

Monocitų ir granulocitų fagocitinio aktyvumo vertinimas tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais: žvalgomasis tyrimas

Rebeka Žebrauskaitė^{1,2}, Viltė Marija Gintauskienė¹, Dovydas Bagdonas¹,
Brigita Gradauskienė¹

¹ Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Imunologijos ir alergologijos klinika

Department of Immunology and Allergology, Lithuanian University of Health Sciences

² Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Imunologijos ir alergologijos klinikos Imunologijos laboratorija

Laboratory of Immunology, Department of Immunology and Allergology, Lithuanian University of Health Sciences

El. paštas: zebruskaite.rebeka@gmail.com

Santrauka

Įvadas. Imunitetas užtikrina organizmo vidinę homeostazę, apsaugo nuo genetiškai svetimų komponentų – antigenų. Fagocitai (monocitai ir granulocitai) atlieka pagrindinį vaidmenį įgimame imunitete, taip pat prisideda prie įgyto imuniteto funkcijos. Esant pirminiams ar antriniams fagocitų funkcijos sutrikimams pasireiškia imuninio atsako nepakankamumas, todėl klinikinėje praktikoje svarbu laiku ir efektyviai įvertinti fagocitinę funkciją. Tai galima atlikti laboratoriniais metodais.

Darbo tikslas. Įvertinti monocitų ir granulocitų fagocitinio aktyvumo rezultatus tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais.

Metodai. Analizuoti 85 pacientų (45 vyrų ir 40 moterų, 8 mėn. – 61 m. amžiaus) monocitų ir granulocitų fagocitozės aktyvumo tyrimo kiekybiniai rezultatai, gauti tėkmės

citometrijos metodu (PHAGOTEST™, Celonic Group, Vokietija), ir pusiau kiekybiniai rezultatai, gauti fluorescencinės mikroskopijos metodu (fluoresceino izotiocionatu žymėtų *E. coli* skaičius 100-te fagocitavusių granulocitų). Fagocitozės aktyvumo nustatymo koeficiento skaičiavimo principas: viena fagocituota bakterija, rasta mikroskopijos metodu, atitinka X švytėjimo intensyvumą (RLU), nustatytą tėkmės citometrijos metodu.

Tyrimo rezultatai. 85 tiriamųjų monocitų ir granulocitų fagocitinis aktyvumas, gautas tėkmės citometrijos metodu, yra $5609,64 \pm 185,10$ RLU (santykiniai šviesos vienetai), fluorescencinės mikroskopijos metodu – $7,05 \pm 0,20$ fagocituotų bakterijų. Vyrams, atsižvelgiant į amžių, nustatyta didesnė dalis fagocitavusių monocitų nei moterims ($p = 0,008$). Vertinant ląstelių fagocitinį aktyvumą tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, nustatytas tiesioginis ryšys ($r > 0,7$, $p < 0,05$) tarp rezultatų, gautų abiem metodais. Viena fagocituota bakterija, rasta ląstelėje fluorescencinės mikroskopijos metodu, atitinka $797,92 \pm 14,31$ RLU, nustatant fagocitinį aktyvumą tėkmės citometrijos metodu.

Išvados. Tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodai yra informatyvūs tiriant fagocitinį aktyvumą. Fagocitinį aktyvumą vertinant tėkmės citometrijos metodu, identifikuoti monocitų funkcinio aktyvumo ypatumai yra susiję su tiriamųjų lytimi ir amžiumi.

Reikšminiai žodžiai: imunodeficitas, fagocitozė, tėkmės citometrija, fluorescencinė mikroskopija.

