

PRIRUČNIK ZA VJEŽBE IZ IMUNOLOGIJE I IMUNOGENETIKE

Interna skripta

PRAKTIKUM IZ IMUNOLOGIJE I IMUNOGENETIKE 2023./24.

VODITELJ PRAKTIKUMA: Dr.sc. Dyana Odeh

CILJ:

Cilj praktikuma je svladavanje osnovnih laboratorijskih tehnika koje se koriste u imunologiji i lakše svladavanje gradiva iz imunologije jer su činjenice i metode koje će studenti naučiti u praktikumu dio ispitnog gradiva.

Od studenata očekujemo da po završetku praktikuma znaju prepoznati glavne sastavnice imunosnog sustava i usvoje temeljna znanja o istima, da znaju rukovati uzorcima, da mogu samostalno izvesti neke metode, interpretirati rezultate i procijeniti njihovu valjanost, te da mogu kritički ocijeniti kvalitetu svoga rada.

NAČIN RADA:

Tijekom praktikuma studenti će raditi s laboratorijskim životinjama (miševi, štakori), a neka mjerenja obavljat će na dobivenim uzorcima, dok će dio gradiva obrađivati pomoću računalnih simulacija. Od studenata se očekuje međusobna suradnja jer će najčešće raditi u skupinama.

ORGANIZACIJSKE UPUTE:

Na praktikumu studenti obavezno trebaju nositi bijelu kutu i kalkulator.

Studenti na nastavu moraju dolaziti u svom turnusu.

Dozvoljen je jedan izostanak u semestru. Zbog ograničenog prostora, nadoknada propuštene vježbe moguća je samo uz prethodni dogovor s voditeljem vježbi. Kasnija nadoknada izostale vježbe nije predviđena i u slučaju da je student izostao više od jedanput, kolegij se ponovo upisuje.

UVJET ZA POTPIS:

1. Uredno pohađanje praktikuma

UVJET ZA IZLAZAK NA ISPIT:

1. Uredno pohađanje praktikuma
2. Položen kolokvij (80%)

Raspored vježbi:

1. Upoznavanje s glavnim sastavnicama imunskog sustava. Određivanje staničnosti.
2. Test citotoksičnosti
3. Imunizacija štakora + jednosmjerna radijalna imunodifuzija u gelu
4. ELISA – simulacija

VJEŽBA 1. STANICE I ORGANI IMUNOSNOG SUSTAVA

Sve životinjske vrste, bez obzira na građu organizma i na filogenezu, sposobne su zaštititi se od štetnih tvari svojim nespecifičnim ili specifičnim mehanizmima obrane. Nespecifični (urođeni, prirodni) mehanizmi obrane predstavljaju prvu liniju obranu organizma od stranih tvari, dok specifični (stečeni) mehanizmi predstavljaju treću liniju obranu organizma.

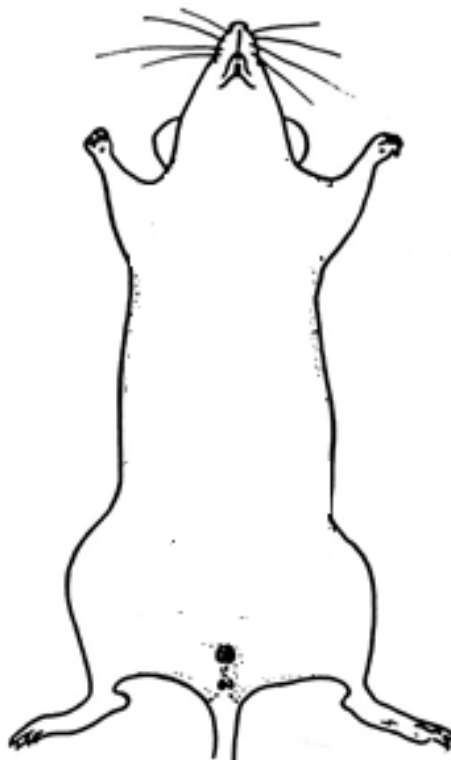
1. Navedite imunosne organe i stanice!

