

Úloha č. 7

Funkční vyšetření komplementového systému: TEST CH50 pro spuštění kaskády klasickou cestou

Teorie:

Komplement řadíme mezi humorální složky nespecifické imunity odstraňující patogeny z organismu. Je tvořen souborem asi 30 sérových a membránových termolabilních proteinů, které za normálních okolností kolují v těle ve formě inaktivních proenzymů. Pokud dojde ke spuštění kaskád dojde k postupné amplifikaci imunitní odpovědi/komplementové kaskády a tvorbě lytického komplexu (MAC-komplex). Nejdůležitějšími složkami komplementu jsou sérové složky C1 – C9, které jsou syntetizovány převážně hepatocyty v játrech. Komplementový systém je aktivován třemi způsoby: alternativní, klasickou či lektinovou cestou. Hlavními funkcemi komplementových složek jsou: lýza buněk, opsonizace a chemotaxe.

Test CH50 je funkčním testem komplementového systému spuštěného klasickou cestou aktivace (tzn. cestou, na jejímž počátku je vazba protilátky na antigen povrchu např. cizorodé bakterie → vazba proteinu C1 → štěpení C2 a C4 → vytvoření C3-konvertázy (C4bC2a) → vytvoření C5-konvertázy (C4bC2aC3b) C4bC2a → tvorba lytického komplexu). Cílem tohoto testu je stanovit množství séra obsahujícího složky komplementu, které způsobí 50%tní hemolýzu definovaného množství beraních červených krvinek senzibilizovaných králičími protilátkami. Stupeň hemolýzy je stanovován spektrofotometricky na základě množství uvolněného hemoglobinu z lyzovaných krvinek.

Principiální postup:

- navázání králičích protilátek (amboceptor) na povrch beraních krvinek
- přidání vyšetřovaného séra v různých koncentracích (1:40-1:320) se složkami komplementu
- lýza krvinek → uvolnění hemoglobinu → měření absorbance

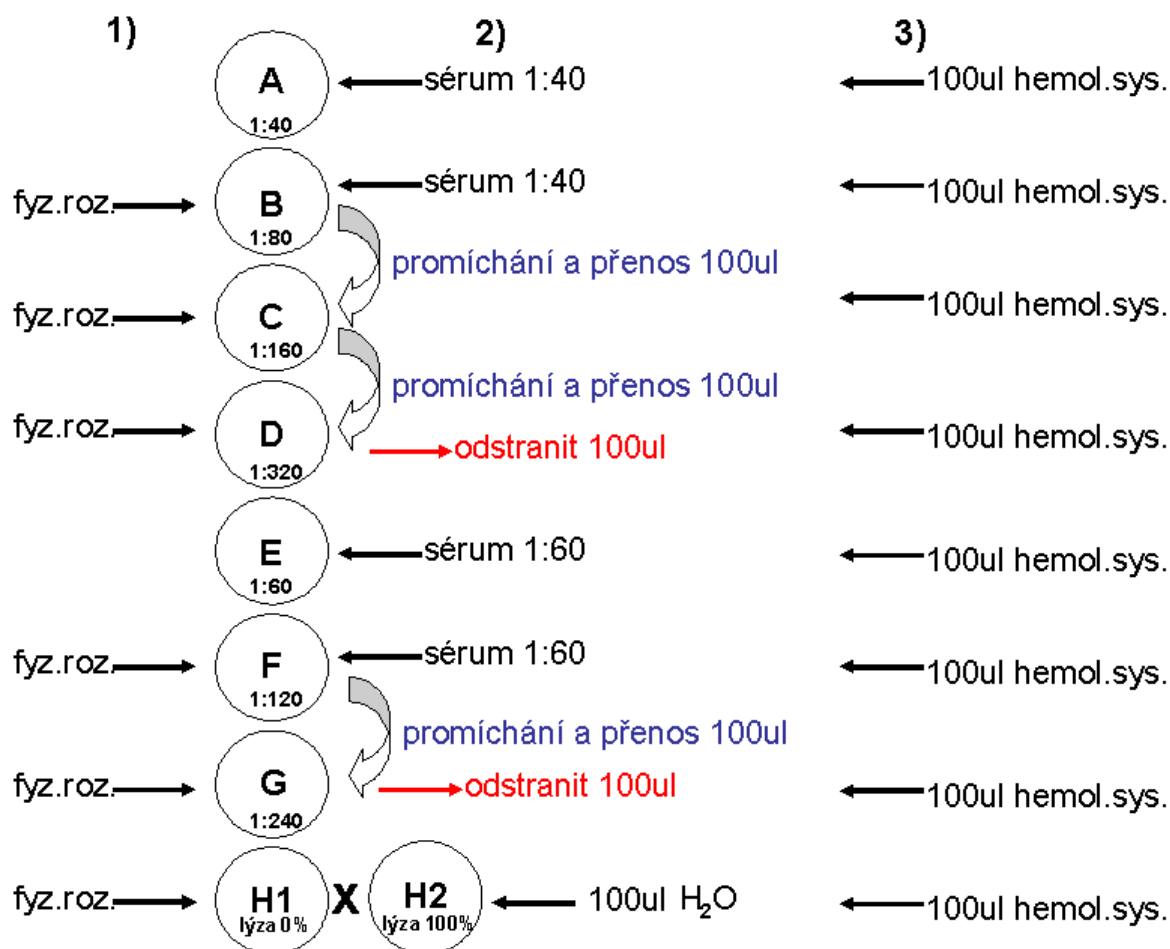
Provedení:

