULACE PMA

(4):20211867.LMD FL1 LOG A



(3):20224644.LMD FL1 LOG A

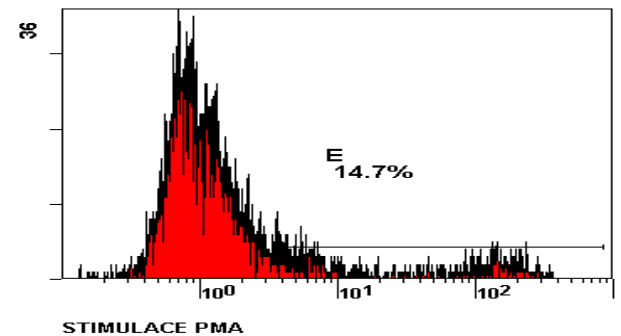


PACIENT

STIMULACE PMA:

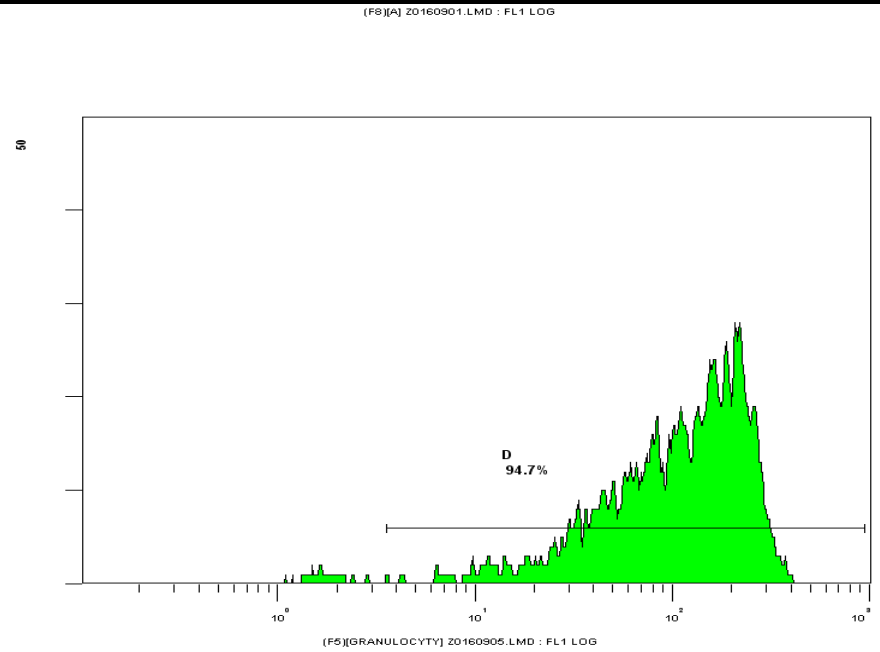
12%

(2):20021462.LMD FL1 LOG A

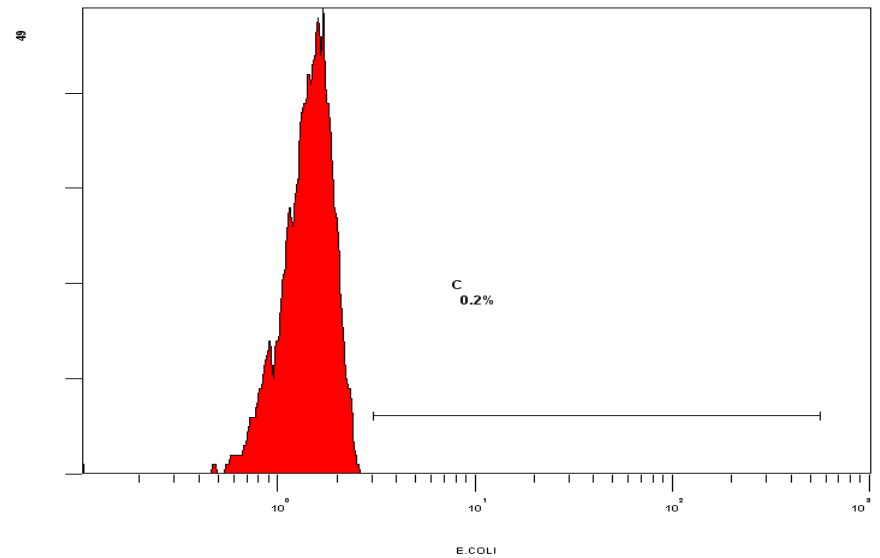


# STIMULACE *E.Coli*

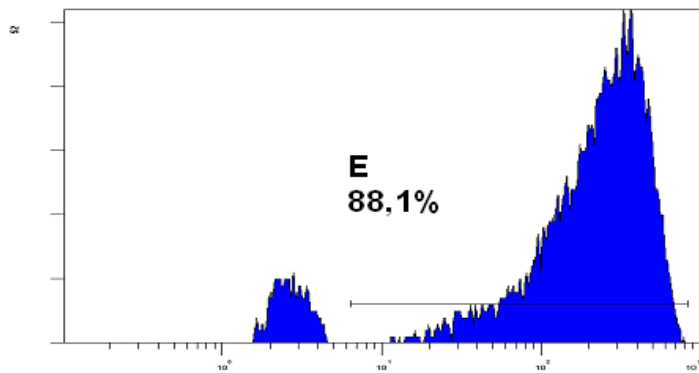
ZDRAVÁ KONTROLA



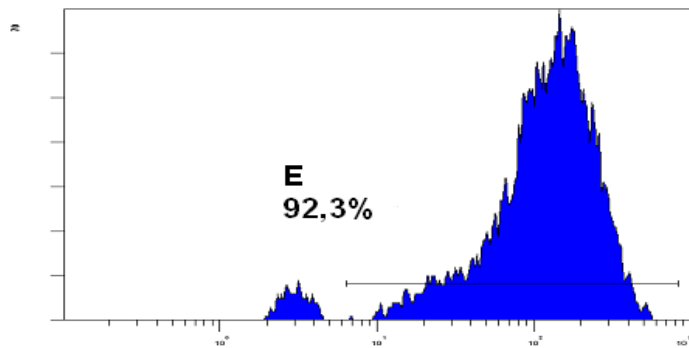
PACIENT S CGD



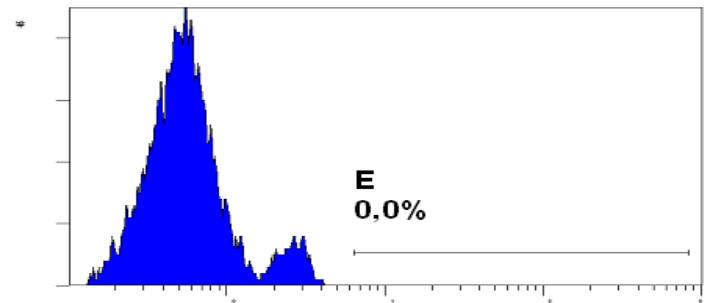
# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (AUTOZOMÁLNĚ RECESIVNÍ)



Matka - STIMULACE PMA



Otec - STIMULACE PMA



Pacientka - STIMULACE PMA

# CHRONICKÁ GRANULOMATÓZA (X-VÁZANÁ)