ĮVADAS

Imunitetas užtikrina organizmo vidinę homeostazę, t. y. apsaugo nuo genetiškai svetimų komponentų – virusų, bakterijų ir įvairių kitų antigenų [1]. Jis gali būti įgimtas arba dar vadinamas nespecifinis, kurį sudaro fiziniai ir cheminiai barjerai, fagocitai, komplemento sistema ir kiti baltymai ir yra atsakingas už pirminį atsaką į antigeną, bei įgytas arba specifinis, kuriame dalyvauja T ir B limfocitai. Fagocitai (monocitai ir granulocitai) atlieka pagrindinį vaidmenį įgimame imunitete, pašalindami patogenines bakterijas, mikroskopinių grybų antigenus ir navikines ląsteles, taip pat kaip antigeną pateikiančios ląstelės prisideda prie įgyto

imuniteto [2]. Esant pirminiams (įgimtiems) ar antriniams (įgytiems) fagocitų funkcijos sutrikimams kinta fagocitinis aktyvumas [3] ir pasireiškia imuninio atsako nepakankamumas [4], todėl klinikinėje praktikoje svarbu laiku ir informatyviai įvertinti fagocitinę funkciją, o tai galima atlikti prieinamais laboratoriniais metodais.

Paprastai fagocitinės funkcijos tyrimas atliekamas *in vitro* skaičiuojant ląstelėse esančių opsonizuotų bakterijų kiekį naudojant mikroskopą arba matuojant fluorochromais žymėtų bakterijų fluorescencijos aktyvumą tėkmės citometrijos metodu [5, 6]. Kadangi fagocitinės funkcijos tyrimą atliekant tėkmės citometrijos metodu reikia specialios įrangos ir kompetentingų darbuotojų, tai pritaikius alternatyvius

dažymo metodus ir įvertinus referentines ribas fluorescencinė mikroskopija galėtų tapti labiau prieinamu tyrimo metodu, kurio rezultatai būtų patvirtinami tėkmės citometrijos metodu. Fagocitinė funkcija kinta priklausomai nuo fiziologinių ypatybių – lyties ir amžiaus [7, 8, 9], tačiau fagocitinio aktyvumo vertinimo įprastais laboratoriniais tyrimais referentinės ribos nėra numatytos atsižvelgiant į lyties ir amžiaus kriterijus. Todėl šio tyrimo tikslas buvo įvertinti monocitų ir granulocitų fagocitinę funkciją, analizuojamą automatizuotu tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, bei gautus rezultatus palyginant pagal amžiaus grupes, atsižvelgiant į tiriamųjų lytį.

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Imunologijos ir alergologijos klinikoje, gavus Kauno regioninio biomedicininio tyrimų etikos komiteto leidimą Nr. BE-2-78. Į tyrimą įtraukti 85 pacientai, iš jų 40 moterų ir 45 vyrai, kuriems buvo įtariamas fagocitinės funkcijos sutrikimas, tačiau anksčiau nebuvo patvirtinta imunodeficito diagnozė. Tiriamieji, remiantis literatūros duomenimis ir atsižvelgiant į imuninių ląstelių fiziologinius ypatumus, susijusius su amžiumi [10, 11, 12], buvo suskirstyti į dvi grupes: I grupę sudarė < 18 metų, II grupę – ≥ 18 metų amžiaus tiriamieji. Pacientų kraujo ėminiai numatytiems fagocitų funkcinio įvertinimo tyrimams buvo renkami standartinėmis sąlygomis iš periferinės venos punkcijos būdu į vakuuminius kraujo surinkimo mėgintuvėlius be skiriamąjo gelio, su sausu antikoagulantu ličio heparinu (VACUETTE®, JAV).