ORGANI

STANICE

2. Ukratko opišite ulogu imunosnih organa i stanica!

3. Skicirajte smještaj limfatičkih organa u miša.



4. Kako ćete odrediti staničnost nekoga organa?

ODREĐIVANJE STANIČNOSTI

Organ: _____

Tehnika izdvajanja stanica iz organa: _____

Volumen suspenzije stanica: _____

Razrjeđenje u melanžeru: _____

Srednji broj stanica po kvadratiću: _____

Račun:

Staničnost: _____

5. Koja je svrha određivanja staničnosti!

6. Slovo ispred organa/stanice s lijeve strane pridružite odgovarajućemu opisu s desne strane.

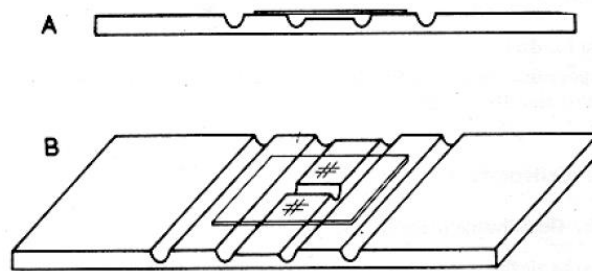
- a) B limfociti Fagociti. Zreli oblici monocita, migriraju iz tkiva u organe.
- b) primarna limfatička tkiva/organi Fagociti. Žive samo nekoliko dana. Nisu antigen prezentirajuće stanice.
- c) limfni čvor Nakon aktivacije diferenciraju u plazma stanice koje izlučuju protutijela.
- d) limfatička tkiva (organi) Postoje barem dvije klase: citotoksični i pomagački.
- e) slezena Organizirana tkiva u kojima limfociti stupaju u interakcije s ne-limfatičkim stanicama, a koje su važne ili za njihovu zriobu ili za započinjanje specifičnih odgovora.
- f) T-limfociti Tkiva/organi u kojima limfociti nastaju i sazrijevaju (između ostaloga, eksprimiraju svoje genske receptore). Koštana srž i timus.
- g) sekundarna limfatička tkiva/organi Tkiva/organi u kojima započinju specifični imunski odgovori. Mjesta susreta antigena i limfocita. Razmješteni su strateški u organizmu.
- h) timus Djeluje kao filter za krv. Nema dovodne limfne žile.
- i) neutrofil Mjesto hematopoeze. Mjesto sazrijevanja B limfocita.
- j) koštana srž Primarni limfatički organ u kojemu sazrijevaju T-limfociti.
- k) makrofagi Ima više dovodnih limfnih žila i jednu odvodnu. Kora sadrži brojne limfne folikule (limfne čvoriće). Srž je slabije organizirana od kore i bogata je T-limfocitima. Struktura mu nije stalna, nego se mijenja ovisno o izloženosti antigenima.

Dodatak vježbama: BROJENJE STANICA

Pripremiti Bürker-Türkovu komoricu za brojenje stanica (zalijepiti pokrovno stakalce). Vrh melanžera uroniti u kap krvi ili suspenziju stanica (stanice se brzo slegnu, suspenziju treba neposredno prije unošenja u melanžer dobro resuspendirati) i navući do oznake 0.5 ili do oznake 1. Treba zapamtiti do koje je oznake unesena suspenzija stanica ili krvi u melanžer jer o tome ovisi koliko je razrjeđenje.

Ako brojimo leukocite, melanžer treba nadopuniti Türkovom otopinom do oznake 11.

Melanžer nakon toga lagano protresti, prve dvije kapi tekućine iz melanžera ispustiti na filter papir, a sljedeću kap staviti na Bürker-Türkovu komoricu. Kap razrijeđene krvi ili suspenzije staviti uz sam rub pokrovnoga stakalca, uz jednu ugraviranu mrežicu.



