**Спироски М, Трајков Д, Петличковски А, Арсов Т, Стрезова А,
Ефинска-Младеновска О, Христоманова С, Спироска Е,
Сибиновска О, Петров Ј**

ИМУНОЛОШКИ ПРАКТИКУМ

- лабораториска имунодијагностика -

Институт за имунобиологија и хумана генетика,
Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј"
Скопје, 2006

АВТОРИ

Проф. д-р Мирко Спироски, асист. д-р Дејан Трајков, асист. д-р Александар Петличковски, асист. д-р Тодор Арсов, асист. д-р Ана Стрезова, биотехнолог Оливија Ефинска-Младеновска, д-р Славица Христоманова, д-р Ели Спироска, молекуларен биолог Олгица Сибиновска, д-р Јордан Петров, Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје.

CIP - Каталогизација во публикација
Народна и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

612.017(076.5)(075.8)

ИМУНОЛОШКИ практикум : лабораториска имунодијагностика / Спироски М, Трајков Д, Петличковски А, Арсов Т, Стрезова А, Ефинска-Младеновска О, Христоманова С, Спироска Е, Сибиновска О, Петров Ј. - Скопје :Медицински факултет, Институт за имунобиологија и хумана генетика, 2006. - 240 стр. : илустр. ; 28 см

Библиографија: стр. 240

ISBN 978-9989-9674-9-8
1. Спироски, Мирко
а) Имунологија - Високошколски учебници - Вежби, лабораториски
COBISS.MK-ID 68067338

© 2006 Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје

Сите права се заштитени. Овој труд не смее да биде преведен или копиран во целина или негов дел без потпишана дозвола од издавачот (Институт за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј", Скопје). Забрането е било какво складирање и архивирање, електронско прилагодување, компјутерско програмирање или користење со некоја слична или различна технологија позната до денес или која ќе се развие подоцна.

Печати: печатница ПРОпоинт графички центар, Скопје

Тираж: 600 примероци

Според мислењето на Министерството за култура на Република Македонија за книгата Имунолошки практикум се плаќа повластена даночна стапка.

ПРЕДГОВОР

Предметот имунологија *за прв пат е воведен во шестогодишниот систем на студии на Медицинскиот факултет во Скопје во учебната 1993/94 година. Предметот се слушаше во зимскиот семестар од трета година (5. семестар) со вкупен фонд од 30 часови (15 часа теоретска настава + 15 часа практична настава). Во почетокот целокупната теоретска и практична наставата ја изведуваа наставници и асистенти по физиологија од Институтот за физиологија и наставници и асистенти по трансфузиологија од Републичкиот завод за трансфузиологија.*

ИМУНОЛОШКИ ПРАКТИКУМ - имунодијагностика	ДОПОЛНИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ	
БЛОК 1 - ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ		
Вежба 1: Испитување клеточен вроден имун систем	Видео исечоци	CD
Вежба 2: Испитување хуморален вроден имун систем	Видео исечоци	CD
Вежба 3: Анализа на вроден имун систем	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 2 - ИМУНИ КЛЕТКИ		
Вежба 4: Клетки во имуниот систем	Видео исечоци	CD
Вежба 5: Проточна цитометрија	Видео исечоци	CD
Вежба 6: Анализа на клеточен имунитет	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 3 - ИМУНОГЛОБУЛИНИ		
Вежба 7: Таложни противтела	Видео исечоци	CD
Вежба 8: Противтелен одоговор	Видео исечоци	CD
Вежба 9: Анализа на хуморален имунитет	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 4 - КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ И ЦИТОКИНИ		
Вежба 10: Комплементен систем	Видео исечоци	CD
Вежба 11: Цитокини	Видео исечоци	CD
Вежба 12: Анализа на комплементен систем и од цитокини	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 5 - ТРАНСПЛАНТАЦИЈА		
Вежба 13: Прика жување главен ткивно совпадлив комплекс	Видео исечоци	CD
Вежба 14: Генска структура на главен ткивно совпадлив комплекс	Видео исечоци	CD
Вежба 15: Анализа на трансплантација	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 6 - ПРЕОСЕТЛИВОСТ		
Вежба 16: Тип 1 преосетливост	Видео исечоци	CD
Вежба 17: Тип 2 и тип 3 преосетливост	Видео исечоци	CD
Вежба 18: Анализа на преосетливост	Анализа на случај	CD, Книга
БЛОК 7 - АВТОИМУНИТЕТ		
Вежба 19: Системски автоимунитет	Видео исечоц	CD
Вежба 20: Орган специфичен автоимунитет	Видео исечоци	CD
Вежба 21: Анализа на автоимуни заболувања	Анализа на случај	CD, Книга

Во текот на 1994 година беа распишани избори и беа избрани првиот наставник и првите асистенти по предметот имунологија. На 02.03. 1995 година е конституирана првата ***Катедра за имунологија*** *на Медицинскиот факултет во Скопје. Од 2001? предметот Имунологија се слушаше во четвртиот семестар (втора година) со фонд на часови 15+15 и со дополнителни 15 часови семинари. Од учебната 2005/06 започна Европскиот кредитниот трансфер систем (ЕКТС) на Медицинскиот факултет во Скопје, според кој предметот Имунологија се слуша со фонд на часови 24+21 (45) во третиот семестар (втора година).*

Во јуни месец 1995 година излезе од печат првиот учебник по имунологија, односно книгата ***Основни имунолошки методи*** *наменета за практичната настава од овој предмет. Во 2005 излезе од печат книгата Имунолошки практикум за практичната настава од предметот имунологија во издание на Институтот за имунобиологија и хумана генетика. Вработените од Институтот се зафатија со задача да напишат* ***Имунолошки практикум - имуно-дијагностика*** *според програмата за ЕКТС и да им го стават на располагање на студентите.*

Во овој практикум се внесени седум блокови од вежби од имунодијагностиката во имунологијата. Секој блок е составен од три вежби, од кои првите две се лабораториски методи за имунодијагностика, а третата вежба е толкување на резултатите од соодветаната области на имунологијата. Кон овие седум блокови, односно 21 вежба се понудени дополнителни материјали во облик на видео исечоци (на компакт диск) за полесно совладување на материјалот. Кон секоја вежба за толкување на имунолошките резултати додадени се анализи на случаи со цел студентите да ги поврзат имунолошките резултати со идните клинички дисциплини во кои ќе го применат стекнатото знаење од имунологијата.

Студентите треба да ги совладаат предвидените материјали пред да присуствуваат на вежби за да освојат најголем број поени и со тоа повисока оценка.

Се надевам дека практикумот ќе им биде од корист на студентите и дека ќе претставува добра основа за донесување на новата наставна програма од овој предмет.

Проф. д-р Мирко Спироски

Скопје, ноември 2006 година

СОДРЖИНА

ПРЕДГОВОР **3**

СОДРЖИНА **5**

БЛОК 1- ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ **9**
ВЕЖБА 1: ИСПИТУВАЊЕ КЛЕТОЧЕН ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ **11**
1.1. Испитување имунолошката функција на фагоцитите 11
1.2. Квалитативен НБТ тест 12
1.3. Квантитативен НБТ тест 12
1.4. Задача 15
ВЕЖБА 2: ИСПИТУВАЊЕ ХУМОРАЛЕН ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ **17**
2.1. Протеини на акутна фаза (ПАФ) 17
2.1.1. Акутно фазен одговор 17
2.1.2. Регулација на акутно фазните промени 18
2.1.2.1. Индукција на протеините од акутна фаза со цитокини и други сигнални молекули 20
2.1.2.2. Регулација на другите акутно фазни промени со воспалително асоцираните цитокини 21
2.1.3. Функции на акутно фазниот одговор 22
2.2. Определување концентрација на акутно фазни протеини со имунотурбидиметрија 23
2.2.1. Принципи на имунотурбидиметрија 23
2.2.2. Калибрација 24
2.2.3. Систем за температурна компензација 25
2.2.4. Процедура 25
2.3. Задача 26
ВЕЖБА 3: АНАЛИЗА НА ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ **27**
3.1. Толкување резултати од вроден имун систем 27
3.1.1. Нормални вредности од испитување клеточен вроден имун систем 27
3.1.2. Клиничка примена на акутно фазните протеини 29

БЛОК 2 - ИМУНИ КЛЕТКИ **31**
ВЕЖБА 4: КЛЕТКИ ВО ИМУНИОТ СИСТЕМ **33**
4.1. Двоење лимфоцити и моноцити од периферна крв 33
4.1.1. Општи напомени 33
4.1.2. Постапка за двоење лимфоцити од периферна крв 34
4.1.3. Броење клетки со хемоцитометар 35
4.1.4. Испитување живи и мртви клетки 37
4.2. Имунофлуоресценција 38
4.2. 1. Флуоресцентна микроскопија 39
4.2.1.1. Флуоресцентна микроскопија со пропусно светло 39
4.2.1.2. Флуоресцентна микроскопија со отпачко светло 40
4.2.2. Добивање конјугирани противтела 41
4.2.3. Подготовка на ткива и клетки 42
4.2.3.1. Ткивни препарати 42
4.2.3.2. Парафински препарати 43
4.2.3.3. Клеточни препарати 43
4.2.4. Боење, отчитување и документирање 44
4.2.4.1. Директна имунофлуоресценција (ДИФ) 44
4.2.4.2. Индиректна имунофлуоресценција (ИИФ) 45
4.2.4.3. Системот биотин-авидин 45
4.2.4.4. Квантитативна имунофлуоресценција 46
4.2.4.5. Грешки и лажно позитивни резултати 47
4.2.4.6. Документирање на резултатите (фотографирање) 47
4.3. Задача 48
ВЕЖБА 5: ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА **49**
5.1. Систем за проточна цитометрија 49
5.1.1. Проточна цитометрија 50
5.1.2. Течни системи 50
5.1.3. Оптички систем 51
5.1.4. Анализа на податоците 53
5.1.4.1. Анализа 53
5.1.4.2. Надоместок (компензација) 56
5.1.4.3. Складирање податоци 56
5.1.5. Проточно сортирање клетки 57
5.2. Функционален тест за клетки природни убијци (КПУ) 57
5.2.1. Основи на тестот 57
5.2.2. Протокол за работа 58

5.2.2.1. Општи подготовки ... 58
5.2.2.2. Изолација на ефекторните клетки ... 58
5.2.2.3. Одмрзнување на K562 клеточната линија ... 59
5.2.2.4. Припрема на примерокот за мерење ... 59
5.2.2.5. Мерење и анализа на податоците добиени со проточниот цитометар ... 60
5.3. Задача ... 60
ВЕЖБА 6: ТОЛКУВАЊЕ РЕЗУЛТАТИ ОД КЛЕТОЧЕН ИМУНИТЕТ ... 61
6.1. Нормални вредности на бели клетки ... 61
6.2. Имунофенотипизирање ... 62
6.2.1. Вовед ... 62
6.2.2. Дијагноза на хематолошки малигнитети ... 63
6.2.3. Останати клонални/генетски хематолошки и имунолошки заболувања ... 65
6.2.4. Трансплантација ... 65
6.2.5. Дијагноза и следење на инфективните заболувања и имуни недостатоци ... 66
6.3. Толкување резултати од функционални тестови во клеточен имунитет ... 67
6.3.1. Функционален тест за клетки природни убијци ... 67
6.3.1.1. Очекувани резултати ... 68

БЛОК 3 - ИМУНОГЛОБУЛИНИ ... 69
ВЕЖБА 7: ТАЛОЖНИ ПРОТИВТЕЛА - ИМУНОПРЕЦИПИТАЦИЈА ... 71
7.1. Преципитација во течна средина ... 71
7.2. Двојна имунодифузија на агар ... 72
7.3. Единечна (радијална) имунодифузија на агар ... 74
7.4. Имуноелектрофореза ... 77
7.5. Задачи ... 77
ВЕЖБА 8: ПРОТИВТЕЛЕН ОДГОВОР ... 79
8.1.Броење противтела секретирачки Б лимфоцити ... 79
8.2.Имунонефелометриско определување имуноглобулински класи и поткласи ... 81
8.2.1. Принцип на имунонефелометрија ... 81
8.2.2. Оптички патеки на светлината ... 81
8.2.3. Принципи на имунотурбидиметриско мерење ... 82
8.2.4. Предреакции ... 84
8.2.5. Проверување турбидитет ... 85
8.3. Задачи ... 85
8.3.1. Изброј ИгМ секретирачи спленоцити од готова плоча ... 85
8.3.2. Измери концентрација на Иг класи со имунонефелометар ... 86
ВЕЖБА 9: АНАЛИЗА НА ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ ... 91
9.1. Нормални вредности од испитувањето хуморален имунитет ... 91
9.2. Клиничко значење на имуноглобулинските класи и поткласи ... 92
9.2.1. Хипогамаглобулинемии ... 92
9.2.1.1. Првични имунонедостатоци ... 93
9.2.1.2. Вторични имунонедостатоци ... 99
9.2.2. Поликлонски и олигоклонски гамопатии ... 99
9.2.3. Моноклонски гамопатии ... 100