Fagocitozės aktyvumas vertintas tėkmės citometrijos bei fluorescencinės mikroskopijos metodais. Fagocitozės aktyvumo kiekybiniam įvertinimui tėkmės citometru FACSLytic (Becton Dickinson, JAV) naudotas standartizuotas PHAGOTEST (Celonis Group, Vokietija) reagentų rinkinys. Kraujo mėginiai tyrimui ruošti remiantis gamintojo rekomendacijomis [13]. Tyrimo metu į tiriamuosius kraujo mėginius įdėta opsonizuotų *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterijų, žymėtų fluoresceino izotiocianatu (FITC). Po mėginių inkubacijos (37 °C) bakterijomis įpilta švytėjimą slopinančio tirpalo, kuris slopina nefagocituotų, tarpląstelinėje ertmėje esančių bakterijų švytėjimą ir neleidžia bakterijoms prisitvirtinti prie citoplazmos. Vėliau įpilta, plovimo tirpalo, kuris nefagocituotas bakterijas išplauna iš mėginio. Po plovimo etapų eritrocitai lizuoti 20 min. kambario temperatūroje tamsoje, įdėjus lizės buferio. Vėliau mėginiai centrifuguoti 5 min. 250 × g greičiu 4 °C temperatūroje bei 2 kartus plauti plovimo tirpalu. Fagocituojančių ląstelių branduoliai dažyti DNR dažu propidžio jodidu, kuris jungiasi tarp bazių porų (1 dažo molekulė / 4–5 DNR bazių poros). Paruošti mėginiai analizuoti tėkmės citometru FACSLytic (Becton Dickinson, JAV) ir mikroskopuoti fluorescenciniu mikroskopu EUROStar III Plus ir EUROPattern (Euroimmun, Vokietija).

Monocitų ir granulocitų fagocitinis aktyvumas kiekybiškai nustatytas tėkmės citometrijos metodu, vertinant *E. coli* fagocitavusių granulocitų ir monocitų procentinę dalį bei granulocitų ir monocitų fagocitozės aktyvumą, apskaičiuojant geometrinį švytėjimo intensyvumo vidurkį, išreikštą santykiniais šviesos vienetais (RLU), kurie atitinka vidutinį 100-te

ląstelių fagocituotų *E. coli* skaičių, nustatytą mikroskopijos metodu. Gamintojo rekomenduojamos fagocituojančių ląstelių procentinės dalies referentinės ribos pateikiamos 1 lentelėje [14].

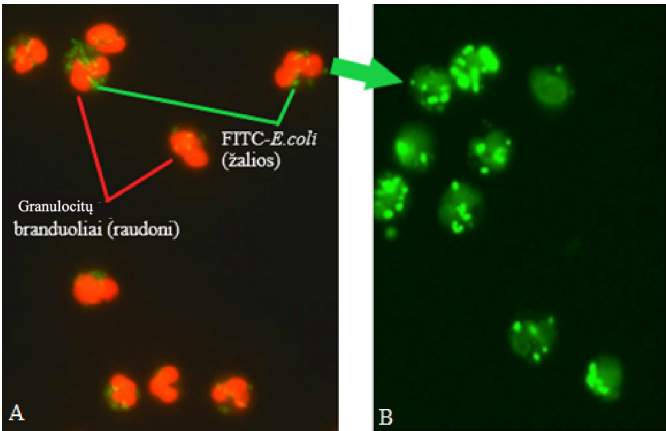
1 lentelė. Monocitų ir granulocitų kiekybinio fagocitozės aktyvumo referentinės ribos [14]

Table 1. Reference limits of monocytes and granulocytes quantitative phagocytic activity [14]

Ląstelių tipas	Fagocituojančių ląstelių dalis (proc.)
Granulocitai	95–99
Monocitai	65–95

Ląstelių rinkimui ir analizei naudota BD FACSuite v1.3 programinė įranga (Becton Dickinson, JAV). Analizatoriaus nustatymai ir kompensaciniai lygiai optimizuoti BD FC rutuliukų (angl. *beads*) mėginiais (Becton Dickinson, JAV).

Mikroskopuojant fluorescenciniu mikroskopu pagal fagocitų branduolių DNR švytėjimą identifikuota ir skaičiuota 100-tas *E. coli* bakterijas fagocitavusių ląstelių, kurios įvardytos kaip granulocitai (1 pav.).



1 pav. Granulocitų, fagocitavusių bakterijas, vertinimas fluorescencinės mikroskopijos metodu EuroStar III Plus (A) ir EUROPattern (B) mikroskopais

Fig 1. Evaluation of granulocytes that have phagocytosed bacteria by fluorescence microscopy using EuroStar III Plus (A) and EUROPattern (B) microscopes

Kiekvienam mėginiui apskaičiuotas 100-te granulocitų fagocituotų *E. coli* bakterijų skaičiaus aritmetinis vidurkis [6] bei apskaičiuotas fagocitozės aktyvumo vertinimo koeficientas: viena fagocituota bakterija, rasta mikroskopijos metodu, atitinka X švytėjimo intensyvumą (RLU), nustatytą tėkmės citometrijos metodu.