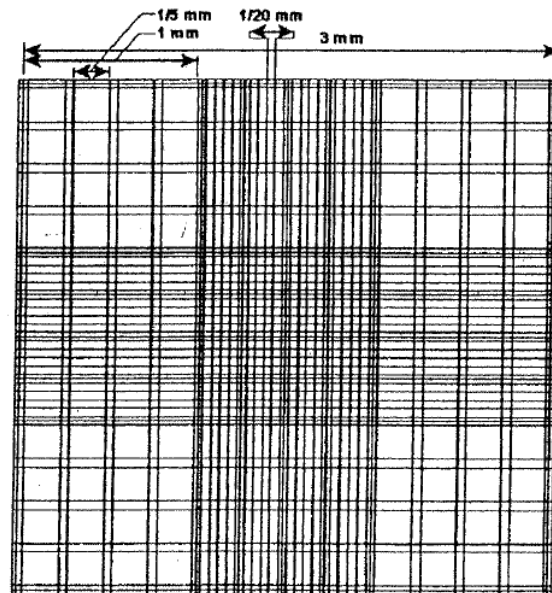
Slika 1. Bürker-Türkova komorica za brojenje stanica sa zalijepljenim pokrovnim stakalcem preko dviju ugraviranih pločica: (A) izgled sa strane; (B) izgled odozgo

Stanice treba izbrojiti pod mikroskopom u najmanje 64 kvadrata te broj stanica izraziti kao srednji broj stanica po jednome kvadratu.

Različiti kvadrati koriste se za brojenje različitih stanica:

- kvadrati za brojanje **eritrocita** manji su, omeđeni jednostrukim crtama i nalaze se u središnjemu dijelu mrežice u Bürker-Türkovoj komorici. Dimenzije su toga kvadra 1/20 mm x 1/20 mm. Visina kvadra iznosi 1/10 mm.

- kvadrati za brojanje **leukocita** veći su, omeđeni dvostrukim crtama (unutarnje crte čine rub kvadrata) i nalaze se na vanjskim kutovima mrežice u Bürker-Türkovej komorici. Dimenzije su toga kvadra 1/5 mm x 1/5 mm. Visina kvadra opet iznosi 1/10.



Slika 2. Mrežica Bürker-Türkove komorice s prikazanim dimenzijama kvadrata

Broj stanica po jedinici volumena dobije se na sljedeći način:

$$N(\text{stanica}) = \text{srednji broj stanica po kvadru} \cdot \frac{1}{V_{\text{kvadra}}} \cdot \text{razrjeđenje u melanžeru}$$

Dobiveni broj stanica izražen je u onome volumenu u kojemu je izražen i V_{KVADRA} , a obično se izražava u 1 μL (1 mm^3).

VJEŽBA 2. TEST CITOTOKSIČNOSTI (CTT)

1. Priprema niza dvostrukih razrjeđenja seruma

Za jedan niz označiti 9 epruveta. U svaku epruvetu dodati po 0,1 mL Hanksove otopine. Zatim u prvu epruvetu dodati 0,1 mL antiseruma (u našem testu koristi se štakorski serum protiv mišjih timocita, dobiven imunizacijom štakora stanicama mišjeg timusa). Napraviti seriju dvostrukih razrjeđenja seruma: iz prve epruvete prebaciti 0,1 mL sadržaja u drugu, dobro izmiješati, te potom 0,1 mL sadržaja iz te epruvete prebaciti u sljedeću epruvetu u nizu itd. sve do kraja serije epruveta.

2. Priprema suspenzije stanica

Propuhivanjem u 5 - 10 mL Hanksove otopine pripremiti suspenziju mišjeg timusa. Suspenziju centrifugirati, odliti supernatant, a talog stanica resuspendirati u 1 – 2 mL Hanksove otopine. Izbrojati stanice u suspenziji i podesiti im broj na 6×10^6 stanica/mL. Po 0,1 mL suspenzije stavljati u svaku epruvetu u nizu dvostrukih razrjeđenja seruma.