БЛОК 4 - КОМПЛЕМЕНТЕН СИТЕМ И ЦИТОКИНИ ... 101
ВЕЖБА 10: КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ ... 103
10.1. Определување CH50 на комплементот ... 104
10.2. Испитување концентрација на К3, К4 и К1инх ... 107
10.2.1. Радијална имунодифузија (РИД) ... 107
10.2.2. Одредување на К3 компонентата од комплементот со радијална имунодифузија ... 109
10.2.3. Одредување на К4 компонентата од комплементот со радијална имунодифузија ... 110
10.2.4. Одредување на К1 инхибитор компонентата од комплементот со радијална имунодифузија ... 110
10.3. Задача ... 111
ВЕЖБА 11: ЦИТОКИНИ ... 113
11.1. Заситувачки методи ... 113
11.1.1. Општи принципи на заситувачките методи ... 113
11.2. Имуноензимски одредувања (ЕЛИСА) ... 114
11.2.1. Подготовка на имуноатсорбентот ... 114
11.2.2. Коњугирање ... 115
11.2.3. Спојување ензим со противтело или противген ... 115
11.2.4. Одвивање на реакцијата ... 115
11.2.5. Читање на резултатот ... 116
11.3. Одредување концентрација на цитокини ... 116
11.3.1. Општо за одредувањето цитокини ... 116
11.3.2. Изведување на вежбата (Одредување концентрација на интерлеукин 1б) ... 118
11.3.2.1. Потребен материјал за изведување на вежбата ... 118
11.3.2.2. Припрема на пуфер за плакнење на бунарчињата ... 118
11.3.2.3. Припрема на работниот раствор на цитокинскиот стандард ... 119
11.3.2.4. Припрема на засилувачкиот раствор Amdex ... 119
11.3.2.5. Стандарден раствор за разредување ... 119
11.3.2.6. Примерок ... 119
11.3.2.7. Протокол за работа ... 120
11.3.2.7.1. Приготвување на стандардите ... 120
11.3.2.7.2. Изведување на тестот ... 120
11.3. Задача ... 123
ВЕЖБА 12: АНАЛИЗА НА КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ И ЦИТОКИНИ ... 125
12.1. Нормални вредности од испитување комплементен систем ... 125
12.2. Толкување резултати од комплементен систем ... 126
12.2.1. CH50 ... 126
12.2.2. К3 и К4 ... 127
12.2.3. К1-инхибитор ... 127
12.2.4. Хиперкомплементемија ... 127
12.2.5. Хипокомплементемија ... 128
12.3. Нормални вредности од цитокини ... 130
12.4. Дијагностичко значење на цитокините ... 131

БЛОК 5 - ТРАНСПЛАНТАЦИЈА ... 133
ВЕЖБА 13: ПРИКАЖУВАЊЕ ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС ... 135
13.1. Општо за ХЛА ... 135
13.1.1. Што е ХЛА ... 135
13.1.2. Геномска структура и полиморфизам ... 137
13.1.3. Методи за типизирање на ХЛА ... 137
13.1.4. Серолошки методи ... 138
13.1.5. Номенклатура ... 139
13.2. Серолошки методи за типизирање на ХЛА ... 139
13.2.1. Неопходни услови ... 140
13.2.2. Приготвување лимфоцитна суспензија ... 140
13.2.3. Микролимфоцитотоксичен тест ... 141
13.2.4. Резултати ... 142
13.3. Задача ... 143
ВЕЖБА 14: ГЕНСКА СТРУКТУРА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС ... 145
14.1. Генска структура на ГТСК и негови полиморфизми ... 145
14.2. Молекулски методи за ХЛА типизација ... 146
14.3. Принципи на молекуларните методи за ХЛА типизација ... 146
14.3.1. ССОП (Sequence Specific Oligonucleotide Probing) ... 146
14.3.2. РЛС (Reverse Line Strip) – реверзна хибридизација ... 147
14.3.3. ССП (Sequence Specific Priming) ... 148
14.3.4. СБТ (Sequence Based Typing) ... 148
14.4. Нивоа на ХЛА типизација ... 149
14.5. Двојбеност (амбигвитет) ... 149
14.6. Номенклатура ... 150
14.7. Изведување на вежбата ... 152
14.7.1. RLS (Reverse Line Strip) ... 152
14.7.2. ССП (SSP-Sequence Specific Priming) ... 153
14.8. Задачи ... 155
14.8.1. Интерпретирај ги алелите за ХЛА локусот од нитроцелулозните ленти добиени со методот на реверзна хибридизација (РЛС) ... 155
14.8.2. Интерпретирај ги алелите за ХЛА локусот со методот на ССП на високо разделно ниво ... 157
ВЕЖБА 15: АНАЛИЗА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС ... 159
15.1. Нормални вредности за главниот ткивно совпадлив комплекс ... 159
15.2. Болести поврзани со ГТСК ... 160
15.2. Анализа на ГТСК асоцијација и болести ... 160
15.3. Асоцијација со хаплотипови ... 162
15.4. Значење на ХЛА системот во трансплантација ... 162
15.4.1. Барање дарител ... 163
15.4.2. Толкување резултати ... 163

БЛОК 6 - ПРЕОСЕТЛИВОСТ ... 165
ВЕЖБА 16: ТИП 1 ПРЕОСЕТЛИВОСТ ... 167
16.1. Реакции на преосетливост ... 167
16.2. Одредување вкупен ИгЕ и специфични ИгЕ противтела ... 167
16.2.1. Алергени ... 167
16.2.1.1. Вдишени (инхалаторни) алергени ... 168
16.2.1.2. Храни ... 168
16.2.1.3. Антибиотици, други лекови и хемикалии ... 169
16.2.1.4. Професионални алергени ... 170
16.2.1.5. Различни растителни продукти ... 170
16.2.1.6. Контактни алергени ... 170
16.2.1.7. Основни принципи за вкрстена реактивност меѓу растителни алергени ... 170
16.2.2. ИгЕ посредувана алергија ... 171
16.2.3. Дијагностицирање на ИгЕ посредувана алергија ... 172
16.2.4. Принцип за определување специфичен ИгЕ ... 172
16.3. Разликување атописки од не-атописки болести ... 173
16.3.1. UniCap Phadiatop ... 173
16.3.2. UniCap fx5 ... 174
16.3.3. UniCap вкупен ИгЕ ... 175
16.4. Дијагностички помагала за специфични алергии ... 175
16.4.1. UniCap специфичен ИгЕ ... 175
16.4.2. UniCap специфичен ИгА ... 177
16.4.3. UniCap глијадин ИгА ... 178
16.4.4. UniCap специфичен ИгГ ... 179
16.4.5. UniCap глијадин ИгГ ... 180
16.4.6. UniCap еозинофилен катјонски протеин (ЕКП) ... 180
16.4.7. UniCap триптаза ... 181
16.5. Задачи ... 182
16.5.1. Одреди вкупен и специфичен ИгЕ во серум ... 182
ВЕЖБА 17: ТИП 2 И ТИП 3 ПРЕОСЕТЛИВОСТ ... 187
17.1. Аглутинација ... 187
17.1.1. Објаснување механизмот на аглутинација ... 189
17.2. Директен противглобулински тест (ДПТ) ... 189
17.2.1. Земање примерок ... 190
17.2.2. Материјал ... 190
17.2.3. Метод ... 190
17.2.4. Забелешки ... 192
17.2.5. Титар кај антиглобулинските тестови ... 193
17.3. Индиректен противглобулински тест ... 195
17.3.1. Потребни материјали ... 195
17.3.2. Метод ... 195
17.3.3. Забелешки ... 196
17.4. Определување циркулирачки имуни комплекси со преципитација со полиетилен гликол ... 196
17.5. Задача ... 198

ВЕЖБА 18: АНАЛИЗА НА ПРЕОСЕТЛИВОСТ 199
18.1. Нормални вредности за вкупен и за специфичен ИгЕ 199
18.2. Клинички симптоми за алергија и нивно дијагностицирање 199
18.2.1. Одделно испитување алергени 201
18.2.2. Испитување комплет алергени 201
18.2.3. Испитување алергени според дијагноза 203
18.3. Толкување резултати од противглобулински тест 204
18.3.1. Директен противглобулински тест 204
18.3.2. Индиректен противглобулински тест 206

БЛОК 7 - АВТОИМУНИТЕТ 207
ВЕЖБА 19: СИСТЕМСКИ АВТОИМУНИТЕТ 209
19.1. Вовед за автоимуност 209
19.2. Откривање на автопротивтела 210
19.2.1. Индиректна имунофлуоресценција 211
19.2.2. Аглутинација 211
19.2.3. Имунодифузија 211
19.2.4. Имунопреципитација 211
19.2.5. Имуноблотирање 212
19.2.6. ЕЛИСА 212
19.2.7. ЕЛИА 213
19.2.8. Примерок за испитување 213
19.2.9. Стабилност на противтелата 213
19.3. Системски автоимуни заболувања 213
19.3.1. Противтела поврзани со ревматска болест 213
19.3.1.1. Фосфолипидни противтела 213
19.3.1.2. Нуклеарни противтела (АНА) 214
19.3.2. Противтела кон неутрофилната цитоплазма 214
19.3.3. Системски лупус еритематозус (СЛЕ) 215
19.3.3.1. Оштетување на ткивото 215
19.4. Задача 216
19.4.1. Определување ИгМ противкардиолипински противтела 216
19.4.1.1. Потребен материјал за изведување на вежбата 216
19.4.1.2. Припрема на пуфер за плакнење 217
19.4.1.3. Припрема на раствор за разредување 217
19.4.1.4. Примерок 217
19.4.1.5. Протокол за работа 218
19.4.1.6. Пресметување на резултатите 219
19.4.1.7. Пресметување концентрација на ИгМ противкардиолипинските противтела 219
ВЕЖБА 20: ОРГАН СПЕЦИФИЧЕН АВТОИМУНИТЕТ 221
20.1. Орган специфични автоимуни заболувања 221
20.1.1. Ендокрини автоимуни болести 221
20.1.1.1. Противтела кон париетални гастрични клетки 221
20.1.1.2. Противтела кон интринзик факторот 221
20.1.1.3. Автопротивтела поврзани со дијабетес 222
20.1.1.4. Тироидни автопротивтела 222
20.1.2. Гастроинтестинални автоимуни болести 223
20.1.2.1. Противтела поврзани со целијакија 223
20.1.3. Автоимуна болест на црниот дроб 223
20.1.4. Противтела поврзани со невромускуларни болести 224
20.1.4.1. Противтела кон ацетилхолински рецептори 224
20.1.5. Автопротивтела поврзани со бубрежна болест 224
20.1.5.1. Противтела кон гломерулската базална мембрана 224
20.2. Задачи 225
20.2.1. Определи концентрација на тироидни автопротивтела (ТГ и ТПО) 225
ВЕЖБА 21: АНАЛИЗА НА АВТОИМУНИ ЗАБОЛУВАЊА 229
21.1. Нормални вредности за системски автопротивтела 229
21.2. Нормални вредности за орган специфични противтела 230
21.3. Толкување системски автопротивтела 231
21.3.1. Автопротивтела кон двоверижна ДНК (двДНК) 232
21.3.2. U1RNP 232
21.3.3. РНП70 232
21.3.4. См 232
21.3.5. Ро 233
21.3.6. Ла 233
21.3.7. ЦЕНП 233
21.3.8. Сцл-70 233
21.3.9. Јо-1 233
21.3.10. Автопротив тела кон протеиназа 3 (ПР3) 233
21.3.11. Автопротив тела кон миелопероксидаза (МПО) 233
21.3.12. Автопротив тела кон алфа3 ланецот на колаген 4 (ГБМ) 234
21.3.13. Кардиолипински противтела 234
21.4. Толкување орган специфични автопротивтела 235
21.4.1. Антитироглобулински противтела (ТГ) 235
21.4.2. ТПО 235
21.4.3. Противтела кон париетални клетки 236
21.4.4. Тест за ГБМ противтела 236
21.4.5. Тест за противспермални противтела 237
21.4.6. Противмитохондријални противтела 237
21.4.7. ЛКМ1 противтела 238

22. ОСНОВНИ ЛАБОРАТОРИСКИ ПРАВИЛА 239

23. ЛИТЕРАТУРА 240

БЛОК 1 - ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 1. ИСПИТУВАЊЕ КЛЕТОЧЕН ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- го дефинираат местото на фагоцитозата во вродениот имунитет;
- ја определат фагоцитната способност во еден фагоцит.

ВЕЖБА 2. ИСПИТУВАЊЕ ХУМОРАЛЕН ИМУН СИСТЕМ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да ги протолкуваат протеини на акутна фаза;
- да ја определат количината на некои протеини на акутна фаза во плазма.

ВЕЖБА 3. АНАЛИЗА НА СЛУЧАИ ОД ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од вродениот имун систем;
- анализираат случаи од вроден имун систем.