Statistinė analizė atlikta naudojant „SPSS 28,0“ programą. Surinkti kiekybiniai duomenys yra pateikti kaip vidurkiai ir standartinės paklaidos (SE). Ryšio stiprumas tarp dviejų skirtingų požymių tikrintas naudojant Pearsono koreliacijos koeficientą

TYRIMO REZULTATAI

Į tyrimą traukti 85 pacientai pagal kriterijus, aprašytus metodų dalyje: I grupė – 56 tiriamieji, kurių amžiaus

vidurkis $6,11 \pm 0,61$ metai, II grupė – 29 tiriamieji, kurių amžiaus vidurkis $38,48 \pm 2,29$ metai. I ir II grupėse amžiaus vidurkiai tarp vyrų ir moterų reikšmingai nesiskyrė. Tiriamųjų pasiskirstymas grupėse pagal lytį ir amžių pateiktas 2 lentelėje.

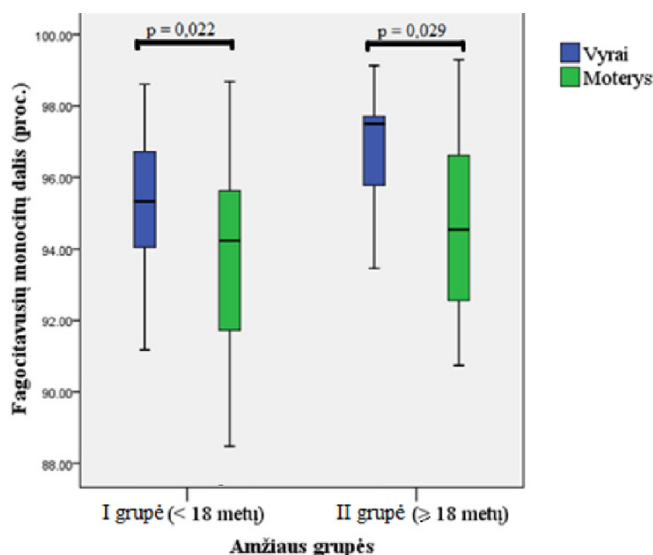
2 lentelė. Tiriamųjų pasiskirstymas grupėse pagal lytį ir amžių

Table 2. Distribution of subjects in groups according to age and gender

Amžiaus grupės	Vyrai	Moterys
I grupė, amžius, vid. ($\pm$ SE)	6,14 (0,77) (n = 36)	6,05 (1,00) (n = 20)
II grupė, amžius, vid. ($\pm$ SE)	36,89 (4,76) (n = 9)	39,20 (2,61) (n = 20)

n – atvejų skaičius, SE – standartinė paklaida

Vertinant monocitų fagocitinį aktyvumą tėkmės citometrijos metodu reikšmingi skirtumai tarp lyčių nustatyti abiejose grupėse, suskirstytose pagal amžių: vyrams monocitų fagocitinis aktyvumas buvo didesnis nei moterims (2 pav.). Vertinant granulocitų fagocitinį aktyvumą tėkmės citometrijos ir mikroskopijos metodais, reikšmingų skirtumų atsižvelgiant į lytį ir amžių nenustatyta.



2 pav. Fagocitiškai aktyvių monocitų dalies rezultatų, gautų tėkmės citometrijos metodu, palyginimas tarp vyrų ir moterų, atsižvelgiant į amžių

Fig 2. The proportion of phagocytically active monocytes between men and women according to age by flow cytometry

Fagocitozės aktyvumo tyrimo rezultatai, gauti taikant tėkmės citometrijos ir mikroskopijos metodus bei atsižvelgiant į tiriamųjų lytį, pateikiami 3 lentelėje. Nustatyta, kad tėkmės citometrijos metodu išmatuota bakterijas fagocitavusių monocitų dalis vyrų grupėje buvo didesnė nei moterų grupėje, tačiau granulocitų fagocitinio aktyvumo rodikliai šiose grupėse reikšmingai nesiskyrė. Vyrų ir moterų granulocitų fagocitinis aktyvumas, vertinamas mikroskopijos metodu, reikšmingai nesiskyrė.

