

**Princíp stanovenia
lyzozýmu a
baktericídnej aktivity
séra**

Lyzozým

Všeobecná charakteristika

- ▶ muramidáza
- ▶ proteín, ktorý sa skladá z jediného polypeptidového reťazca tvoreného 129 jednotkami
- ▶ objavený v roku 1922 Alexandrom Flemingom
- ▶ enzým s antibakteriálnym účinkom

Výskyt lyzozýmu

- ▶ súčasť špecializovaných bunkových organel – lyzozómov
- ▶ v granulách neutrofilov, v krvnom sére a vo väčšine telesných sekrétov - v nosovom hliene, slinách, slzách, materskom mlieku
- ▶ uvoľňuje sa aj z bičíka bakteriofága
- ▶ lokálne antiseptikum

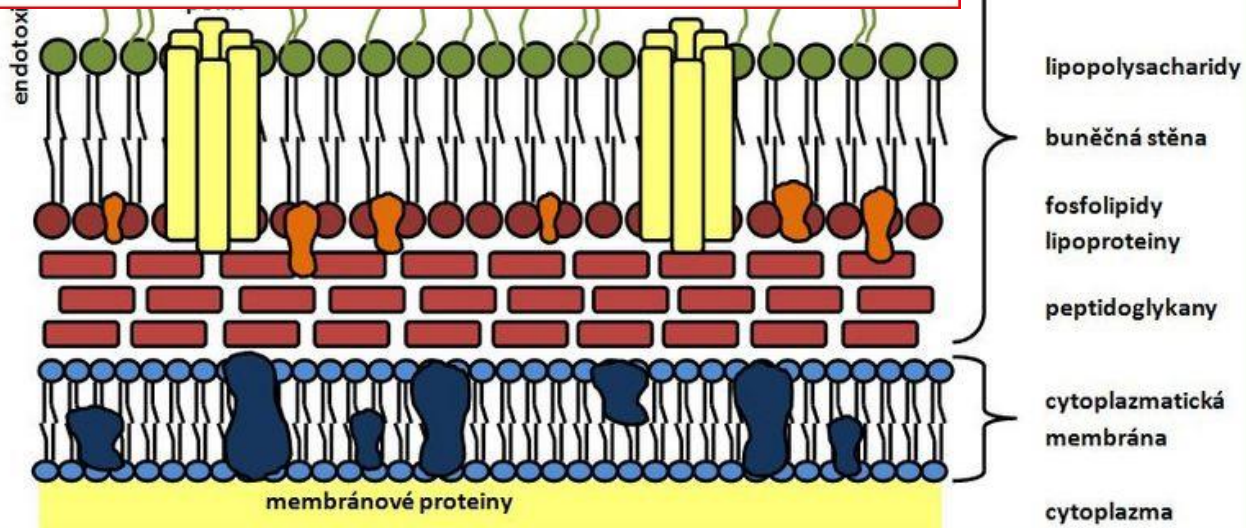
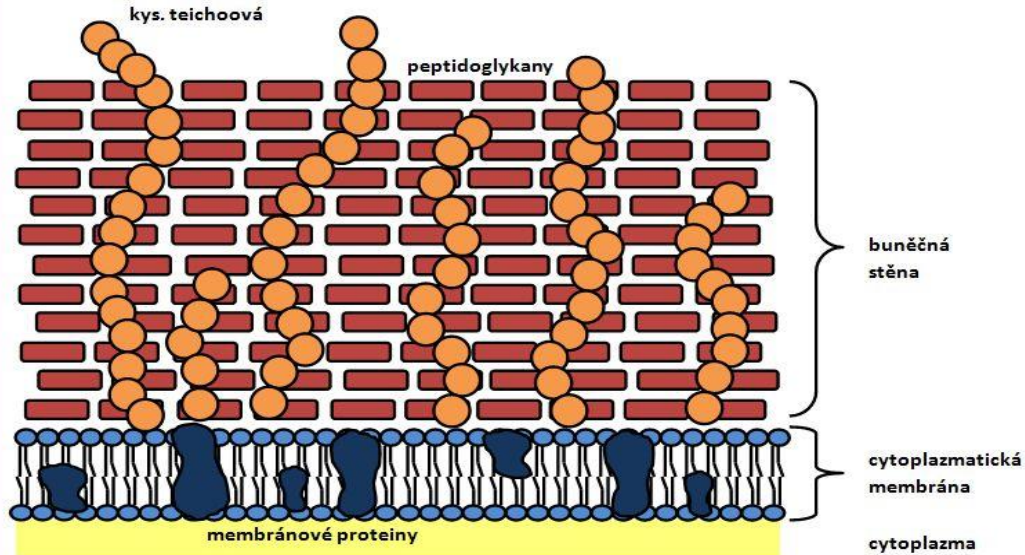
Mechanizmus účinku lyzozýmu