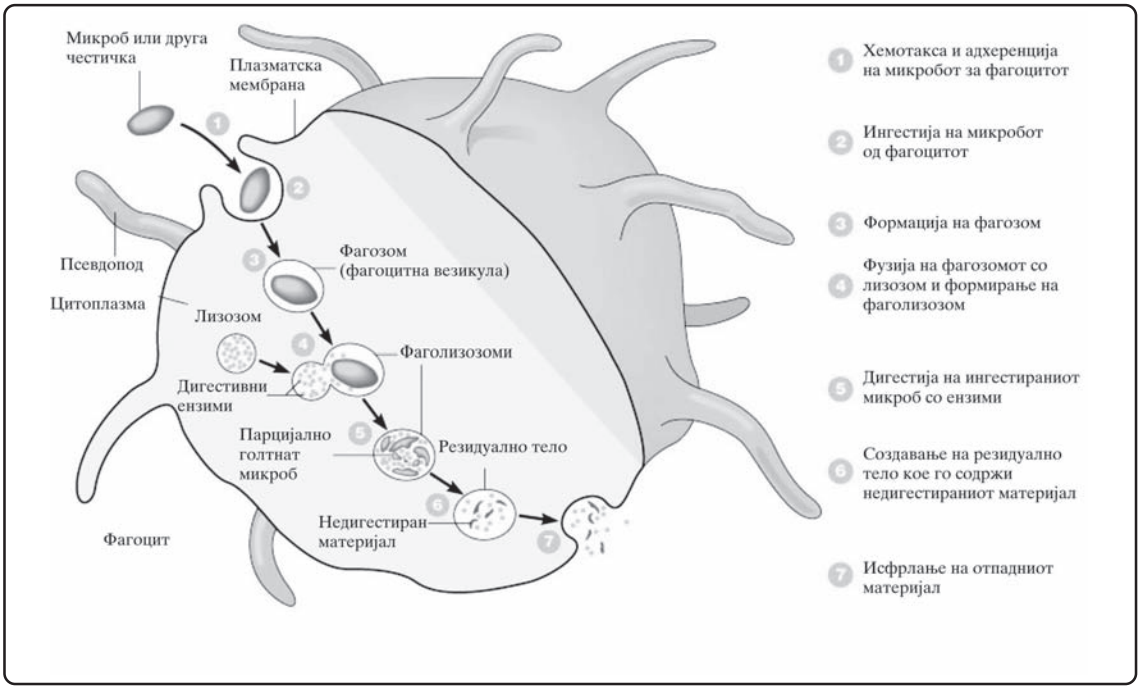
ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 1: ИСПИТУВАЊЕ КЛЕТОЧЕН ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ

1.1. Испитување имунолошката функција на фагоцитите

Фагоцитните клетки, полиморфонуклеарните неутрофили и мононуклеарните фагоцити (макрофаги, моноцити), имаат многу важна имунолошка функција во ефекторниот дел на имунолошкиот одговор и во воспалителната реакција. При бактериска или фунгична агресија врз организмот први реагираат полиморфонуклеарите, а потоа се вклучуваат и мононуклеарните фагоцити. Нивната имунолошка функција



Слика 1.1: Седумте фази од фагоцитоза на бактерии.

се изразува пред сè преку процесот на фагоцитоза, кој најкусо прикажано, може да се подели во неколку фази (Слика 1.1):

- насочување на фагоцитите кон клетката цел, туѓиот агенс (феномен на локомоција) и прилепување до микробите;

- голтнување на микробите со фагоцитоза;

- создавање фагозом;

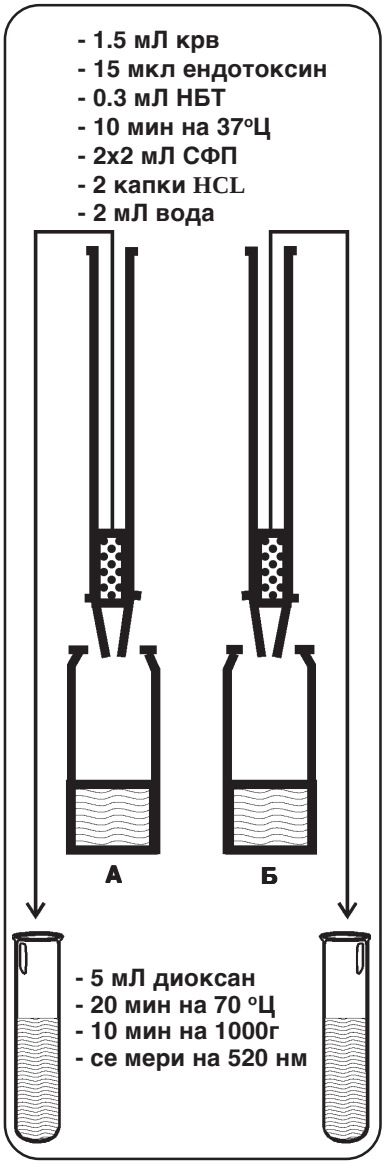
- соединување на фагозомот со лизозомот и создавање фаголизозом;

- дигестија на клетката цел (клеточно и биохемиско убивање) низ процесот на оксидативен метаболизам;

- создавање остаточно телце кое содржи неразграден материјал;

- исфрлање на остаточниот материјал.

При испитување на имунолошката функција на фагоцитите неопходно е да се постигне проценка во сите фази од процесот на фагоцитоза, за што денес постојат бројни лабораториски методи, а дел од нив овде ќе биде прикажан.



Слика 1.2: Шематски приказ на квантитативен нитроблу тетразолиум тест (НБТ) за испитување фагоцитната способност на имуните клетки.

1.2. Квалитативен НБТ тест

Во основа се определува редукцијата на НБТ преку супероксид анјон, кој се јавува како производ од активираната оксидација. Редуцираниот НБТ има карактеристика да се таложи во форма на црни зрнца од формазан. Постојат повеќе модификации на методот, но најкористени се цитохемиските кои го определуваат процентот на полиморфонуклеари или моноцити што содржат преципитирани зрнца од формазан. Оваа редукција не е специфична бидејќи НБТ може да го редуцираат и други редуктази независно од оксидативниот метаболизам. Сепак, овој тест е многу погоден за дијагноза на стекнати или вродени гранулопатии.

Може да се користи полна крв или веќе издвоени клетки. На 100 микролитри периферна крв се додава 100 микролитри раствор од НБТ (2 мг/мЛ), се инкубира 15 мин/37°Ц и потоа се врши стимулирање на фагоцитите со раствор од ендотоксин (15 мкг/мЛ), или суспензија од убиени бактерии или phorbol myristate acetate (50 - 100 нг/мЛ). Повторно се инкубира 15 мин на 37°Ц и се фиксира со формалдехид.Така се лизираат еритроцитите, а другите клетки со помош на цитоцентрифуга се поставуваат на предметно стаклење. Се врши спротивно обојување со fuchsine и микроскопски се определува процентот на клетките кои содржат преципитиран редуциран НБТ.

1.3. Квантитативен НБТ тест

Додавањето жолта НБТ боја во плазмата доведува до формирање НБТ-хепарин или НБТ-фибриноген комплекс што може да биде фагоцитиран од неутрофилот. Кај нормалните неутрофили може да се зголеми фагоцитната активност со додавање (стимулирање) ендотоксин. Овој

метод може да се употреби за да се измери степенот на стимулацијата на нестимулираните клетки или нивниот капацитет за фагоцитоза по стимулацијата. Стимулираните неутрофили го вградуваат комплексот на боја во фагозомите и по лизозомалната фузија, интрацелуларната редукција доведува до формирање сини нерастворливи кристали на формазан. Процентот на фагоцитните клетки може да биде определен со светлосен микроскоп, а вкупната редукција на бојата може да биде квантифицирана спектрофотометриски по диоксанската екстракција.

Потребно за изведување на вежбата:

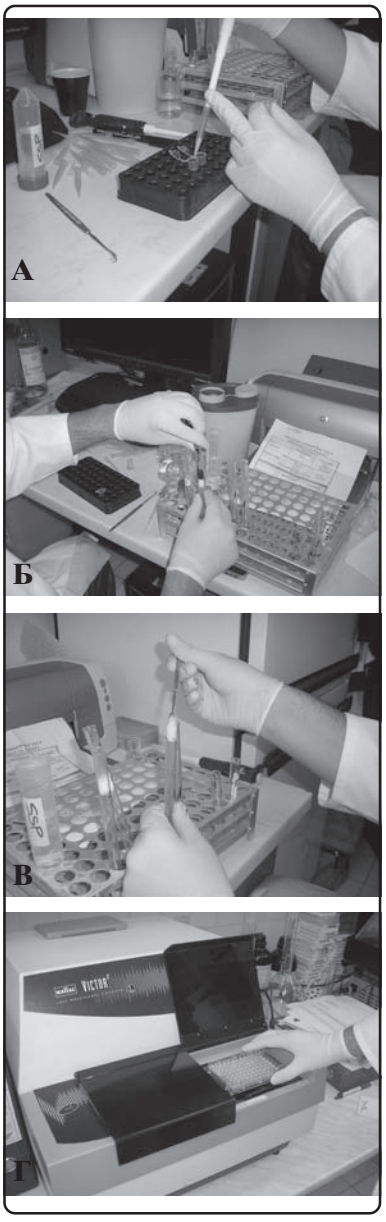
Се зема венска крв со хепарин (20 ИЕ/мЛ); дестилирана вода; солен фосфатен пуфер; ендотоксин од escherihia coli 1 мг/мЛ во СФП; 4 ммол НБТ во СФП кој содржи 340 ммол сахароза; диоксан; 0.1 мол HCl; најлонска волна 100 мг во силиконизирани пастерови пипети; водена бања на 37 и на 70° С; спектрофотометар; пастерови пипети или микроколони (НЕН); аскорбинска киселина.

Се приготвуваат следниве материјали:

- 340 ммол сахароза. Се мерат 11.62 г сахароза, се стават во колба од 100 мЛ, се додава дестилирана вода до 100 мЛ.
- Солен фосфатен пуфер- KH_2PO_4 0.20 г, Na_2HPO_4 1.44 г, KCl 0.20 г, NaCl 8.00 г, H_2O дестилирана до 1000 мЛ.
- 4 ммол НБТ во солен фосфатен пуфер во 340 ммол сахароза. Се мерат 11.628 г сахароза, 0.29 г НБТ, волуменот до 100 мЛ се дополнува со СФП.
- 0.1 мол HCl. Се земаат 0.83 мЛ од 37% HCl и се дополнува до 100 мЛ со дестилирана вода.
- 150 микромоли аскорбинска киселина = 26.4 мг.
- 0.1 мол NaOH со 24 ммол Na_2HCO_3. Се мерат 400 мг NaOH, се стават во колба од 100 мЛ, се додаваат 50 мЛ дестилирана вода за да се раствори натриум хидроксидот и во него се додаваат 0.201 г Na_2HCO_3 и се дополнува со дестилирана вода до 100 мЛ.
- 4 ммол НБТ во 340 ммол сахароза. Се мерат 3 мг НБТ и се стават 1 мЛ 340 ммол сахароза.
- Најлонска волна.

Најлонската волна се вари во дестилирана вода и водата се менува најмалку три пати, потоа се расчешлува и се суши на собна температура. Се мерат 100 мг и се внесуваат во пастерови пипети или во микроколони (НЕН) на чие дно се наоѓа филтер диск или мало количество стаклена волна. Функцијата на најлонската волна е да ги задржи фагоцитните клетки, кои имаат способност за прилепување (атхеренција) за влакната од најлонска волна.

Пожелно е да се користат пластични епруветки, но до колку се работи со стаклени садови, тие треба да се силиконизираат за да се спречи атхеренцијата на клетките за нивниот ѕид. Треба да се земе предвид дека и неутрофилите и моноцитите имаат способност за голтнување (ингестија) на НБТ со фагоцитоза. Факторот за конверзија за пресметување моли од формазан според коефициентот на



Слика 1.3: Стапките за изведување на квантитативниот нитроблу тетразолиум тест (НБТ) за испитување фагоцитната способност на имуните клетки. А, ставање крв во две епруветки (лево нестимулирана, десно стимулирана). Б, Нанесување крв врз најлонска волна. В, Префрлање на најлонската волна во епруветки со диоксан за нивна екстракција. Г, колориметриско определување интензитетот на создадениот формазан.

екстинција мора да биде пресметуван за секое шишенце боја, по хемиската редукција, опишана подолу.

Тестот се извршува на следниов начин (слика 2):

1. Се зема венска крв со хепарин (20 ИЕ/мЛ) и од неа треба да се направи диференцијална крвна слика.
2. Се додаваат 15 мкЛ ендотоксински раствор (1 мг/мЛ во СФП) на 1.5 мЛ крв за стимулација (А) или 15 мкЛ физиолошки раствор како контрола (Б) и се инкубира на 37°Ц, 10 мин.
3. Се додава 0.3 мЛ свежо подготвен раствор на НБТ и внимателно се меша.
4. Се додава целата крв капка по капка во најлонските колони.
5. Откако крвта ќе навлезе во волната, се мие два пати со 2 мЛ СФП, а потоа со 2 мЛ дестилирана вода. Дестилираната вода ќе ги лизира црвените крвни зрнца.
6. Се додаваат по две капки 0.1 N HCl за да се прекине натамошната редукција на внатреклеточната (интрацелуларната) боја и потоа се мие со 2 мЛ дестилирана вода.
7. Се отстранува волната со еза (или игла за плетење) и се става во 5 мЛ диоксан (во стаклен сад).
8. Се инкубира на 70°Ц со повремено појако тресење додека најлонската волна не си ја врати белата боја (стои околу 20 мин).
9. Се центрифугира диоксанскиот екстракт за да се отстрани преципитатот или најлонските нишки (1000 г, 10 мин на собна температура).
10. Се мери екстинцијата на 520 нм со спектрофотометар (како слепа проба се користи диоксан).

Екстинциониот коефициент за секое шишенце НБТ се определува на следниов начин:

1. Се додаваат 150 мкмол аскорбинска киселина (26.4 мг супстанција) на 0.2 мЛ НБТ раствор (4 ммол во сахароза) и се меша.
2. Се додава 2.0 мЛ 0.1 М натриум хидроксид со натриум бикарбонат.
3. Се инкубира 10 мин на собна температура и се додаваат 5 мЛ дестилирана вода.
4. Се центрифугира на 1000 г, 15 мин на собна температура.
5. Се плакне еднаш со вода и со центрифугирање како во точка 4. Се отстранува супернатантот и се ресуспендира синиот нерастворен формазански преципитат во 10 мЛ диоксан.
6. Се раствора 1 мЛ од суспензијата во 9.0 мЛ диоксан и се инкубира на 70°Ц, 20 минути.
7. Се лади до собна температура и се мери екстинцијата на 520 нм со спектрофотометар користејќи диоксан како слепа проба.
8. Се пресметува факторот на конверзија од вредноста на екстинцијата. Грубо овој фактор треба да биде околу:

1 екстинциона единица = 40 нмол формазан

Прикажување и толкување на резултатите (Табела 1):

1. Користејќи го факторот на конверзија, се одредува бројот на моли на формазан екстрахирани од нестимулираната и стимулираната крв со ендотоксин.