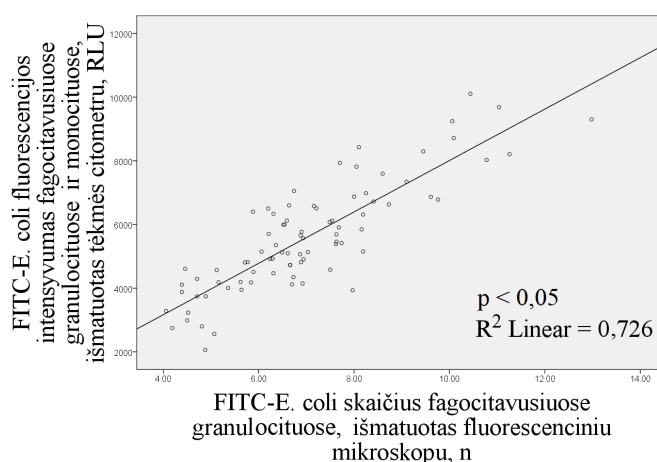
3 lentelė. Fagocitozės aktyvumo tyrimų (tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais) duomenys atsižvelgiant į tiriamųjų lytį

Table 3. Data of phagocytosis activity assays (flow cytometry and fluorescence microscopy methods) according to gender

Fagocitozės aktyvumo kiekybiniai parametrai	Vyrai N = 45	Moterys N = 40	P
Tėkmės citometrijos metodu gauti rezultatai			
<i>E. coli</i> fagocitavusių granulocitų procentinė dalis, proc., vid. ($\pm$ SE)	98,69 (0,16)	98,46 (0,25)	SN
Vidutinis granulocitų fagocituotų bakterijų skaičius, RLU, vid. ($\pm$ SE)	6069,07 (278,08)	5651,10 (261,93)	SN
<i>E. coli</i> fagocitavusių monocitų procentinė dalis, proc., vid. ($\pm$ SE)	95,53 (0,30)	94,14 (0,42)	0,008*
Vidutinis monocitų fagocituotų bakterijų skaičius, RLU, vid. ($\pm$ SE)	3276,73 (195,45)	2764,70 (221,12)	SN
Fluorescencinės mikroskopijos metodu gauti rezultatai			
Vidutinis granulocitų fagocituotų <i>E. coli</i> bakterijų skaičius, n, vid. ($\pm$ SE)	7,23 (0,27)	6,75 (0,28)	SN

* – $p < 0,05$, SN – statistiškai nereikšminga, N – imtis, SE – standartinė paklaida, RLU (angl. *relative light units*) – santykiniai šviesos vienetai

Vertinant fagocitozės aktyvumo tyrimų rezultatų, gautų tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, tarpusavio ryšį, nustatyta, kad fagocitinio aktyvumo rezultatai, gauti dviem metodais, yra reikšmingai susiję ($r > 0,7$, $p < 0,05$) (3 pav.).



3 pav. Fagocitinio aktyvumo rezultatų, gautų tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, tarpusavio ryšys; RLU – santykiniai šviesos vienetai

Fig 3. Correlation of the results of phagocytic activity, obtained by two methods; RLU – relative light units

Kiekvienam tiriamajam, kuriam įtariamas fagocitozės sutrikimas, skaičiuotas ląstelių fagocitinio aktyvumo rezultatų vidurkis santykiu tarp tėkmės citometrijos rezultato, rodančio vidutinį granulocitų fagocituotų bakterijų skaičių, ir mikroskopijos

rezultato (santykis $5872,38 \pm 193,88 / 7,05 \pm 0,20$) bei tarp tėkmės citometrijos rezultato, rodančio bendrą monocitų ir granulocitų fagocituotų bakterijų skaičių, ir mikroskopijos rezultato (santykis $5609,64 \pm 185,10 / 7,05 \pm 0,20$). Abi apskaičiuotos santykinės vertės tarpusavyje statistiškai reikšmingai nesiskyrė, bendras fagocitozės aktyvumo vertinimo koeficientas – $794,67 \pm 14,19$ RLU.

REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA

Vertinant fagocitų aktyvumą tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais asmenims, kuriems įtariamas fagocitų funkcijos sutrikimas, nustatyti monocitų aktyvumo ypatumai atsižvelgiant į tiriamųjų lytį ir amžių.

Fagocitiniam aktyvumui įvertinti pasirinkti klinikinėje praktikoje naudojami tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodai, kurių derinimas tarpusavyje suteiktų galimybę efektyviau diagnozuoti fagocitozės sutrikimus. Tuo tikslu vertinome, ar fluorescencijos intensyvumas, išmatuotas tėkmės citometru, atitinka fagocituotų bakterijų kiekį ląstelėse, atliekant tyrimo analizę fluorescenciniu mikroskopu.

Atlikus fagocitozės aktyvumo tyrimų analizę gauti reikšmingi monocitų fagocitinio aktyvumo skirtumai, atsižvelgiant į tiriamųjų lytį ir amžių. Panašūs rezultatai pateikiami ir kitų autorių atliktuose tyrimuose [8, 15], iš kurių aiškėja, kad vyresnio amžiaus tiriamųjų monocitų aktyvacija, uždegiminių citokinų IL-1, IL-6 sekrecija, TNF bei mononuklearams specifinių fermentų sekrecija yra padidėjusi. Kitų autorių atliktame tyrime [7] nustatyta, kad neutrofilų aktyvumas vyresnio amžiaus žmonėms buvo sumažėjęs dėl chemotaksio, superoksido anijonų gamybos ir fermentinio aktyvumo disfunkcijos, susijusios su imuniniu senėjimu, o mūsų atliktame tyrime pastebėta su amžiumi susijusi neutrofilų funkcijos pokyčio tendencija. Be fagocitinės funkcijos savitumų, susijusių su amžiumi, yra žinoma ir apie lytinių hormonų įtaką įgimto ir įgyto imuniteto pokyčiams. Neseniai atliktas tyrimas [9] parodė, kad antigeno atpažinimo receptorių, uždegimą skatinančių citokinų gamybos, monocitų funkcijų, įskaitant antigeno pateikimą ir fagocitozę, didesnis aktyvumas yra būdingesnis moterų grupėje nei vyrų, o mūsų atliktame tyrime rezultatai buvo priešingi – didesnis monocitų fagocitinis aktyvumas būdingas vyrams. Šiems radiniams patikslinti reikėtų atlikti platesnius tyrimus su tikslinėmis tiriamųjų grupėmis. Šiuo metu klinikinėje praktikoje monocitų ir granulocitų kiekybinis fagocitozės aktyvumo vertinimas nėra numatytas atsižvelgiant į šiuos lyties ir amžiaus kriterijus.

Literatūros duomenimis, vertinant monocitų ir granulocitų fagocitozės aktyvumą, klinikinėje praktikoje dažniausiai taikomi mikroskopiniai tyrimo metodai, o fagocitozės aktyvumas išreiškiamas fagocituotų dalelių (bakterijų, rutuliukų (angl. *beads*), grybų ląstelių ir kt.) skaičiumi [16, 17]. Mūsų tyrime fagocitinio aktyvumo rezultatai, gauti tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodais, buvo tiesiogiai ir reikšmingai susiję, tai leidžia teigti, kad pusiau kiekybiniam fagocitozės aktyvumo tyrimui fluorescencinės mikroskopijos metodu galėtų būti pritaikytos tėkmės citometrijos arba alternatyvios priemonės.