- **Ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi**

3. Dodavanje komplementa

Komplement razrijediti pomoću Hanksove otopine 6 puta. U svaku epruvetu u nizu dodati po 0,1 mL razrijeđenog komplementa.

- **Epruvete inkubirati 35 minuta u vodenoj kupelji na 37°C**

4. Brojanje mrtvih i živih stanica

U svaku epruvetu u nizu neposredno prije brojenja dodati po 0,1 mL tripanskog modrila. Sadržaj epruvete resuspendirati, kap suspenzije s tripanskim modrilom staviti na komoricu za brojanje stanica s ugraviranom mrežicom i pod mikroskopom izbrojati mrtve i žive stanice.

Pod mikroskopom izbrojati mrtve i žive stanice. Izraziti postotak mrtvih stanica.

Tablica 1. Rezultati CTT

RAZRJEĐENJE SERUMA	BROJ ŽIVIH STANICA	BROJ MRTVIH STANICA	UDIO MRTVIH STANICA

1. Kako ćete odrediti udio mrtvih stanica s pomoću vitalne boje?

2. Koja bi bila svrha određivanja udjela mrtvih stanica?

PRIČA O KOMPLEMENTU

1. Poznato je da protutijela koja na svojoj konstantnoj regiji imaju vezno mjesto za C1 komponentu komplementa pripadaju klasi IgM i podklasama klase IgG: IgG1 i IgG3. Međutim daleko najučinkovitiji među njima je IgM. Zašto?

2. Koji od 3 puta aktivacije komplementa pripadaju urođenoj, a koji stečenoj imunosti? Obrazložite svoj odgovor.

3. Nacrtajte kratku i jasnu shemu koja prikazuje 3 puta aktivacije komplementa. Ne zaboravite da na shemi mora biti membrana patogena.

VJEŽBA 3. IMUNIZACIJA ŠTAKORA

Imunizacija je namjerno izazivanje imunosti unošenjem antigena u organizam. Normalna imunoreakcija na bjelančevinaste antigene razmjerno je slaba pa se za njezino pojačanje zajedno s antigenom daju mješavine različitih tvari koje nazivamo adjuvansima. Adjuvansi prema podrijetlu mogu biti biološki i kemijski.

Postupak:

1. Priprema antigena

Izvagati 4 mg antigena (goveđi albumin, BSA) i otopiti ga u 1 mL fosfatnog pufera (PBS). Tako pripremljen antigen potrebno je pomiješati s jednakim volumenom Freundova adjuvansa.