2. Се пресметува бројот на потенцијални фагоцити (% на апсолутниот број се должи на неутрофили и моноцити).

3. Резултатите се изразуваат како фемтомоли (10^{-15}M) на формазан по еден фагоцит. Нормално растојание за нетретирана крв е до 129 фемтомоли формазан за секој фагоцит. Нормални граници за стимулирана крв се до 290 фемтомоли формазан по фагоцит.

За да се пресметаат овие вредности неопходни се диференцијална формула и број на бели крвни клетки во 1 мЛ крв.

1.4. Задача

Извади крв од вена од колешка или колега и изведи квантитативен НБТ тест со нестимулирана и стимулирана крв и пресметај ги вредностите во Табела 1.1.

1. Со помош на колориметар се мери интензитетот на

Табела 1.1: Формулар за пресметување НБТ.

	Пример		Случај	
	нестимулирана	**стимулирана**	**нестимулирана**	**стимулирана**
Отклон на скалата на колориметарот	0.18 (0.01=1ЕЕ)	0.4 (0.01=1ЕЕ)		
Измерени ЕЕ	18	40		
Фактор на конверзија (1ЕЕ)	40 нмол формазан	40 нмол формазан		
Вкупно создаден формазан во 1.5 мЛ крв	720 нмол (18x40)	1600 нМ формазан (40x40)		
Вкупно создаден формазан во 1 мЛ крв	480 нмол формазан	1066.7 нмоли формазан		
Број на бели клетки во 1 мм3	6000			
Број на бели клетки во 1 мЛ	6000000 (6000x1000)			
Број на фагоците во 1 мЛ крв (Не+Мо)	60% (55%+5%) од 6000000 = 3600000			
Создаден формазан на еден фагоцит	0.0001333 нМ формазан/ фагоцит (133.3 фемтомоли/фагоцит)	0.0002963 нМ формазан/фагоцит (296.3 фемтомоли/фагоцит)		

обојување на стимулираната и нестимулираната епрувета.

2. Измерениот отклон се претвора во екстинциони единици. На пример, доколку за стимулираната епрувета отклонот на колориметарот е 0.4, тоа значи дека има 40 екстинциони единици (1ЕЕ има отклон на колориметарот од 0.01).

3. Екстинционите единици се претвораат во наномоли на формазан. Имено 1 ЕЕ одговара на 40 наномоли на формазан. Во нашиот пример 40 ЕЕ ќе одговарат на 1600 наномоли на формазан (40 ЕЕ x 40 наномоли формазан = 1600 наномоли формазан).

4. Се пресметува создадениот формазан во еден мililитар крв. Пресметаните 1600 наномоли формазан одговараат на 1.5 мЛ крв. Со помош на просто тројно правило ќе најдеме колку наномоли на формазан има во 1 мЛ крв. Во нашиот пример, во 1 мЛ стимулирана крв ќе има 1066.7 наномоли формазан.

5. Се бројат белите клетки и се дотерува нивниот број во 1 мЛ крв. На пример, нека со помош на Шилинговата или Нојбауеровата комора во 1 мм^3 се избројани 6000 бели клетки. Тоа значи дека во нашиот 1 мililитар крв ќе има 6000000 бели клетки.

6. Се бројат фагоцитите во еден мililитар крв. Не се фагоцити сите 6000000 бели клетки. Фагоцити во крвта се само неутрофилите и моноцитите. Така, ако со леукоцитарната формула утврдиме дека во нашиот 1 мililитар крв има 55% неутрофили и 5% моноцити, тоа значи дека од нашите 6000000 бели клетки само 3600000 се фагоцити.

7. Се пресметува создадениот формазан на еден фагоцит. Во нашиот пример имаме 1 мililитар крв во кој има 3600000 фагоцити кои создале 1600 наномоли на формазан. За да утврдиме колку формазан создал 1 фагоцит треба вкупната количина на создаден формазан да ја поделиме со бројот на фагоцити (1600 нмоли формазан / 3600000 фагоцити). На тој начин добиваме дека еден фагоцит создал 0.0002963 наномоли формазан. Доколку наномолите ги претвориме во фемтомоли, ќе добиеме дека еден фагоцит создал 296.3 фемтомоли на формазан.

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата	Студент (име и презиме)	Асистент (потпис и печат)
_____	_____	_____

ВЕЖБА 2: ИСПИТУВАЊЕ ХУМОРАЛЕН ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ

2.1. Протеини на акутна фаза (ПАФ)

Првата реакција во организмот кон имунолошкиот стрес (или првата имунолошка реакција) е вродениот, неспецифичен одговор кој му претходи на стекнатиот имун одговор. Акутно фазниот одговор е значајна системска реакција на организмот кон локалните или системските нарушувања на хомеостазата предизвикани од инфекција, ткивно оштетување, неопластичен (малигнен) раст или имунолошки нарушувања.

На местото на навлегување на микроорганизмите и на местото на ткивното оштетување започнуваат серија од одговори на самото ткиво. Се ослободуваат воспалителни цитокини и се активираат васкуларниот систем и имуните клетки. Ваквите реакции предизвикуваат лачење на уште повеќе цитокини и други воспалители медијатори кои минуваат низ меѓуклеткините простори, навлегуваат во крвта и циркулираат низ неа.

2.1.1. Акутно фазен одговор

Акутно фазните промени можат да се поделат како промени во концентрацијата на многу плазмини протеини, познати како протеини на акутна фаза (ПАФ) (Табела 2.1) и во голем број промени во однесувањето, физиолошките процеси, биохемиските реакции и исхраната (Табела 2.2).

Како ***протеин на акутна фаза се дефинира оној протеин чија концентрација се менува (позитивно или негативно) за време на воспалителното заболување***. Промените во концентрацијата на протеините се најмногу зависни од синтетизирањето во црниот дроб. Големината на промените варира од околу 50% кај церулоплазминот и комплементните протеини до над 1000 пати во случаите на Ц-реактивниот протеин и серумскиот амилоид А (плазмин претходник на амилоид А кој создава вторични складишта во ткивата) (Слика 2.1).

Табела 2.1: Човекови протеини на акутна фаза (ПАФ).

Протеини чија што плазматски концентрација се зголемува (позитивни ПАФ)

Главни ПАФ:
- Ц-реактивен протеин
- Алфа1 кисел гликопротеин
- Серумски амилоид А

Комплементен систем:
- К3
- К4
- К9
- Фактор Б
- Ц1 инхибитор
- Ц4б врзувачки протеин
- Маноза врзувачки протеин

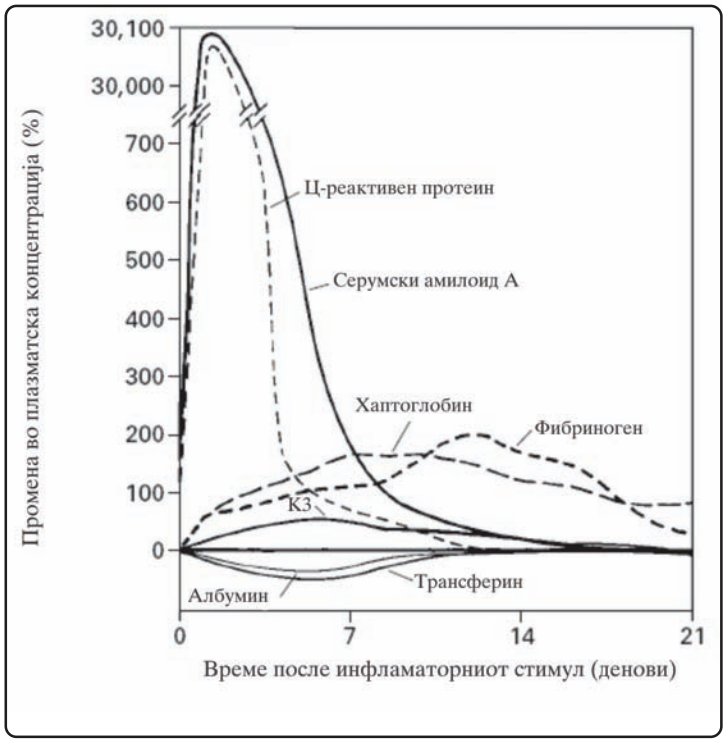
Сосирувачки и фибринолитичен систем:
- Фибриноген
- Плазминоген
- Ткивен плазминогенски активатор
- Урокиназа
- Протеин С
- Витронектин
- Плазминоген-активаторски инхибитор 1

Антипротеази:
- Алфа1 протеазен инхибитор
- Алфа1 антихимотрипсин
- Панкреатичен секреторен трипсински инхибитор

Транспортни протеини:
- Церулоплазмин
- Хаптоглобин
- Хемопексин

Учесници во воспалителен одговор:
- Излачена фосфолипаза А2
- Липополисахарид врзувачки протеин
- Интерлеукин 1 рецепторски антагонист
- Гранулоцитен колонии стимулирачки фактор

Протеини чија што плазматскиа концентрација се намалува (негативни ПАФ):
- Албумин
- Трансферин
- Транстиретин
- алфа2-хуман серум гликопротеин
- Алфа фетопротеин
- Тироксин врзувачки глобулин
- Инсулиновиден фактор за раст 1
- Фактор 12



Слика 2.1: Карактеристичен облик на промени во плазминиште концентрации на некои протеини на акутна фаза после лесно воспаление.

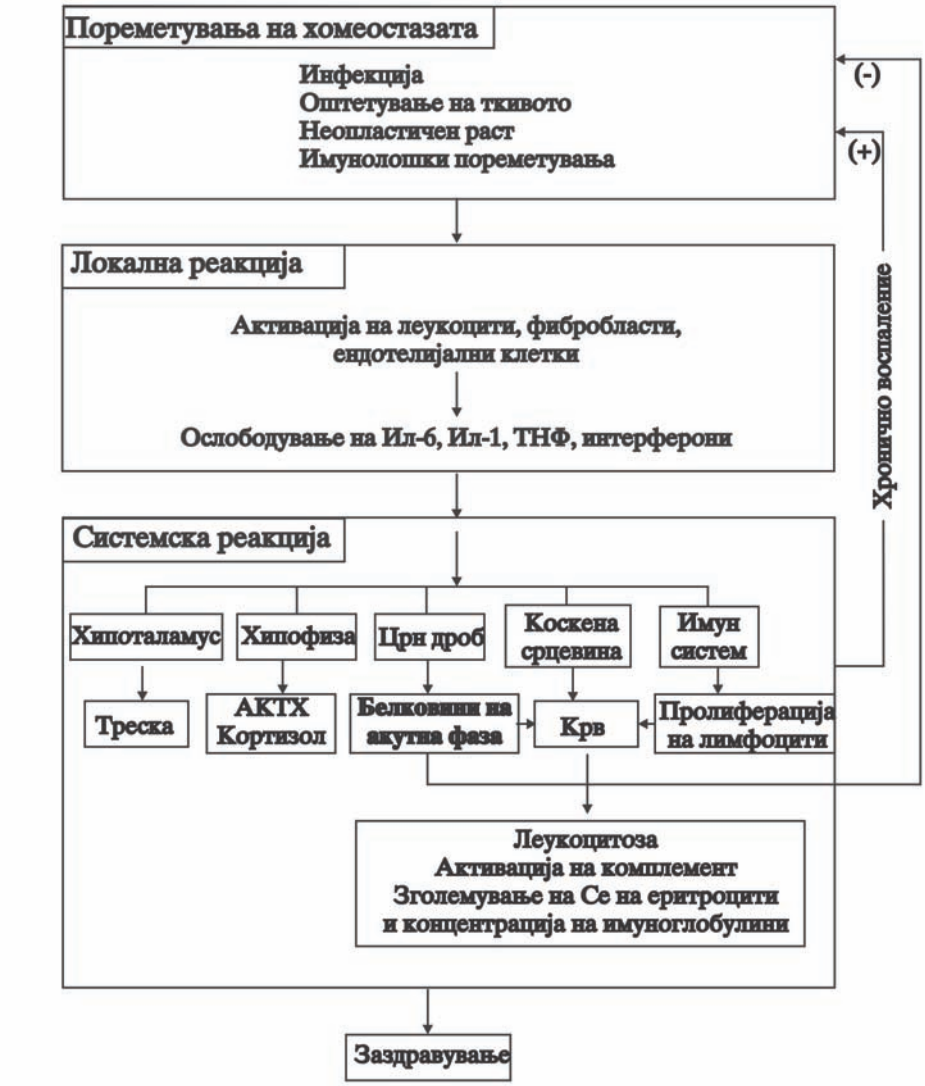
Најчестите состојби кои доведуваат до ***значајни промени*** во концентрацијата на протеините на акутна фаза во плазмата се: инфекцијата, траумата, операцијата, изгорениците, ткивниот инфаркт, различни имунолошки остварени и воспалителни состојби поттикнати со кристали и напреднатиот малигнен процес (канцер). ***Умерени промени*** настануваат после: интензивно вежбање, топлотен удар и породување. ***Мали промени*** настануваат после психолошки стрес и неколку психијатриски заболувања.