Mikroskopijos metodu monocitų parametrų vertės nebuvo įvertintos, nes skaičiuota 100-tas bakterijas fagocitavusių ląstelių, o tėkmės citometrijos metodas leidžia atskirai įvertinti didelius kiekius monocitų ir granulocitų, ką atlikti mikroskopuojant užimtų daug laiko. Fluorescencinės mikroskopijos metodą numatyta naudoti kaip atrankinį, todėl siekta kuo mažesnių laiko sąnaudų, dėl to ląstelės negrupuotos į granulocitus ir monocitus. Tokį pasirinkimą lėmė apskaičiuotas fagocitinio aktyvumo rezultatų santykis tarp tėkmės citometrijos rezultato, rodančio bendrą granulocitų ir monocitų fagocituotų bakterijų skaičių, ir mikroskopijos rezultato – abu santykiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė, todėl mikroskopuojant nuspręsta įvertinti tik polimorfonuklearus.

Mūsų tyrime atlikta fagocitų funkcinio aktyvumo rezultatų analizė tėkmės citometrijos ir mikroskopijos metodais leido numatyti optimalų granulocitų fagocitinės funkcijos vertinimo būdą fluorescencinės mikroskopijos metodu bei atskleidė poreikį perskaičiuoti referentines vertes tėkmės citometrijos metodui, atsižvelgiant į jau minėtus ypatumus. Remiantis mūsų gautais rezultatais tiriant asmenis, kuriems įtariamas fagocitinės funkcijos sutrikimas, bei atliekant platesnius sveikų asmenų grupės tyrimus būtų galima identifikuoti fagocitinio aktyvumo įvertinimo referentines ribas, atsižvelgiant į lytį ir amžių. Tai suteiktų galimybę diegti fluorescencinės mikroskopijos metodą į klinikinę praktiką, siekiant jį panaudoti kaip atrankinį ar alternatyvų nustatant fagocitinės funkcijos sutrikimus laboratorijose, kurios negali atlikti tyrimų tėkmės citometrijos metodu.

IŠVADOS

Tėkmės citometrijos ir fluorescencinės mikroskopijos metodai yra informatyvūs tiriant fagocitinį aktyvumą. Fagocitinį aktyvumą vertinant tėkmės citometrijos metodu identifikuoti monocitų funkcinio aktyvumo ypatumai, susiję su tiriamųjų lytimi ir amžiumi: vyrų monocitų fagocitinis aktyvumas buvo didesnis nei moterų.

Gauta: 2024 01 25

Priimta spaudai: 2024 05 17

Summary

ASSESSMENT OF PHAGOCYTIC ACTIVITY OF MONOCYTES AND GRANULOCYTES BY FLOW CYTOMETRY AND FLUORESCENCE MICROSCOPY METHODS: A PILOT STUDY

Rebeka Žebrauskaitė, Viltė Marija
Gintauskienė, Dovydas Bagdonas,
Brigita Gradauskienė

Background. Immunity ensures the body's homeostasis, i.e. protects from everything that is genetically foreign to it – antigens. Phagocytes (monocytes and

granulocytes) play a central role in innate immunity and have also confirmed immune functions. In the case of primary or secondary disorders of phagocytic functions, the failure of the immune response is manifested, therefore, effective assessment of phagocytic function, which can be performed by laboratory tests, is important in clinical practice.

Methods. The results of activity of phagocytosis of monocytes and granulocytes of 85 patients (45 men and 40 women, aged 8 months – 61 years), obtained by quantitative flow cytometry (PHAGOTEST™, Celonic Group, Germany) and semi-quantitative fluorescence microscopy (number of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled *E. coli* per 100 phagocytosed granulocytes) were analyzed. The principle of calculating the phagocytosis activity factor: one phagocytosed bacterium found by the microscopy method corresponds to the X fluorescence intensity (RLU) determined by the flow cytometry method.

