

1 Metody sledování imunity bezobratlých

U bezobratlých se nevyskytuje, i přes některé výjimky, typická adaptivní imunita, pro níž je charakteristická klonální selekce lymfocytů, tvorba specifických protilátek a imunologická paměť. Obrana bezobratlých živočichů je založena na reakcích vrozené (inátní) imunity, které jsou rychlé, nespecifické, navzájem se ovlivňují a spolupracují. Buněčné mechanismy imunity zajišťují hemocyty. Např. u hmyzu rozlišujeme několik typů, u jednotlivých hmyzích řádů se liší jejich zastoupení. Hrají roli při srážení hemolymfy - koagulaci (koagulocyt, oenocyt, sférulocyt), hojivých procesech (oenocyt), eliminaci cizorodých částic (granulocyt, plazmatocyt). Počet a aktivitu hemocytů ovlivňují hormony, poranění a infekce. K nejdůležitějším obranným mechanismům buněčné imunity bezobratlých patří fagocytóza, nodulace a enkapsulace. Tyto procesy jsou založené na izolaci a eliminaci cizorodých částic, patogenů popř. parazitů. Při fagocytóze jsou jednotlivé částice zachycovány hemocytem, pohlceny a natráveny. Nodulace je složitější proces, při němž agregací hemocytů vznikají útvary (nodule). Kolem cizorodého materiálu se shlukují různé hemocyty, na něž se váží granulocyty, které pak lyzují. Vytváří se melanin obalující cizí částice. Dochází k aktivaci plazmatocytů a ty se shlukují kolem zlyzovaných granulocytů. Z 20-30 vrstev plazmatocytů se pak vytváří samotná nodule fungující jako filtr. Při proniknutí materiálu větších rozměrů (parazitických prvoci, mnohobuněční, nebiogenní látky - sklo, latex atd.) dochází k enkapsulaci. Princip je podobný jako u nodulace s tím, že plazmatocyty se nemusí procesu zúčastnit a celý útvar (kapsule) je ve výsledku obalen melaninem. Tvorba melaninu je výsledkem tzv. fenoloxidázové kaskády tzn. jde o látkovou složku imunity. Podstatou reakce je přeměna zbytků aminokyseliny tyrozinu na polymer melanin za vzniku hnědého barviva. Reakce probíhá přes několik mediátorů a celá je katalyzována pouze jedním enzymem - fenoloxidázou. U bezobratlých existuje celá řada chemických látek, které mají baktericidní a opsonizační efekt popř. se účastní tvorby melaninu. Největší význam má enzym lysozym působící jako lytický, baktericidní faktor pro G⁺ bakterie a bakteriostatický faktor pro G⁻ bakterie.

Úloha 12: Sledování mikrobicidních faktorů hemolymfy

Princip

Pod vlivem mikrobicidních faktorů hemolymfy (zejména lysozymu) dochází k lýze bakteriálních stěn a vyčeření roztoku. Výsledná reakce se určuje kvantitativně turbidimetricky jako změna optických vlastností reakčního roztoku. Jde tedy o snížení zákalu vlivem mikrobicidních faktorů hemolymfy.

Výhody a nevýhody: jednoduchost a časová nenáročnost, při ředění vzorků je ovšem důležitá přesnost v pipetování.

Chemikálie a roztoky

1. Bakteriální kultura - *Micrococcus luteus* (CCM 169)
2. Fyziologický roztok
3. Hemolymfa - *Bombyx mori*

Přístroje a pomůcky

Mikrotitrační destičky (8x12 jamek), spektrofotometr, filtr na 340 nm, termostat

Postup (vlastní práce)

1. Roztok bakterií *Micrococcus luteus* o určité koncentraci (počet buněk/ml), naředíme do zkumavek:
 - a) do zkumavek 1.-4. napipetujeme 220 μ l fyziologického roztoku
 - b) do zkumavky, označené K, napipetujeme 440 μ l koncentrovaného roztoku bakterií.
 - a) z první zkumavky (označené K) přenášíme 220 μ l vzorku do druhé, důkladně promícháme a přeneseme 220 μ l do další zkumavky atd., naposled do zkumavky č. 4.
 - b) do další řady pěti zkumavek přeneseme 100 μ l z každého ředění a přidáme 15 μ l hemolymfy, promícháme a kultivujeme v termostatu 20 min při 37°C.