Иако концентрацијата на скоро сите протеини на акутна фаза се зголемува истовремено, нивниот пораст не е униформен кај сите пациенти со иста болест. Затоа, фебрилните пациенти можат да имаат нормална концентрација на Ц-реактивен протеин, но да имаат промени во други компоненти од протеините на акутната фаза. Индивидуалната разлика во регулирањето концентрацијата на протеините на акутна фаза сугерира дека кај секоја единка има лачење на различни цитокини во различни концентрации во различни патолошки состојби.

2.1.2. Регулација на акутно фазните промени

Акутно фазниот одговор е реакција на организмот кон ***нарушувањето на хомеостазата*** (внатрешната средина) предизвикана од инфекција, ткивно оштетување, малигнен раст или имунолошко нарушување (Слика 2.2).

Акутно фазниот одговор се состои од ***локална реакција*** на местото на оштетувањето карактеризирано со бројни



Слика 2.2: Стаиките на акутно фазниот одговор во организмот.

реакции, како што се слепување (агрегација) на крвните плочки (тромбоцити), создавање сосирок (коагулум), проширување и пропусливост на крвните садови, како и насобирање и активација на еднојадрени клетки (гранулоцити, моноцити) кои ослободуваат цитокини. Дополнително, активираните фибробласти и ендотелни клетки се оспособени да лачат цитокини. Овие медијатори дејствуваат врз специфичните рецептори од различни целни клетки доведувајќи до ***системска реакција*** обележена со треска, зголемен број бели клетки (леукоцитоза), зголемена седиментација на црвените клетки, зголемено лачење адрено кортикотропен хормон (АКТХ) и гликокортикоиди, активација на комплементната и сосирувачката скала (каскада), смалено ниво на железо и цинк во плазма, негативна азотна рамнотежа и драматични промени во

концентрацијата на некои плазматски протеини. Овие протеини се нарчуваат ***акутно фазни протеини*** (Слика 2.2).

Крајната цел на протеините од акутната фаза е да се отстранат нарушувањата на хомеостазата и да се воспостави здрава одбрамбена функција во организмот, што се дефинира како негативна повратна спрега или целосно возобновување. Неможноста да се отстранат нарушувањата во хомеостазата доведуваат до позитивна повратна спрега, односно хронично воспаление (десно на Слика 2.2).

Табела 2.2: Видливи промени кај луѓето при акутно фазен одговор.

Невроендокрини промени:
Треска, поспаност и губиток на апетит.
Зголемено лачење кортикотропен ослободувачки фактор, котрикоторопин (АКТХ) и кортизол.
Зголемено лачење аргинин вазопресин.
Зголемено надбубрежно лачење катехоламини.

Хематопоетски промени:
Слабокрвност (анемија) од долготрајна болест.
Зголемени бели клетки (леукоцитоза).
Зголемени крвни плочки (тромбоцитоза).

Метаболни промени:
Губиток на мускули и негативен азотен биланс.
Смалена глуконеогенеза.
Остеопороза.
Зголемено создавање масти во црн дроб.
Зголемена липолиза во масното ткиво.
Смалена липопротеин липазна активност во мускулите во масното ткиво.
Кахексија.

Црнодробни промени:
Зголемен металотионеин, индуцирана азотен оксид синтетаза, хем оксигеназа, манган супероксид дизмутаза и ткивен инхибитор на металопротеиназа-1.
Смалена активност на фосфоенолпируват карбоксилаза.

Промени во непротеинските делови од плазмата:
Хипоцинкемија, хипоферемија, хиперкупремија.
Зголемена плазма концентрација на ретинол и глутатион.

2.1.2.1. Индукција на протеините од акутна фаза со цитокини и други сигнални молекули

Цитокините се внатреклеточни сигнални полипептиди кои ги создаваат активираните клетки. Повеќето цитокини произлегуваат од повеќе клетки, влијаат на повеќе целни клетки и имаат повеќекратни дејства. Цитокините кои се создаваат за време на воспалението и учествуваат во воспалителните процеси, се главните стимулатори на протеините на акутната фаза. Во воспалително асоцираните цитокини спаѓаат интерлеукин-6, интерлеукин-1бета, тумор некрозниот фактор алфа, интерферонот-гама, трансформниот фактор за раст-бета, и веројатно интерлеукин-8. Тие се создаваат од различни видови клетки, но нивен најважен извор се макрофагите и моноцитите на местото на воспалението.

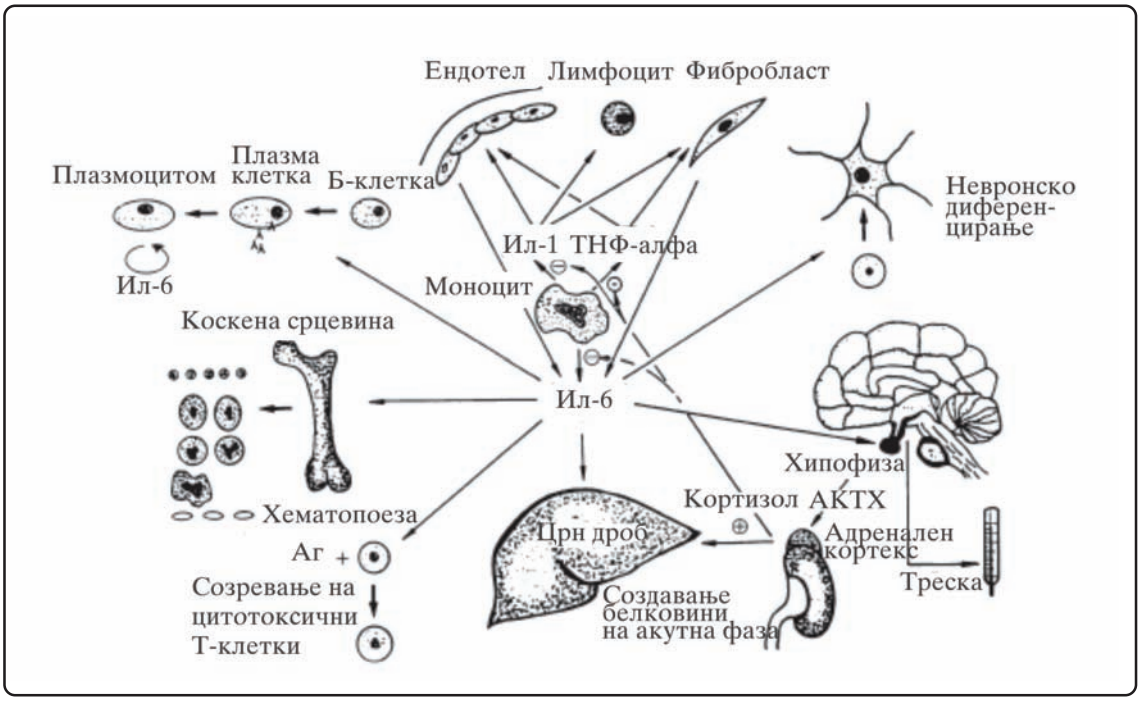
Интерлеукин 6 (ИЛ-6) е главниот стимулатор на создавањето на повеќето акутно фазни протеини, додека другите цитокини имаат влијание на одделни подгрупи од акутно фазните протеини. Покрај неговиот ефект врз црнодробните клетки, ИЛ-6 дејствува и врз неколку други целни клетки (Слика 2.3).

Цитокините дејствуваат и како скала (каскада) и како мрежа во поттикнувачкото дејство за создавање протеини на акутна фаза. Многу цитокини можат да го регулираат создавањето на други цитокини и цитокински рецептори. На пример, тумор некрозниот фактор-алфа е главниот поттикнувач во создавањето интерлеукин-1 кај пациенти со ревматоиден артрит (ревматско воспаление на зглобовите), а интерлеукин-1бета може да го зголеми или да го намали создавањето на сопствените рецептори.

Освен тоа, цитокините се делови од една комплексна сигнална мрежа. Клетките многу ретко се изложени само кон еден цитокин. Најчесто клетките се изложени кон комбинација од цитокини со различни биолошки дејства. Ефектите на цитокините врз целните клетки можат да бидат инхибирани или стимулирани со други цитокини, со хормони, со цитокински рецепторски антагонисти и со циркулирачки рецептори. Комбинациите од цитокините можат да имаат адидтивни, инхибиторни или синергистички ефекти.

Експресијата на гените за акутно фазните протеини главно се регулира на транскрипциско ниво, но учествуваат и пост-транскрипциските механизми. Пост-транслациските

промени во гликозилацијата на плазматските протеини за време на воспалителниот одговор вклучува оштетување на олигосахаридните гранки, зголемено сијалирање на орозомукоидот и смалена галактозилација на ИгГ. Промените во олигосахаридните гранки се поттикнуваат од воспалителните цитокини, независно од нивните ефекти врз создавањето акутно фазни протеини. Конечно, ефикасноста на лачење Ц-реактивен протеин (ЦРП), процес различен од неговата синтеза, значително се зголемува за време на акутно фазниот одговор.

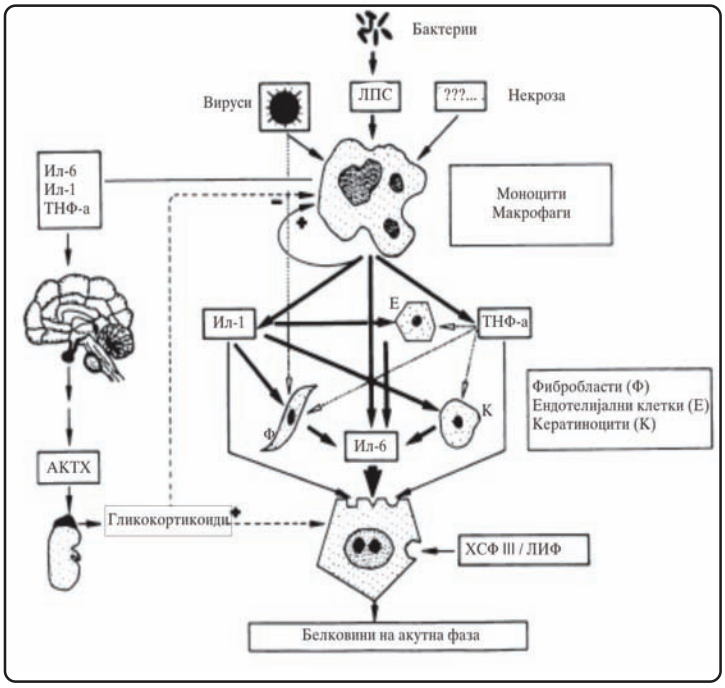


Слика 2.3: Плеотропните (повеќекратните) дејства на интерлеукин-6 во акутно фазниот одговор.

2.1.2.2. Регулација на другите акутно фазни промени со воспалително асоцираните цитокини

Треската е израз на невроендокрините промени кои го обележуваат акутно фазниот протеински одговор. Иако можат неколку цитокини да поттикнат треска, создадениот интерлеукин-6 во мозочното стебло е неопходен за крајните стапки кои предизвикуваат треска. Меѓутоа, цитокините не се единствените поттикнувачи на трескатa. Најновите наоди дека субдијафрагматската ваготомија ја блокира трескатa предизвикана од внатреперитонеална (но не и внатремускулна) инјекција од липополисахариди укажува на неурален пренос на фебрилниот одговор. Другите невроендокрини промени се однесуваат на комплексните соодноси помеѓу цитокините, хипоталамо-хипофизно-надбубрежната оска и други делови од невроендокриниот систем. На пример, воспалителните цитокини го стимулираат создавањето кортикотропин ослободувачки фактор со последователно зголемено лачење на адрено кортикотропен хормон (АКТХ) и кортизол и директна стимулација на надбубрежната жлезда. Зголеменото лачење аргинин

вазопресин под дејство на интерлеукин-6 ја објаснува хипонатриемијата која се јавува после некои воспалителни заболувања (Слика 2.4).



Слика 2.4: Регулација на црнодробната синтеза на акутно фазните протеини со воспалителните медијатори.

Промените во однесувањето се често пати присутни во воспалението, вклучувајќи го губењето апетит (анорексија), поспаност (сомноленција), и слабост (летаргија) и можат да бидат поттикнати со цитокините.

2.1.3. Функции на акутно фазниот одговор

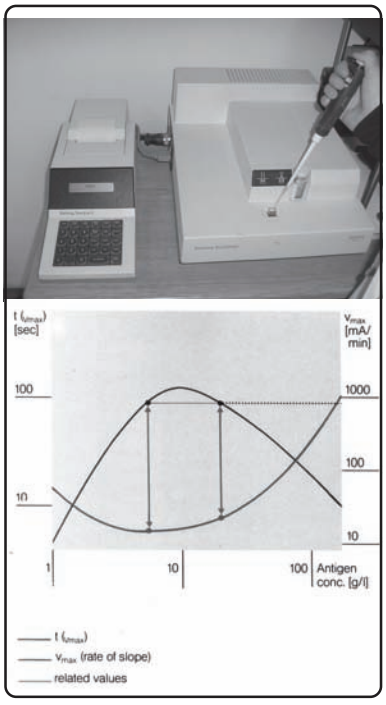
Воспалението е комплексен, високо оркестриран процес во кој се вклучени многу видови клетки и молекули, од кои едни започнуваат, засилуваат или одржуваат процеси, други го спречуваат, а трети овозможуваат процесот да се возобнови.

