

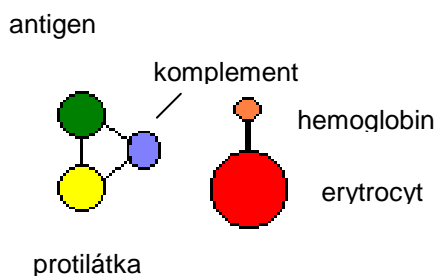
1 Metody sledování komplementového systému

Komplement plní v imunitním systému řadu klíčových funkcí. Komplementová kaskáda obsahuje základních složek, které se v průběhu aktivace postupně aktivují. Aktivace spočívá většinou v odštěpení krátkého úseku bílkovinného řetězce, přičemž tyto fragmenty plní v průběhu aktivační kaskády další funkce. Celkově lze efekty komplementu charakterizovat jako membranolytické, opsonizační a chemotaktické. Aktivace může probíhat třemi vcelku dobře popsanými cestami: klasickou, alternativní a lektinovou. Při sledování složek komplementu se zpravidla zaměřujeme na určitou část kaskády.

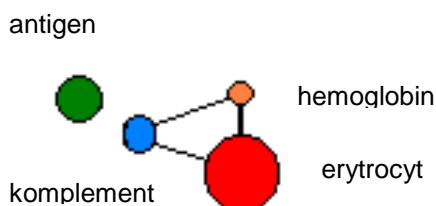
Stanovení jednotlivých složek je problematické, neboť kaskáda se aktivuje rychle a jednotlivé složky mají krátký poločas rozpadu. Navíc jejich koncentrace v séru jsou příliš nízké. Technicky realizovatelné diagnosticky přínosné je pouze stanovení složek C3 a C4, které se provádí nefelometricky za použití specifických protilátek proti těmto složkám. Je možné tyto složky stanovit i radiální difúzí nebo ELISA testem. Jde o sérové proteiny, podobně jako protilátky, proto způsoby stanovení jsou podobné. Stanovování ostatních složek aktivační kaskády se stanovuje pouze ve výjimečných případech spíše v rámci výzkumu.

Další hodně používanou možností je vyšetření funkční aktivity měřením membranolytického účinku. Existuje několik možností které se liší způsobem, kterým vizualizují konečný membranolytický účinek. Nestarší metodou pro toto stanovení je měření hemolytické aktivity, kdy se sleduje intenzita hemolýzy erytrocytů po působení komplementu. Hemolýzu lze sledovat buď v gelu pomocí radiální difúze nebo v gelu ve zkumavce, nebo lze použít spektrofotometrické stanovení. Běžně dostupné jsou tzv. spektrofotometrické CH 50 nebo CH 100 testy.

Lýza erytrocytů způsobená komplementem se využívá i v tzv. **komplement fixační reakci (KFR)**: je to poměrně stará metoda, která využívá schopnosti vázat se na komplex antigenu s protilátkou a následně tím aktivovat komplementový systém. Reakce probíhá ve dvou krocích. Pokud se ve vyšetřovaném séru vyskytuje protilátka, vytvoří komplex s antigenem a na něj se naváže komplement. Ten již nezbyde do druhé části reakce a nereaguje s králičí protilátkou proti beranním erytrocytům tvořící hemolytický systém. Rozeznáváme pozitivní reakci, k hemolýze nedojde.



Pokud ve vyšetřovacím séru není protilátka (negativní reakce), nevytvoří se v první fázi reakce imunokomplex, komplement se nevyváže a postoupí do druhé části reakce, kdy aktivuje králičí protilátku hemolyzin navázanou na beranní erytrocyty a dojde k hemolýze.



Čím menší je lýza erytrocytů, tím méně komplemenu ve směsi zbylo, tzn. tím více se ho spotřebovalo v prvním kroku při reakci sledované protilátky s antigenem, což znamená že tím více si odpovídal antigen se stanovovanou protilátkou nebo tím více bylo sledované protilátky v původním vzorku.