1. **Příprava beraních erytrocytů:** beraní erytrocyty třikrát propereme ve fyziologickém roztoku (10min/2000ot.). Naředíme 0,75 ml promytých erytrocytů 9,5ml fyziologického roztoku (fyz.roz.).
2. 0,25 ml z naředěných krvinek nechat **zlyzovat** s 3,5 ml Na₂CO₃, odebrat 1ml do kyvety a změřit absorbanci na spektrofotometru. Naším cílem je vytvoření 5% směsi krvinek. Její absorbance je A₅₄₁=0,700. Dle výsledku spektrofotometrického měření předběžně naředěné směsi tuto doředíme dle potřeby. Takto připravené krvinky je možno skladovat až do jejich použití v lednici.
3. Příprava **amboceptoru** (králičích protilátek): amboceptor ředíme 1:1000 s fyziologickým roztokem (tzn. 10ul protilátek + 10 ml fyz.roz.). Takto připravený naředěný amboceptor je možno skladovat až do jeho použití v lednici.
4. Vytvoření **hemolytického systému:** 10ml naředěných erytrocytů + 10 ml amboceptoru (VŽDY PŘIDÁVAT AMBOCEPTOR DO ERYTROCÝTŮ) – inkubace 15-30min.
5. **Příprava sér:** Sérum, které bylo do hodiny od odběru zamrazeno (složky komplementu jsou termolabilní!) je nutno rozmrazit na pokojovou teplotu a před pipetováním důkladně promíchat.

Mícháme dvojí východí ředění: 1:40 → 15ul séra + 585ul fyz.roz.

1:60 → 10ul séra + 590ul fyz.roz.

6. **Příprava mikrotitrační destičky:** Každý pacient se zpracovává v dubletu – dvě řady. Do jamek v řadách B,C,D a F,G si předpipetujeme 100ul fyz.roz.(krok 1)). Dále napipetujeme séra ve dvojím ředění dle schématu (krok 2))– sérum **1:40** 100ul do jamek mikrotitrační destičky v řadě A a B, **1:60** 100ul do jamek v řadě E a F. V jamce B směs pipetou promícháme a přenesena 100ul do jamky C, zde opět promícháme pipetou a přeneseme do jamky D, zde směs promícháme a odstraníme 100ul do odpadu. Stejně tak v jamce F směs promícháme a přeneseme do jamky G, kde směs promícháme pipetou a 100ul odstraníme do odpadu. Do první jamky v řadě H napipetujeme 100ul fyziologického roztoku (0% lýza) do druhé jamky v dubletu v řadě H napipetujeme 100ul H₂O (100% lýza). Do všech jamek napipetujeme 100ul hemolytického systému (krok 3)).



7. **Inkubace** 60 min v termostatu při 37°C.
8. **Centrifugace** destičky 5 min při 2000 otáček/min.
9. Po centrifugaci **přepipetovat** 100ul z každé jamky do nepoužitých jamek mikrotitrační destičky při zachování pořadí a umístění jamek.
10. Změřit na **readeru** pro mikrotitrační destičky při 541 nm.
11. Výsledky jamek v dubletu vždy **zprůměrovat** kromě jamek v řadě H. Seřadit dle stoupající koncentrace séra v jamce – tzn.dle stoupající hemolýzy (čím větší ředění, tím méně séra).