Многу од акутно фазните протеини имаат потенцијал да влијаат врз еден или врз повеќе од стапките на воспаление. Главната функција на Ц-реактивниот протеин, дел од вродениот хуморален имун систем, е неговата способност да го врзе фосфохолинот и на тој начин да препознае некои туѓи предизвикувачи како и фосфолипидните структури од оштетените клетки. Ц-реактивниот протеин може да го активира комплементниот систем ако се врзе за некој од неговите лиганди, како и да се врзе за фагоцитните клетки што се објаснува со неговиот истовремен ефект врз отстранувањето на целните клетки и преку хуморалните и преку клеточните имуни системи.

Серумскиот амилоид А е составен од фамилија аполипопротеини кои брзо се врзуваат за липопротеините со висока густина (HDL) после нивното синтетизирање и влијаат врз холестеролскиот метаболизам за време на воспалението. Серумскиот амилоид А предизвикува прилепување (адхезија) и хемотаксија на фагоцитните клетки и на лимфоцитите и може да придонесе до воспаление на атеросклеротичните коронарни артерии со зголемување оксидацијата на липопротеините со ниска густина (LDL).

Неколку акутно фазни протеини започнуваат или одржуваат воспаление. Класичните комплементни компоненти, од кои поголемиот дел се акутно фазни протеини, имаат централна проинфламаторна улога во имунитетот, како што има маноза врзувачкиот протеин. Комплементната активација доведува до хемотаксија, цедење на плазминте протеини во воспаленото место, и опсонизација на воспалнителните предизвикувачи и оштетените клетки.

Спротивно, други акутно фазни протеини можат да прикажат противвоспалително дејство. На пример, антиоксидансите хаптоглобин и хемопексин го штитат организмот од реактивниот кислород. Алфа1-протеазниот инхибитор и алфа1-антихимотрипсинот ја спречуваат активноста на протеолитичките ензими. Лекувањето на раната го овозможува фибриногенот преку прилепување на ендотелните клетки, расејка, разраснување и репарација на ткивата, додека хаптоглобинот помага во возобновувањето на ткивата со стимулирање на ангиогенезата (создавање нови крвни садови).



Слика 2.5: Турбидиметар (Турбитајмер) од фирмата Беринг (горе) и максимална брзина на реакција и реакционо време зависно од концентрацијата на противгеноt (долу).

2.2. Определување концентрација на акутно фазни протеини со имунотурбидиметрија

2.2.1. Принципи на имунотурбидиметрија

Протеините на акутна фаза во телесните течности се мерат со повеќе методи, од кои кај нас се користи имунотурбидиметријата со апаратот турбитајмер (Слика 2.5, горе). Мерниот систем на турбидиметријата базира на принципите на кинетичка турбидиметрија. Турбитајмерот мери истовремено два параметри:

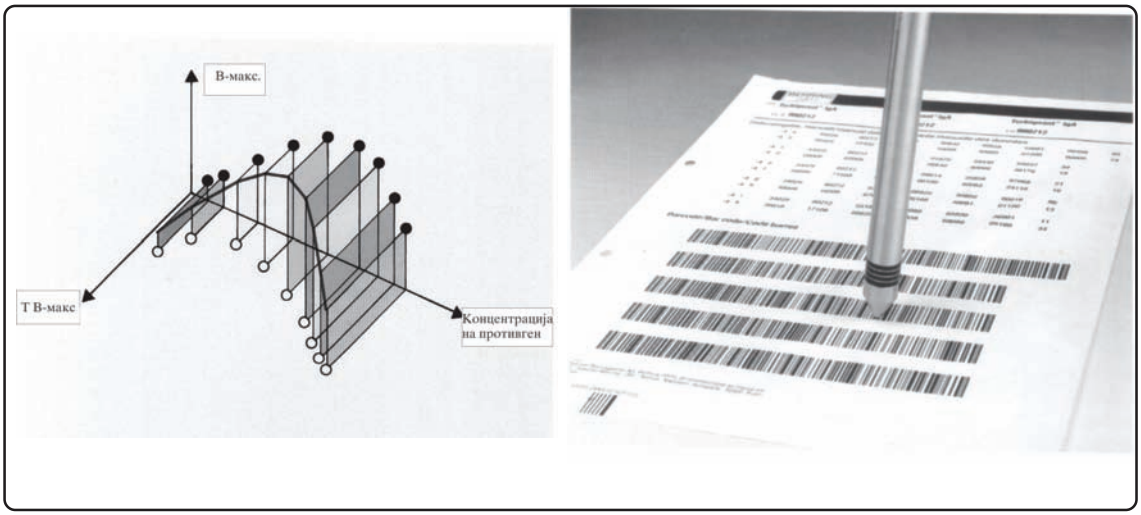
1. брзината на максимална реакција (Vmax) на создадениот талог; и
2. времето потребно да се постигне Vmax (tVmax) (Табела 2.3).

Ако се постават овие вредности наспроти концентрацијата, се добива графикон како на Слика 2.5.

Слика 2.5 (долу) покажува дека, ако се земат одделно, ниту

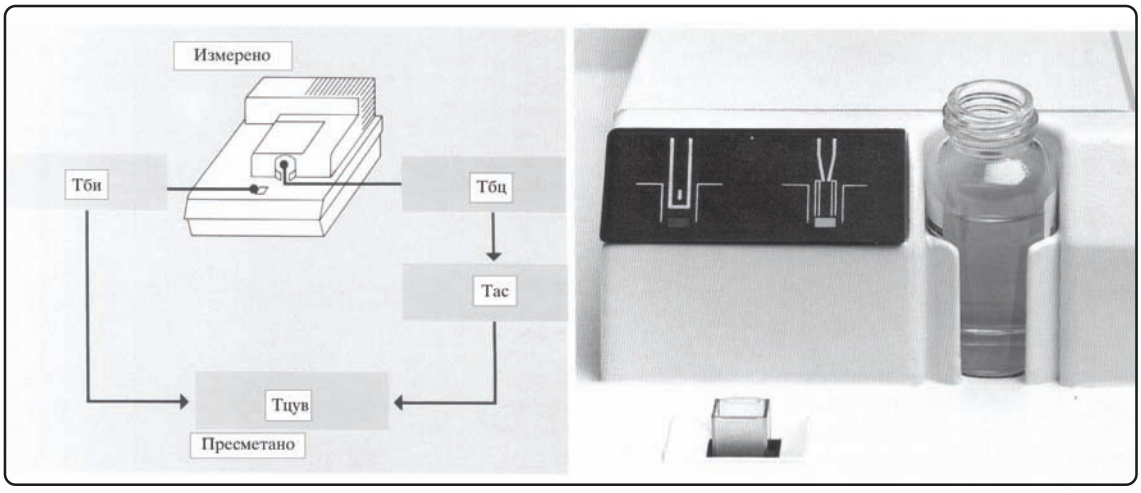
Табела 2.3: Максимална брзина на реакција и реакционо време за реакцијата ИгГ/противИгГ.

Концентрација на противген во г/Л	Максимална брзина на реакцијата (V_{max}) во мА/мин	Реакциско време (t_{vmax}) во секунди
2.1	22	20.5
5.2	256	7.1
8.7	917	5.1
22.6	920	8.2
73.4	357	29.2
143.5	76	80.0



Слика 2.6: Тридимензионална калибрациска крива за имунотурбидиметрија (лево). Читање калибрациска крива за имунотурбидиметрија од линиски код (десно).

кривата за Vmax ниту за tVmax се прецизни (недвојбени). Меѓутоа, ако се земат двата сигнали заедно, јасно е дека само една вредност може да се добие врз основа на двете измерени криви со Турбитајмерот. Составот на реагенсите гарантира дека двете криви се комплементарни една на друга. Мерењата се извршуваат на бранова должина од 340 нм (нанометри). Мерењето на кратките бранови овозможува да се откријат мали концентрации од противген/противтело комплекси, кои се формираат само неколку секунди после мешањето на реагенсот и примерокот. Светлосниот сноп се создава во ксенонски извор и се пренесува со двоканална кварцна фибро оптика. Светлосниот сноп кој навлегува во киветата се регистрира секои 0.1 секунда и се анализира со прецизна комбинација од софтвер и хардвер.



Слика 2.7: Определување темпера-турата (лево), температурната компензација започнува кога ќе се внесе шишенцето со реагенс (десно).

2.2.2. Калибрација

За системот на Турбитајмер не е неопходно да се направи калибрациската крива од корисникот, ниту да се направи калибрација со мерење на една точка. Реакциските параметри Vmax и tVmax за определена концентрација се

мерат на различни температури (+18°Ц до +32°Ц) за време на калибрацискатa постапка. Параметрите Vmax, tVmax и концентрацијата се прикажуваат во еден графикон, кој создава тридимензионална крива (Слика 2.6, лево). Оваа крива не дозволува непрецизни (двојбени) резултати кои се добиваат од Хајделбергер-Кендаловата (Heidelberger-Kendall) крива.

Калибрациските криви се утврдуваат за секој реагенс и број на лотот (прозводствен број). Тие криви се претвораат во линиски код (баркод) кои се печатат и се внесуваат со секој реагенс. Тие треба да бидат прочитани само еднаш за секој реагенс и број на лотот (Слика 2.6, десно).

2.2.3. Систем за температурна компензација

Кинетското мерење на имунопреципитацискатa реакција зависи од температурата. Турбитајмерот користи нова техника за да се избегне периодот на загревање. Тоа се постигнува со автоматско мерење на температурата во реакциската смеса (Слика 2.7). Врз основа на оваа постапка калибрациската крива математички се корегира за реално измерената температура. Температурата на носачот на киветата ($T_{БИ}$) и на шишето со реагенс ($T_{Б0}$) се мерат директно, додека $T_{БИ}$ ја дава собната температура. Реагенсната температура ($T_{АС}$) се пресметува од $T_{Б0}$. Мерењето температура започнува кога ќе се стави шишето со Турбиквант реагенс. Апаратот прифаќа температурна варијација помеѓу +18 и +32°Ц.

2.2.4. Процедура

1. Се внесува шишето Турбиквант во просторот за реагенси. Процесот на температурна компензација започнува веднаш (Слика 2.8).

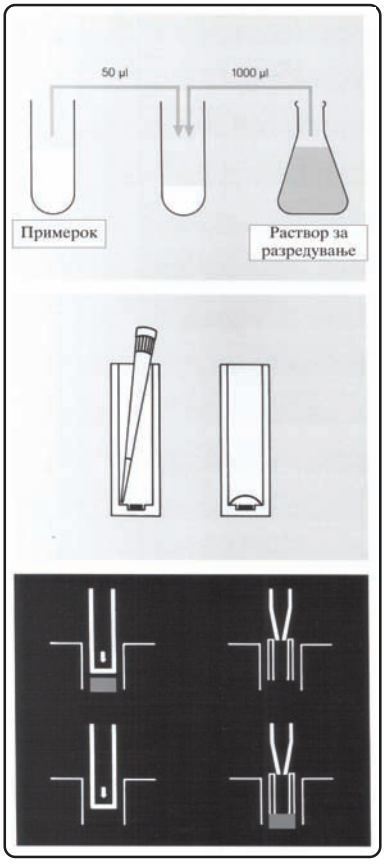
2. Се приготува разредување на примерокот зависно која белковина на акутна фаза или имуноглобулин мериме (Табела 2.4).

3. Се пипетираат 50 мкЛ од претходно разредениот примерок во киветата од Турбитајмерот.

4. Се внесува киветата во инструментот.

5. Се пипетираат 50 мкЛ од реагенсот. Мешањето на реагенсот и примерокот, како и мерењето и печатењето на резултатите се остварува автоматски без интервенција на корисникот. Додека е мерењето во тек (околу 30 сек), се приготвува следниот примерок.

6. Измерените резултати се внесуваат во Табела 2.5.



Слика 2.8: Шематски приказ за имунотурбидиметриско определување на акутно фазни протеини.

Табела 2.4: Протоколи за турбидиметриско мерење белковини на акутна фаза.

Тест број	Име на протеинот	Разредување на примерокот	Волумен од примерокот
1	ИгГ	1:21	20
2	ИгА	1:21	50
3	ИгМ	1:21	200
4	Ц3ц	1:21	50
5	Ц4	1:21	200
6	Трансферин	1:21	50
7	Албумин/серум	1:21	50
10	Хаптоглобин	1:21	50
11	Алфа1 кисел гликопротеин	1:21	50
20	ЦРП	неразреден	50
27	Албумин/урина	неразреден	50
30	Апо А1	1:21	50
31	АпоБ	1:21	50
41	Антитромбин 3	неразреден	50
60	Миоглобин	неразреден	50
61	ИгГ/ЦСТ	неразреден	100
67	Албумин/ЦСТ	неразреден	50

2.3. Задача

Измери концентрација на некој од протеините на акутна фаза со имунотурбидиметар и внеси ја добиената вредност во Табела 2.5.

Табела 2.5: Внесување резултати од турбидиметриско мерење белковини на акутна фаза.

Протеин на акутна фаза	Разредување на примерокот	Волумен на примерокот	Плазматска концентрација во мг/Л
Трансферин			
Албумин			
Хаптоглобин			
Алфа-1 кисел гликопротеин			
Ц-реактивен протеин			
Апо А1			
Апо Б			
Антитромбин-3			
К4			

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

ВЕЖБА 3: АНАЛИЗА НА ВРОДЕН ИМУН СИСТЕМ

3.1. Толкување резултати од вроден имун систем

3.1.1. Нормални вредности од испитување клеточен вроден имун систем

Секоја лабораторија има свои нормални вредности и ги искажува на различен начин. Најчесто резултатите се искажуваат квалитативно во проценти. Тоа значи 50% НБТ би значело дека 50% од фагоцитните клетки на обоен препарат од периферна крвна слика од испитаникот има сини обојувања во цитоплазмата од фагоцитите, односно има позитивни фагоцитни клетки. Поретко, резултатите се искажуваат како квантитативни вредности или како нано моли создаден формазан во мЛ крв, или како фемтомоли создаден формазан во еден фагоцит. Ние пресметуваме во фемтомоли создаден формазан во еден фагоцит.