KFR je levná a nenáročná na vybavení. Přestože je to je to metoda pracná, v poslední době je využívána ve větším měřítku v praxi na stanovení přítomnosti protilátek u infekčních chorob, ve virologii se používá na průkaz protilátek téměř všech virových nákaz, k typizaci neznámých Ag nově izolovaných virů a k průkazu protiorganových Ab.

Z diagnostického hlediska má dále význam stanovení některých regulačních složek komplementové kaskády. Zejména jde o TZV. C1 inhibitor, který za fyziologických okolností hned v počátku reguluje rozběhnutí celé kaskády. Existuje vzorový deficit této složky, který se projevuje onemocněním zvaným hereditární angioedém. Onemocnění se projevuje nekontrolovatelnou, náhlou aktivací po relativně slabém podnětu (drobné poranění, menstruace, stomatologické výkony apod.), které může vést až k život ohrožujícím otokům sliznic a dalších komplikacím. Stanovení C1 inhibitoru se provádí nefelometricky jakožto sérového proteinu.

Stanovování komplementu se provádí v různých diagnostických situacích, jejich rozsah vyplývá z poměrně širokého rámce působení komplementu.

Jako nejčastější příklady lze uvést:

- podezření na deficity jednotlivých složek, kdy je snaha tyto složky přímo stanovit, jak už bylo uvedeno, v praxi je to možné u C3 a C4 složky
- imunokomplexové choroby, kdy se rovněž stanovuje C3 a C4 složka, ale potíže činí fakt, že koncentrace uvedených složek se u těchto chorom poměrně rychle mění. Normální hodnoty C3 a C4 složky se pohybují okolo 0,2 – 1,2 resp. 0,15 – 0,4 g/l.

Celková hemolytická aktivita se vyšetřuje při opakovaných vleklých infekcích určitými patogeny, např. Neisserii a dále při podezřeních na imunodeficity.

ÚLOHA 12: Chemiluminiscenční stanovení bakteriolytické aktivity komplementu

Jedná se o relativně novou metodu, která není běžně používána v klinických laboratořích. Její uplatnění spočívá hlavně ve výzkumu, např. ke stanovení aktivity komplementu u ryb. Ryby vykazují určité odlišnosti v aktivaci komplementové kaskády ve srovnání se savci: např. není zde popsána lektinová cesta aktivace a celková schopnost aktivace funguje v širším rozmezí teplot s posunem do nižších teplot.

Princip

Bioluminiscenční stanovení (vyvinuto na *Department of biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Finsko*) je založeno na měření světelné emise (bioluminiscence), která je výsledkem reakce:



Luciferáza i D-luciferin je produkován použitým nepatogenním G⁻ bakteriálním kmenem. Reakce je závislá na přítomnosti luciferázy a vyžaduje přítomnost ATP. ATP je produkován pouze živými buňkami, což umožňuje využít této reakce pro stanovení viability bakterií.

Otázka viability bakterií ve vzorku souvisí s činností komplementu v přidaném séru. Čím větší aktivita komplementu, tím víc bakterií zlyhuje a tudíž je nižší bioluminiscence.

Výhody a nevýhody

Jedná se o velmi citlivou, rychlou (máme-li připravené bakterie, stačí napipetovat na destičku a dát změřit). Je potřeba drahý luminometr. Bakterie někdy vykazují jen velmi slabou bioluminiscenci.

Chemikálie a roztoky:

1. Suspenze bakterií (*Escherichia coli* s plasmidem K12pGFPluxBAmp) (1 ml/st.)
3. HIS (1 ml/st.)
Komerčně dodávané (Sigma Aldrich, CZ) tepelně inaktivované fetální bovinní sérum. Sérum slouží k udržení koncentrace proteinů (70 % obsahu proteinů je albumin) při ředění vzorků. HIS neobsahuje protilátky.
4. EGTA [100 mM] (*EthyleneGlykol-bis-(beta-aminoethyl ether) N,N'-Tetraacetic Acid*) (0,5 ml/st.)
V případě měření alternativní dráhy aktivace se k vyšetřovanému vzorku séra i k HIS přidává EGTA, která slouží k vyvážení vápenatých iontů, čímž se blokuje klasická cesta aktivace.