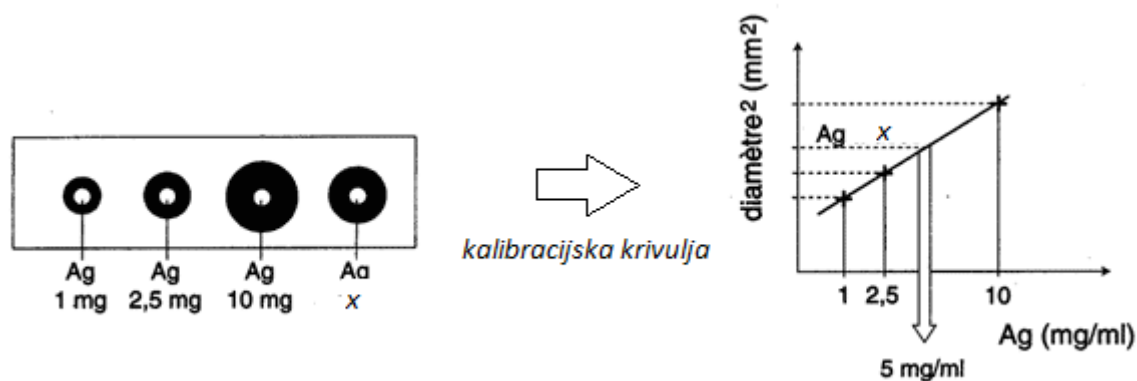
2. Postupak imunizacije

- a) Kao animalni model za imunizaciju koristit će se Wistar štakori u starosti od 3- 4 mjeseca. Imunizaciju će se provesti davanjem prethodno pripremljenog antigena intraperitonealno. Intraperitonealno će se injicirati 0,5 mL antigena. Injiciranje antigena štakoru predstavlja prvi dan imunizacije.
- b) Nakon 14 dana od imunizacije potrebno je ponoviti imunizaciju istim postupkom kao i početnu imunizaciju, ali bez dodatka adjuvansa.
- c) 21. dana od imunizacije štakoru je potrebno izvaditi krvi i izdvojiti serum u kojem očekujemo nastanak protutijela na dani antigen.

VJEŽBA 4. JEDNOSMJERNA RADIJALNA IMUNODIFUZIJA U GELU

Jednosmjerna radijalna imunodifuzija je kvantitativna serološka metoda dokazivanja i određivanja različitih proteina (imunoglobulina, komplementa) koja se temelji na precipitacijskoj reakciji između antigena i protutijela.

Ukoliko se u tankom sloju gela koji je promiješan sa protutijelima napravi malo udubljenje i u njega nanese antigen u odgovarajućoj koncentraciji, nakon određenog vremena (najčešće 48 sati) stvorit se kružni precipitacijski prsten čiji radijus ovisi o koncentraciji nanesenog antigena (slika 1.).



Slika 1. Jednosmjerna radijalna difuzija

Budući da precipitacijski prsten ima kružni oblik, metoda se naziva radijalna difuzija.

Reaktanti:

antigen – otopljen u fosfatnom puferu (PBS-u), difundira kroz gel

protutijela – sadržana u serumu imunizirane životinje (antiserum) i jednoliko raspoređena u gelu

Produkt:

precipitat – vidljiv u obliku bijelog prstena na mjestu susreta ekvivalentne količine antigena i protutijela.

Princip određivanja nepoznate koncentracije antigena

Koncentracija protutijela u gelu je konstantna, a u bazenčićima su poznate rastuće koncentracije antigena. Promjeri precipitacijskih prstenova oko bazenčića proporcionalni su koncentracijama antigena u istima. Uzevši obzir poznate koncentracije antigena i pripadajuće im koncentracije, napravimo kalibracijsku krivulju.

Postupak:

1. Priprema gela sa antiserumom

Serum se razrjeđuje u PBS-u. Optimalno razrjeđenje ovisi o količini stvorenih protutijela (što ovisi o kvaliteti imunizacije, vrsti antigena, vrsti životinje...), a može biti od 1:5, 1:10, itd.

Serum razrjeđujemo imajući na umu konačni volumen koji razlijevamo na stakalca, a to je 3 mL. Koristimo razrjeđenje 1:2.

Nakon što smo u epruvetu odvojili potrebnu količinu seruma dodamo PBS-a do 1,5 mL. Epruvetu stavimo u kupelj na 52 – 56°C da se zagrije.

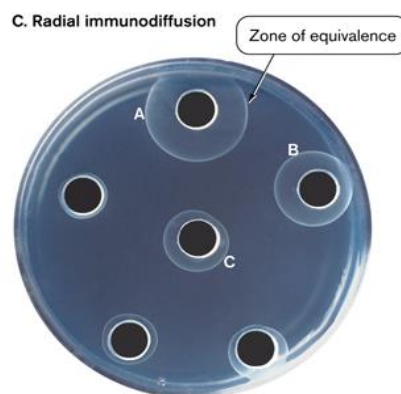
Potom dodamo 1,5 mL 2%-tnog agara i ukupni sadržaj od 3 mL epruvetom razlijemo na stakalce.

Nakon što se gel ohladi izbušimo bazenčice.