Нормалните вредности за НБТ тестот во нашата лабораторија изнесуваат за:

Нестимулиран примерок = 124 фемтомоли/фагоцит;

Стимулиран примерок = 293 фемтомоли/фагоцит.

Иако НБТ тестот се користи за повеќе намени, сепак најзначајната примена има во откривањето на болеста хронична грануломатозна болест (ХГБ). Дијагнозата на ХГБ може да се постави како ***најверојатна дијагноза за ХГБ*** или како ***конечна дијагноза за ХГБ***.

Најверојатна дијагноза за ХГБ: Пациент или пациентка со неправилен (абнормален) НБТ тест или респираторен колапс во активираните неутрофили (помалку од 5 % од контролата) кој има едно од следниве:

1) Хронична инфекција (во хепар; перириктален или белодробен абсцес; аденитис или остеомиелитис) предизвикана од стафилококи;

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Хронична грануломатозна болест:
Случајот на Даме Видоевски, блиску до смртта од ретки бактерии и габички.

2) Дифузен гранулом во респираторен, гастроинтестинален или урогенитален тракт;

3) Неуспех (застој) во развојот и хепатоспленомегалија или лимфаденопатија.

Конечна (завршна) дијагноза за ХГБ: Пациент или пациентка со неправилен (абнормален) НБТ тест или респираторен колапс во активираните неутрофили (помалку од 5 % од контролата) кој има едно од следниве:

1) Мутација во *gp91, p22*, или *p67 phox;*

2) Отсуство на мРНК за еден од горенаведените гени со Northern blot анализа;

3) Роднини од мајката, вујковци или внуци со абнормален НБТ тест или респираторен колапс.

Дијагностичка вредност на НБТ тестот: Бидејќи долна граница на ХГБ изнесува 5% од вредноста кај здравите и за најверојатната дијагноза и за конечната дијагноза за ХГБ, тоа значи дека од 0 до 5% релативен однос кај квалитативниот тест, како и 0 до 6.2 фемтомоли/фагоцити кај нестимулиран НБТ или 0 до 15 фемтомоли/фагоцити кај стимулираниот НБТ би биле елементи за хронична грануломатозна болест.

Спектар на болеста: Кај пациентите со Икс-врзана форма на ХГБ (60-70% од пациентите), болеста се јавува многу порано и во појака форма (пожесток облик) за разлика од пациентите со автозомно рецесивно наследени форми.

Табела 3.1: Нормални вредности за некои протеини на акутна фаза. м, машки; ж, женски.

Главни акутно фазни протеини	
Алфа 1-кисел гликопротеин (а1КГП)	0.4-1.3 г/Л
Це-реактивен протеин (ЦРП)	до 2 мг/Л
Серумски амилоид А (САА)	<10 мг/Л
Негативни акутно фазни пеотеини	
Албумин (Алб)	35.0-52.0 г/Л
Аполипопротеин А1 (АпоА1)	1.25-2.15 г/Л (ж) 1.10-2.05 г/Л (м)
Аполипопротеин А2 (АпоА2)	0.3-0.5 г/Л
Аполипопротеин Б (АпоБ)	0.55-1.25 г/Л (ж) 0.55-1.40 г/Л (м)
Сооднос Аполипопротеин Б/ Аполипопротеин А1(АпоБ/АпоА1)	0.30-0.90 г/Л (ж) 0.35-1.00 г/Л (м)
Трансферин (Тфн)	2.0-3.6 г/Л
Протеиназни инхибитори	
Алфа 2-антиплазмин (а2АП)	0.06-0.1 г/Л
Алфа 1-антитрипсин (а1АТ)	0.9-2.0 г/Л
Алфа 2-макроглобулин (а2МГ)	1.3-3.0 г/Л
Це1 инхибитор (Ц1инх)	0.18-0.39 г/Л
Метало преносни белковини	
Церулоплазмин (Цер)	0.2-0.6 г/Л
Хаптоглобин (ХГ)	0.3-2.0 г/Л
Комплементни и сосирувачки фактори	
К2	10-30 мг/Л
К3	0.9-1.8 г/Л
К4	0.1-0.4 г/Л
К4 врзувачки протеин (К4вп)	300 мг/Л
К9	200 мг/Л
Фактор В (ФБ) [активатор на К3 (аК3)]	0.05-0.025 г/Л
Фибриноген (Фиб)	1.8-3.5 г/Л

Најголем дел од пациентите со Икс-ХГБ имаат застој во развојот, тешки бактериски аденитиси, абсцеси или остеомиелит уште во првата година од животот. Најчестите инфекции се пнеумонија или лимфаденитис предизвикани од каталаза-позитивни организми (особено *Staphylococcus*) или фунги. Симптомите од страна на интестиналниот тракт или обструкции на уринарниот тракт се предизвикани од грануломски формации. Ретко, во двете форми (и Икс врзаната и автозомно рецесивната), првите симптоми не се препознаени се до полнолетството.

3.1.2. Клиничка примена на акутно фазните протеини

Нормалните вредности на некои од протеините од акутната фаза кои се користат на Институтот за имунобиологија и хумана генетика се дадени на Табела 3.1.

Главните примени на мерењето акутно фазни протеини се: во следењето како напредува активноста на веќе дијагностицирана болест, за оценувањето одговор кон дадената терапија во воспалителните заболувања, како и за откривање компликации кај веќе позната болест (Табела 3.2).

Табела 3.2. Најзначајните примени во мерењето акутно фазни протеини.

1. Следењето како напредува активноста на веќе дијагностицирана болест.

2. Оценувањето одговор кон дадената терапија кај воспалителните заболувања (на пример, ревматоиден артрит, јувенилен хроничен артрит, анкилозирачки спондилит, Рајтеров синдром, псоријатична артропатија, васкулити и ревматска треска.

3. Откривање компликации кај веќе позната болест (на пример, складирање имуни комплекси, постоперативна инфекција).

Во имунолошката дијагностика на заболувањата се користат повеќе од 20 протеини на акутна фаза. Најголемиот дел од нив се гликопротеини (Табела 3.3). Мерењето концентрацијата на Ц-реактивен протеин (ЦРП) во плазма или во серум може да разликува воспалителна од невоспалителна состојба и е пресудно за лекување на пациентовата болест. Во некои болести (како што е ревматоидниот артрит), сериското мерење ЦРП има прогностичка вредност. Докторите треба да внимаваат кога ги читаат резултатите од ЦРП бидејќи понекогаш тие се искажуваат како мг на литар (мг/Л), а други лаборатории ги искажуваат како мг на децилитар (мг/дЛ). Обично концентрацијата на серумскиот амилоид А ги следи

Табела 3.3. Примери за клиничка употреба на акутно фазните протеини.

Протеин	Нормална концентрација (г/Л)	Концентрација во акутно воспаление (г/Л)	Време за одговор (часови)
Ц-реактивен протеин	0.0008-0.004	0.4	6-10
Алфа1-антихимотрипсин	0.3-0.6	3.0	10
Алфа1- антитрипсин	2.0-4.0	7.0	24
Орозомукоид	0.5-1.4	3.0	24
Хаптоглобин	1.0-3.0	6.0	24
Фибриноген	2.0-4.5	10.0	24
К3	0.55-1.2	3.0	48-72
К4	0.2-0.5	1.0	48-72
Церулоплазмин	0.15-0.6	2.0	48-72

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Постоперативна инфекција: Случајот на Љубица Горачинова после холецистектомија.

концентрациите на ЦРП, иако во некои студии е покажано дека серумскиот амилоид А е поосетлив обележувач за воспалително заболување. Денес, мерењето на серумскиот амилоид А не е широко прифатено.

Во моментов, најчесто употребувани показатели за акутно фазниот одговор се седиментацијата на еритроцити и плазматската концентрација на ЦРП. Седиментацијата на еритроцити главно зависи од концентрацијата на фибриноген во плазма. Како испитување, седиментацијата на еритроцити има предности затоа што е познато, едноставно и постои литература во минатите седумдесет години. И покрај тоа, мерењето на ЦРП има неколку предности над седиментацијата на еритроцити. Седиментацијата на еритроцити е индиректно мерка за концентрацијата на протеините од акутната фаза и може да биде под големо влијание на големината, обликот, бројот на црвените клетки (еритроцитите) како концентрацијата на имуноглобулините. Поради тоа, резултатите од седиментацијата на еритроцити се непрецизни и понекогаш без значење.

Седиментацијата на еритроцити се смета како застарен метод за индиректно испитување фибриногенот во плазмата бидејќи денес постојат директни и прецизни методи за негово мерење. Со менувањето состојбата на пациентот (подобрување или влошување), седиментацијата на еритроцитите малку се менува, додека концентрацијата на ЦРП во плазма нагло се менува. Широчината на патолошките вредности за ЦРП се многу поширок отколку тие за седиментација на еритроцити со последици во дијагностицирањето: кај пациентите со концентрација на ЦРП во плазма поголема од 100 мг/Л, 80 до 85% имаат бактериска инфекција. Седиментацијата на еритроцити постојано се зголемува со возраста, додека концентрацијата на ЦРП во плазма не се менува. Меѓутоа, многу пациенти со активен системски лупус еритематозус немаат високи концентрации на ЦРП во плазма, но имаат за време на бактериска инфекција. Примената на ова сознание за диференцијална дијагноза на треска кај пациенти со системски лупус еритематозус е лимитирано со наодите дека концентрцаијата на ЦРП во плазма е зголемена и кај болните со активен лупузен серозит или кај хроничен синовиит.

Здравите лица имаат концентрација на плазма ЦРП од 2 мг/Л или помалку, но некои имаат концентрации до 10 мг/Л (Табела 3.1). Подоцнежните испитувања покажаа дека вредностите под 10 мг/Л немаат клиничко значење. Сепак, концентрацијата на ЦРП под 10 мг/Л, но значајно над вредностите во здравата популација покажува значајна поврзаност со остеоартриот, а може да предвиди и подоцнежен коронарен синдром. Поради тоа се смета дека лесно зголемените концентрации (од 2 до 10 мг/Л) би можеле да укажуваат на лесна хронична воспалителна реакција во организмот.

Табела 3.4. Присуство на Ц-реактивниот протеин во болестите.

Редовно присутен	Повремено присутен	Отсутен
Активна ревматска грозница Акутен миокарден инфаркт Карцином Стрептококна инфекција Пневмонија	Преикардит Ревматоиден артрит Пиелит Нефрит Туберкулоза	Кожни заболувања Горни респираторни инфекции Бубрежни заболувања Локални инфекции

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

БЛОК 2 - ИМУНИ КЛЕТКИ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 4. КЛЕТКИ ВО ИМУНИОТ СИСТЕМ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да двојат лимфоцити и моноцити од периферна крв;
- како да користат имунофлуоресценција.

ВЕЖБА 5. ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- основни елементи на проточната цитометрија;
- да определат Б-Ли и Т-Ли од периферна крв.

ВЕЖБА 6. АНАЛИЗА НА СЛУЧАИ ОД КЛЕТОЧЕН ИМУНИТЕТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од проточна цитометрија;
- анализираат случаи од клеточен имунитет.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 4: КЛЕТКИ ВО ИМУНИОТ СИСТЕМ

4.1. Двоење лимфоцити и моноцити од периферна крв

4.1.1. Општи напомени

Со помош на центрифугирање или градиенти со различна густина, како и користењето на својството на различна атхеренција, клеточните елементи од крвта(лимфоцити, моноцити, гранулоцити, тромбоцити) може да се издвојат едни од други. Денес постојат посложени и посовремени методи, какви што се проточната цитометрија и сепарацијата со моноклонски противтела. Од практични причини (полесна апликација, економичност) овде ќе бидат прикажани најупотребуваните методики.

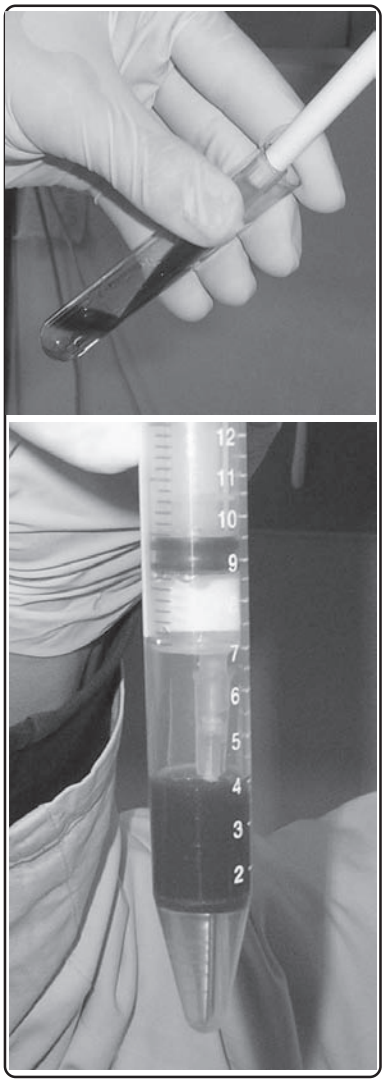
Пред сè, примерокот крв треба да се земе со соодветен противкоагуланс, зависно од потребата - кои клетки треба да се сепарираат. Исто така, неопходно е да се користи пластична амбалажа за земање и двоење на клетките, која за некои потреби е задолжително да биде стерилна. Доколку се користи стаклена амбалажа, таа треба да биде силиконизирана.