Results. The mean phagocytic activity of 85 subjects' monocytes and granulocytes obtained by flow cytometry is 5609.64 ± 185.10 RLU (relative light units) and 7.05 ± 0.20 phagocytosed bacteria by fluorescence microscopy. Men, according to age, had a higher proportion of phagocytically active monocytes than women ($p = 0.008$). The results of phagocytic activity, obtained by two methods (flow cytometry and fluorescence microscopy) significantly correlated ($r > 0.7$, $p < 0.05$). One phagocytosed bacterium found by microscopy corresponds to 797.92 ± 14.31 RLU measured by a flow cytometer.

Conclusion. Flow cytometry and fluorescence microscopy methods are informative for assessment of phagocytic activity. When assessing phagocytic activity by flow cytometry, the differences of the functional activity of monocytes related to the sex and age of the subjects were identified.

Keywords: immunodeficiency, phagocytosis, flow cytometry, fluorescence microscopy.

LITERATŪRA

1. Grubbs H, Kahwaji CI. Physiology, active immunity. StatPearls Publishing. Treasure Island, Florida. 2023
2. Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. Diversity and versatility of phagocytosis: roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017 May 23; 7: 191.
3. Andrews T, Sullivan KE. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiol Rev* 2003 Oct; 16(4): 597–621.
4. Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004 Apr; 113(4): 620–6.
5. Sharma L, Wu W, Dholakiya SL, Gorasiya S, Wu J, Sitapara R, et al. Assessment of phagocytic activity of cultured macrophages using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2014; 12: 137–45.
6. Boero E, Brinkman I, Juliet T, van Yperen E, van Strijp JA, Rooijackers SH, et al. Use of flow cytometry to evaluate phagocytosis of staphylococcus aureus by human neutrophils. *Front Immunol* 2021 Feb 19; 12: 635825.
7. Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Hörl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 2000 Jan; 67(1): 40–5.
8. De Maeyer RP, Chambers ES. The impact of ageing on monocytes and macrophages. *Immunol Lett* 2021 Feb 1; 230: 1–10.
9. Gubbels Bupp MR, Potluri T, Fink AL, Klein SL. The confluence of sex hormones and aging on immunity. *Front Immunol* 2018 Jun 4; 9: 1269.
10. Holcar M, Goropevšek A, Ihan A, Avčin T. Age-related differences in percentages of regulatory and effector T lymphocytes and their subsets in healthy individuals and characteristic STAT1/STAT5 signalling response in helper T lymphocytes. *J Immunol Res* 2015 Oct 7; 2015.
11. Valiathan R, Ashman M, Asthana D. Effects of ageing on the immune system: infants to elderly. *Scand J Immunol* 2016 Apr; 83(4): 255–66.
12. Li K, Peng YG, Yan RH, Song WQ, Peng XX, Ni X. Age-dependent changes of total and differential white blood cell counts in children. *Chin Med J* 2020 Aug 20; 133(16): 1900.
13. Reagent kit for the quantitative analysis of leukocyte phagocytosis in human whole blood [Internetas]. Celonic.com [cituota 2021 m. gruodžio 14 d.]. Nuoroda: https://www.celonic.com/app/uploads/2018/11/Phagotest_v3.pdf
14. Instructions PHAGOTEST™. Reagent kit for the quantitative determination of the phagocytic activity of monocytes and granulocytes in heparinized human whole blood. [Internetas]. Glycotope.com [cituota 2024 m. sausio 25 d.]. Nuoroda: <https://www.cedarlanelabs.com/contents/files?filePath=pdf/Glycotope%20PHAGOTEST%20Product%20Sheet.pdf>
15. Ginaldi L, De Martinis M. In: Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, Pawelec G, editors. Handbook of immunosenescence. Springer, 2018, p. 1–28.
16. Ishikawa M, Mashiba R, Kawakatsu K, Tran NK, Nishikata T. A high-throughput quantitative assay system for macrophage phagocytic activity. *Macrophage* 2018; 5.
17. Steinberg BE, Grinstein S. Analysis of macrophage phagocytosis: quantitative assays of phagosome formation and maturation using high-throughput fluorescence microscopy. In: Reiner NE, editor. Macrophages and dendritic cells. New Jersey: Humana Press; 2009, p. 45–56.