Kontrola	K	1.	2.	3.	4.
Koncentrace	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Pipetuje se	440 µl bakt.	220 µl fyz.r.	220 µl fyz.r.	220 µl fyz.r.	220 µl fyz.r.
Přenáší se					
Celkem:	220 µl	220 µl	220 µl	220 µl	440 µl

Vzorek	K'	1.'	2.'	3.'	4.'
Přenáší	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Hemolymfa	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
Celkem	115 µl	115 µl	115 µl	115 µl	115 µl

U hodnot koncentrace je původní počet buněk/ml vyjádřen jako 1.

- Po 20 minutách kultivace pipetujeme z každé zkumavky (K, č. 1. – 4., K', 1.'- 4.') 100 µl na mikrotitrační destičku a měříme při 340 nm zákalovou reakci proti blanku
 - blank 1: fyziologický roztok
 - blank 2: 100 µl fyziologického roztoku a 15 µl hemolymfy.
 - kontrola K: neředěný roztok bakterií
 - kontrola K': 100 µl neředěného roztoku bakterií a 15 µl hemolymfy

Příklad výsledků

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vzorek	K	1.	2.	3.	4.	K'	1.'	2.'	3.'	4.'	Blank 1	Blank 2
Absorbance	0,254	0,209	0,145	0,100	0,074	0,246	0,174	0,149	0,129	0,104	0,051	0,083
$A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blanku}}$	0,203	0,158	0,094	0,049	0,023	0,163	0,091	0,066	0,046	0,021	-	-

Od hodnot K, č. 1. – 4. se odečítá hodnota blanku 1, od hodnot K', č. 1.'- 4.' se odečítá hodnota blanku 2.

Hodnocení

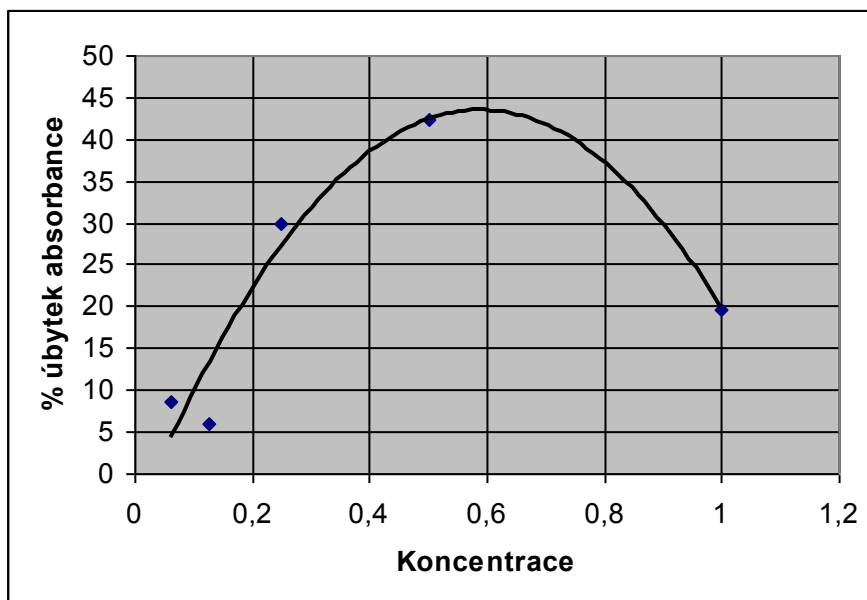
- Vypočítáme procentuální úbytek hodnoty absorbance vzhledem k příslušným kontrolám (rozdíl mezi hodnotou absorbance samotného roztoku bakterií a absorbance roztoku bakterií s přidanou hemolymfou).

$$\frac{100 \times (K - \zeta')}{K}, \frac{100 \times (1 - 1')}{K}, \dots$$

- Vypočítané hodnoty úbytku vyneseme do grafu vůči původní koncentrace bakterií.

Příklad výsledků a grafu

Koncentrace	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Úbytek v %	19,7	42,4	29,8	6,1	8,7



Výstup

Jako výstup uveďte:

1) Tabulku s hodnotami:

1. Absorbance vzorku (blanku)
2. Rozdílu absorbance vzorku a absorbance příslušného blanku

2) Tabulku s vypočítaným úbytkem hodnot absorbance u vzorku bez hemolymfy a s hemolymfou.

3) Bodový graf s proloženou regresní křivkou (polynomická závislost)

4) Konstatování, při zhruba jaké hodnotě koncentrace bakterií (vyjádřeno počtem buněk/ml) došlo k jejich nejvyššímu úbytku.