2. Priprema antigena različitih koncentracija (100, 150 i 200 µg/ml) od antigena početne koncentracije 2 mg/mL.

3. U bazenčić stavljamo konstantne volumene antigena. U jedan bazenčić stavimo antigen nepoznate koncentracije, a u ostale pripremljene poznate. Stakalca s gelovima potom stavimo u vlažnu komoru i ostavimo na sobnoj temperaturi 48 sati. Nakon stvaranja vidljivog precipitata, mjerimo promjere prstenova.

4. Napraviti kalibracijsku krivulju i interpolacijom ustanoviti nepoznatu koncentraciju antigena.



Slika 2. Precipitati – mjesta susreta ekvivalentne količine antigena i protutijela

VJEŽBA 5. ELISA

Simulacija

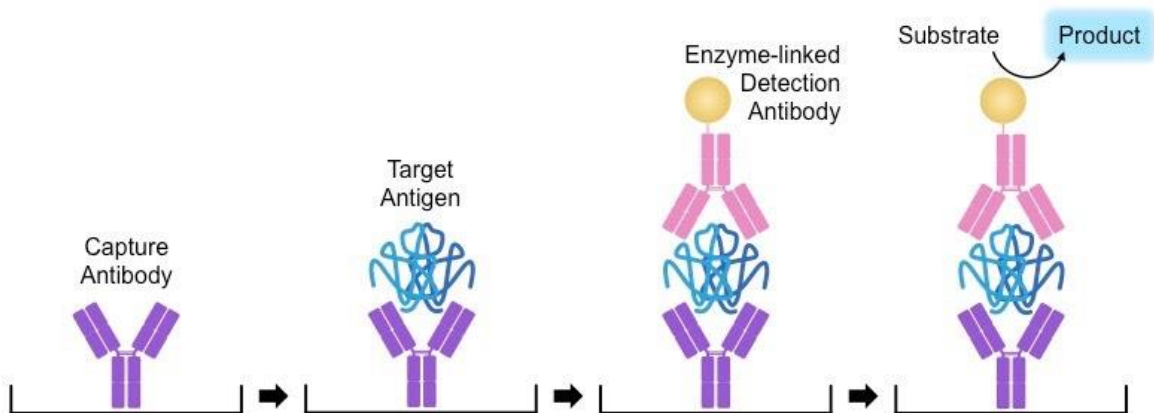
Elisa (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je serološki test u kojemu se antigen ili protutijela vezani za netopljive čestice ili plastičnu podlogu otkrivaju s pomoću enzima koji oboji bezbojni supstrat. Enzim se nalazi na obilježenim antiimunoglobulinskim protutijelima.

Svrha vježbe: uočiti princip rada ELISA metode.

IZVOĐENJE VJEŽBE:

1. Uključite računalo i pokrenite dobiveni CD
2. Prema dobivenim materijalima, slijedite protokol za izvedbu ove metode.
3. Po završetku izvedbe metode, odgovorite na sljedeća pitanja.

NAPOMENA: Slijedite točne upute protokola za izvedbu metode jer u protivnome možete dobiti krive rezultate.



Slika 1. Princip ELISA metode

1. Što tražimo u serumu pacijenta?

2. Zašto uklanjamo stanice iz krvi?

3. Zašto radimo više razrjeđenja seruma?

4. Da li smo dodali antigen? Što se događa ako imamo višak ili manjak antigena?

5. Što je pozitivna, a što negativna kontrola u pokusu i zašto ih radimo?

6. Što se događa tijekom prve inkubacije?

7. Zašto je nužno temeljno isprati pločicu (3-6 puta) nakon prve i druge inkubacije?

8. Gdje je proizvedeno drugo protutijelo i što je njegov antigen?

9. Što se događa tijekom druge inkubacije?

10. Što sadrži drugo protutijelo?

11. Što je HRP supstrat i zašto ga dodajemo?

12. Kako znamo da li je reakcija pozitivna?

13. Zašto je pacijent A vjerojatno bolestan, a pacijent C vjerojatno zdrav? Koja su subjektivna ograničenja testa?

14. Ukratko opiši i skiciraj princip metode!