- ▶ uplatňuje pri rozklade polysacharidu mureínu tým, že štiepi 1,4-beta-D-glykozidickú väzbu medzi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukozamínom
- ▶ mureín (peptidoglykán) je základnou stavebnou súčasťou bunkovej steny baktérií

Grampozitívne a gramnegatívne baktérie

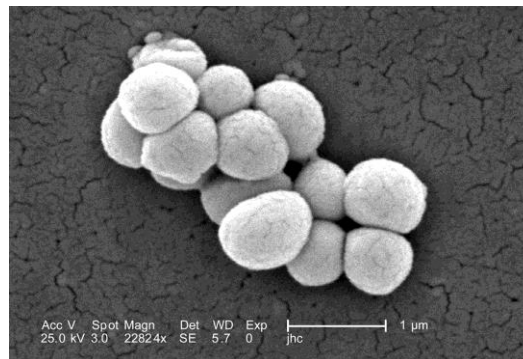
- ▶ bunková stena grampozitívnych bakterií (G+) je tvorená prevažne silnou peptidoglykanovou vrstvou
- ▶ samotný mureín predstavuje 10-50 % suchej hmotnosti celej baktérie
- ▶ k účinku antibiotík i lyzozýmu sú G+ baktérie veľmi citlivé
- ▶ gramnegatívne bakterie (G-) majú bunkovú stenu tvorenú tenkou, ale pevnou peptidoglykanovou vrstvou nad ktorou sa nachádza ešte membrána tvorená dvojvrstvou fosfolipidov a bielkovín
- ▶ mureín tvorí cca 3 % suchej hmotnosti bunky
- ▶ voči účinkom lyzozýmu sú veľmi málo citlivé

Gram +



Stanovenie lyzozýmu metódou jednoduchovej radiálnej imunodifúzie

- ▶ využíva sa schopnosť lyzozýmu lyzovať bunkovú stenu
- ▶ v teste sa používa grampozitívna baktéria *Micrococcus lysodeiticticus* (*luteus*)



Postup :

1. na sklenenú platničku sa vyleje agar zmiešaný so suspenziou *Micrococcus luteus* (v rovnakom pomere)
2. stuhnutie, vyrezanie otvorov
3. do otvorov sa pipetujú známe vzorky štandardného roztoku lyzozýmu v stúpajúcich koncentráciách a do ostatných skúmané vzorky
4. inkubácia – 24 hodín
5. lyzozým difunduje do okolia jamiek a spôsobí lýzu mikrokoka
6. odmerajú sa priemery lýzy mikrokoka
7. z nameraných hodnôt lýzy štandardného lyzozýmu sa vytvorí kalibračná krivka

▶ Výsledok :

▶ pomocou vytvorenej krivky sa určí množstvo lyzozýmu v skúmaných vzorkách

▶ referenčné hodnoty = **$20,8 \pm 3,2$ mg/l**

Stanovenie baktericídnej aktivity séra

- ▶ antibakteriálne látky ako lyzozým spolu s komplementom sú podkladom prirodzenej baktericídnej aktivity séra

Postup :

- ▶ substrátom musí byť živý organizmus (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* alebo pseudomonády)
- ▶ krv sa inkubuje so suspenziou príslušného mikroorganizmu
- ▶ farbenie trypanovou modrou
- ▶ vyočkovanie na pevné pôdy v Petriho miske

Výsledok :

- ▶ narastené kolónie sa spočítajú
- ▶ po spočítaní množstva vyrastených kolónií z vyšetrovanej vzorky a kontroly sa baktericídna aktivita vypočíta podľa vzorca:

počet vyrastených kolónií z vyšetrovanej vzorky x 100

počet vyrastených kolónií z kontroly

Zdroje

- ▶ **Návody na praktické cvičenia z imunológie :**
M. Neuschlová, E. Nováková, J. Kompániková
- ▶ **http://is.muni.cz/el/1431/jaro2016/Bi5220c/um/6_Imunodifuzni_metody_-_stanoveni_lyzozymu.pdf**

Ďakujem za pozornosť!