Vzorek: Kapří sérum

Přístroje a pomůcky

Luminometr, šablona s jednorázovými stripy (plastové mikrojamky) nebo mikrotitrační destička.

Postup

1. Každý si připraví 2 zkumavky s HIS:
pro klasickou cestu: 80 μl HIS + 120 μl PBS (poměr 2 : 3)
pro alternativní cestu: 80 μl HIS + 40 μl PBS + 80 μl zásobního EGTA (poměr 2 : 1 : 2)
2. Každý si připraví 2 zkumavky pro vyšetřované sérum:
pro klasickou cestu: 80 μl séra + 120 μl PBS (poměr 2 : 3)
pro alternativní cestu: 80 μl séra + 40 μl PBS + 80 μl zásobního EGTA (poměr 2 : 1 : 2)
3. Pipetovat na desku v pořadí dle následujícího schématu (zleva doprava – viz poslední řádek):

		[μl]				Suspenze bakterií
		Paralelky	Vzorek	HIS	HIS s EGTA	
Klasická dráha	Blank K	1	-	50	-	50
	K 1	1	10	40	-	50
	K 2	1	20	30	-	50
	K 3	1	40	10	-	50
Alternativní dráha	Blank A	1	-	-	50	50
	A 1	1	10	-	40	50
	A 2	1	20	-	30	50
	A 3	1	40	-	10	50
		pořadí pipetování na destičku:	1.	2.	3.	4.

Tab 4. Pořadí pipetování na mikrotitrační destičku. Každý vzorek bude měřený jen jednou. Čísla uvádějí pipetované objemy v mikrolitrech přímo na destičku. Jelikož se reakce startuje ihned po přidání suspenze bakterií je nezbytné je přidat v co nejkratším časovém rozmezí. Každý si na destičku napipetuje vzorek, HIS případně HIS + EGTA a suspenzi bakterií pak pipetuje nejzdatnější student na celou destičku.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Klasická	Blank K	A												
	K 1	B												
	K 2	C												
	K 3	D												
Alternativní	Blank A	E												
	A 1	F												
	A 2	G												
	A 3	H												
			st. 1	st. 2	st. 3	st. 4	st. 5	st. 6	st. 7	st. 8	st. 9	st. 10	st. 11	st. 12

Tab. 5. Rozvržení vzorků na společné destičce pro celou skupinu. Každý student bude mít 1 sloupec, což popisuje poslední řádek (zkratka st. = student).

4. Ihned po přidání bakteriální suspenze měříme na luminometru v režimu:
 - interval mezi jednotlivými měřeními: 90 s
 - celková doba měření: 2 hodiny
 - teplota: 37 °C
 - bez třepání

Hodnocení

Naměřené hodnoty bioluminiscence přepočteme na % viability bakterií a to tak, že aktivitu blanku (vzorku obsahujícího 0 μl séra) považujeme za 100%.

Nakreslíme graf závislosti viability (%) na koncentraci séra pro klasickou i alternativní cestu.

Z křivky stanovíme tzv. CB 50 – koncentraci séra, potřebnou k usmrcení 50% bakterií. Tuto hodnotu považujeme za tzv. 1 unit of komplement.

Spočítáme aktivitu komplementu pro klasickou i alternativní cestu v jednom ml séra.

Výstup

Jako výstup uveďte do tabulky následující údaje pro každý vzorek:

1. Maximum chemiluminiscence (tzv. **peak**), kterého bylo v průběhu měření dosaženo
2. **Času kdy bylo maxima dosaženo**
3. **Integrál**, jako plocha pod kinetickou křivkou – dodá vyučující

Z vypočítaných hodnot uveďte graf závislosti viability (%) na koncentraci séra (v ředěních) zvlášť pro klasickou a zvlášť pro alternativní dráhu. Ředění séra v jamce vypočítáte díky známému objemu v jamce a předchozích ředění sér.