Постапка за силиконизирање: епруветките и другата стакларија која треба да се силиконизира, претходно добро се чисти и се мие со 2 -3 % раствор на NaOH, а потоа добро се исплакнува со дестилирана вода и се суши. Така подготвената стакларија се потопува во растворот од силикон и веднаш се исцедува. Потоа се плакне со обична вода (овој дел треба да се работи со заштитни ракавици и на отворен простор бидејќи силиконот и неговите испарувања се токсични). Вака силиконизираната стакларија се суши 24 часа на собна температура, а подобро во сушара на 100°Ц за 10 мин. Се обележува, посебно се чува и е спремна за употреба.

4.1.2. Постапка за двоење лимфоцити од периферна крв

Лимфоцитите се имунокомпетентни клетки-носители на хуморалниот и клеточниот имунитет. Се делат на Т, Б и КПУ лимфоцити, а овие понатаму се делат на суппопулации. Тие најчесто се одделуваат од другите клетки од периферна крв со методот на центрифугирање со помош на градиент фикол-триозил. Бидејќи фиколот е полисахарид со ограничена можност за густина, во него се додава натриум метризоат (триозил, хипак, јодурон и сл.) за да се зголеми неговата густина. Овој градиент е со густина од 1.077, а лимфоцитите имаат помала густина и ќе останат над него, додека другите клетки ќе патуваат кон дното.

Потребен е следниов материјал и опрема: пуфериран физиолошки раствор(ПФР), фикол (лимфопреп, фикол-пак), хранлив медиум (Хенкс, РПМИ-1640 или Паркер 199), силиконизирани пластични епруветки или пластични епруветки 12 * 75 мм, центрифуга со хоризонтален ротор, пастерови пипети и хепарин.



Слика 4.1:Постапка за двоење лимфоцити од периферна крв. А, нанесување крв врз слојот од раствор за двоење лимфоцити (лимфопак) со пипета. Б, нанесување раствор за двоење лимфоцити под претходно нанесениот слој крв со шприц и со игла.

Изведување на тестот:

1. Се зема венската крв со венепункција во хепаринизирана епруветка или во пластичен шприц со додаток од 100 ИЕ хепарин на 10 мЛ крв. Крвта може да се меша во епруветка со еднаков волумен на пуфериран физиолошки раствор, или да се користи без разредување.
2. Се приготвува раствор за двоење лимфоцити (Се подготвува 9.2% фикол во дестилирана вода и се аутоклавира. Се мешаат 43.4 мЛ Фиколов раствор со 6.6 мЛ Триозил 75). Постојат и готови стерилизирани раствори за двоење лимфоцити од различни компании (лимфопреп, лимфопак и други).
3. Се стават 2 мЛ од растворот за двоење лимфоцити во градуирана епруветка и врз него се налеваат 2 мЛ од неразредената или 4 мЛ од разредената крв. Крвта се нанесува внимателно со пипета по ѕидот од епруветката, внимавајќи да не се измеша со растворот за двоење лимфоцити. Тоа најдобро се постигнува со искосување на епруветката под агол од 45 степени (Слика 4.1:А). Втората варијанта е да се внесе најпрвин крвта во епруветката, а подоцна да се внесе растворот за двоење лимфоцити со игла и шприц на дното од епруветката (под крвта) или да се направи со пипета на ист начин (Слика 4.1:Б).
4. Епруветките се центрифугираат во хоризонтален ротор на 300 г за 15 минути на 4°Ц. По завршеното центрифугирање се добиваат пет слоја во перуветката. Најгоре се наоѓа слојот од плазма и тромбоцити, под него се наоѓа слој од лимфоцити и моноцити, под нив се наоѓа слојот од растворот за двоење лимфоцити (лимфопак), потоа тенок слој од гранулоцити, и најдолу се наоѓаат црвените клетки (еритроцити). Црвените клетки се најтешки и поради тоа се сместуваат на дното

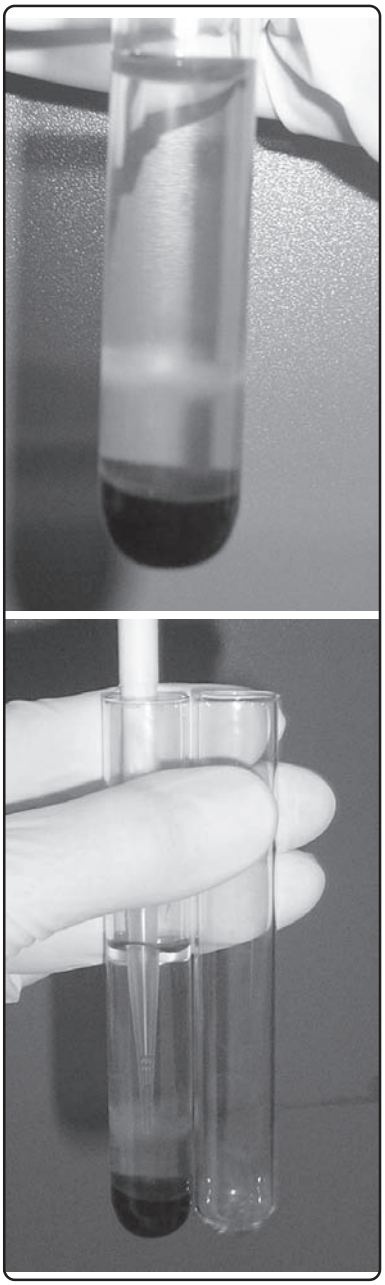
од епруветката по центрифугирањето на крвта (Слика 4.2:горе).

5. Со пастерова пипета внимателно се собираат лимфоцитите од тенкиот меѓуслој и се пренесуваат во други две градуирани епруветки (некои ја викаат оваа постапка жнеење на лимфоцити). Треба да се внимава да не се зема од долниот слој (растворот за двоење лимфоцити) бидејќи има поголема густина и ќе го спречи успешното плакнење на лимфоцитите. Некои препорачуваат најпрвин да се отстрани најгорниот слој (плазмата или разредената плазма), а потоа да се собираат лимфоцитите (Слика 4.2:долу).
6. Во епруветките се додава хранлив медиум и се плакнат три пати по центрифугирање на 150 г за 10 мин на 4°Ц. Оваа постапка се изведува за да се отстранат, колку е можно повеќе, крвните плочки (тромбоцитите) од лимфоцитите.
5. Супернатантот се отфрла и талогот од лимфоцитна суспензија се дотерува со хранлив медиум според бараната концентрација (потребен број клетки во 1 мЛ суспензија). Оваа постапка се изведува со броње на лимфоцитите во комора за броење клетки.

Прикажување и толкување на резултатите:

На градиентот од фикол заостануваат не само лимфоцитите туку и моноцитите, па затоа е правилно да се каже дека овој метод ги двои еднојадрените (мононуклеарните) клетки. Присуството на други клетки може да се контролира со микроскопски преглед на обоена размаска од добиената суспензија. Доколку во натамошното користење на клетките, моноцитите значајно интерферираат, тие можат дополнително да се издвојат со инкубирање на клетките во пластични епруветки 2 часа на 37°Ц. Со оглед дека моноцитите се атхерентни клетки, тие ќе останат на дното. Тромбоцитите се двојат со повеќекратно миење на клетките на помал број ввм (вртења во минута, околу 200 г, 10 мин).

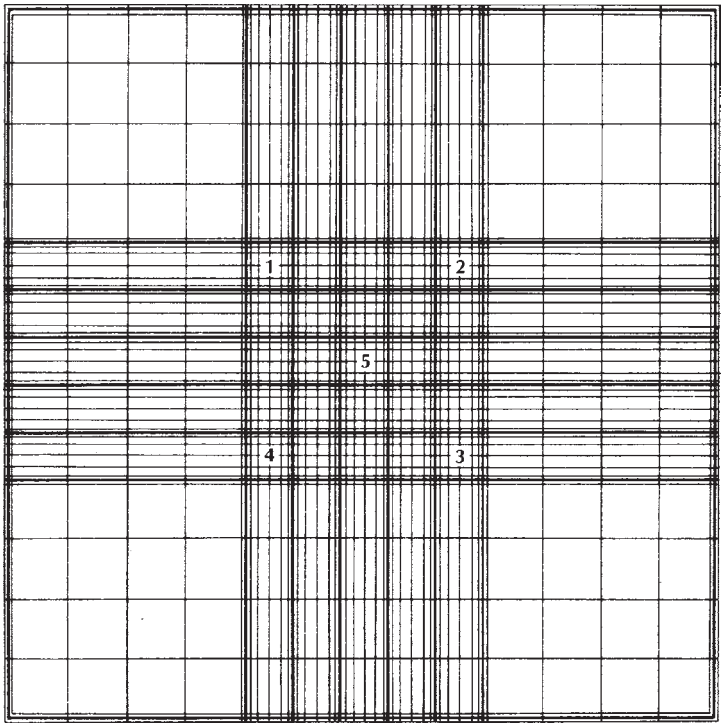
Може да бидат присутни и еритроцити, што особено се случува при издвојување лимфоцити од крв од болни со малигни болести, автоимуни, системски болести, болни на дијализа или, пак, политрансфундирани, односно трансплантирани болни во фаза на отфрлање. Тогаш еритроцитите се отстрануваат со хемолизирање. Се користат дестилирана вода и хипертоничен Хенксов пуфер (на 100 мЛ веќе подготвен Хенксов пуфер се додава 2.5 г NaCl). Клеточната суспензија се става 30 секунди во контакт со дестилирана вода и потоа веднаш се додава хипертоничен Хенксов пуфер (односот е вода : Хенксов хипертоничен пуфер = 3:1).



Слика 4.2:Распоред на слоевите по центрифугирање на крвта врз раствор за двоење лимфоцити (горе). Постапка за собирање лимфоцити од меѓуслојот на еднојадрени клетки со пастерова пипета или со автоматска пипета (долу).

4.1.3. Броење клетки со хемоцитометар

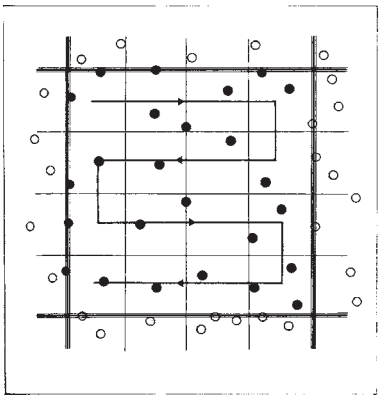
За броењето клетки во хемоцитометар потребно е следново: суспензија од клетки, 0.5% еозин во 0.9% натриум хлорид, комора за броење клетки (модифицирана Нојбауерова комора (Neubauer)) со покривно стакло, светлосен микро-



Слика 4.3: Мрежа на модифицирана Нојбауерова комора за броење клетки. Во четирите аголни квадрати броиме ако има повеќе клетки, додека во петте квадратчиња од централниот квадрат броиме кога има помалку клетки.

скоп (по можност со фазен контраст), етанол 75%, детергенет за чистење.

1. Комората за броење и покривното стакло се мијат внимателно со детергент, вода и алкохол и внимателно се сушат. Над комората се додава покривно стакло.
2. Се додаваат 10 мкЛ клеточна суспензија и 10 мкЛ еозински раствор во мали епруветки (10 x 50 мм) и внимателно се меша.
3. Меѓу покривното стакло и комората за броење се додаваат околу 10 мкЛ обоена суспензија.
4. Се чека 1 мин клетките да се исталожат и се гледаат клетките под објектив 20. Еритроцитите се мали чисти клетки; лимфоцитите се со слична големина, но темни под фазен контраст; полиморфонуклеарните леукоцити се големи и темни, тромбоцитите се како мали темни точки, мртвите се обоени црвено бидејќи еозинот ги бои мртвите јадра.
5. Модифицираната Нојбауерова комора има 4 квадратни милиметри во аглите во кои се бројат леукоцити и еден централен во кој се бројат еритроцити, тромбоцити и леукоцити (Слика 4.3). Централниот квадратен милиметар е поделен на 25 квадратчиња одделени со тројни линии, а секој од нив е поделен на 16 мали квадратченца. Волуменот што го зафаќа едно мало квадратче под покривното стакло изнесува 0.004 мм^3.
6. Се бројат лимфоцитите и мртвите клетки во пет големи квадрати (во 80 мали квадратчиња). Ако е вкупниот број помал од 100, тогаш се бројат во сите 25 квадрати (400 мали квадратчиња). Броењето во едно квадратче



Слика 4.4:Броење лимфоцити во едно квадратче од хемоцитометар. Се бројат клетките внатре, на левиот и горниот раб. На оваа слика има вкупно 25 клетки.

го вршиме почнувајќи од горното лево квадратче и завршувајќи во долното лево квадратче. Ги броиме сите лимфоцити внатре во квадратчето, како и тие на левата и горната линија од квадратчето, додека тие на десната и долната линија не се бројат (Слика 4.4).

7. Вкупниот број клетки во оригиналната суспензија е еднаков на бројот на клетките во пет големи квадрати x 10^5 во 1 мЛ суспензија.

4.1.4. Испитување живи и мртви клетки

Мора да се подвлече дека сите испитувања во оваа книга се изведени на живи клетки. Клетките остануваат живи доколку се чуваат на 0^0Ц (во мраз и вода), освен лимфоцитите од морско свинче кои мора да се чуваат на собна температура.

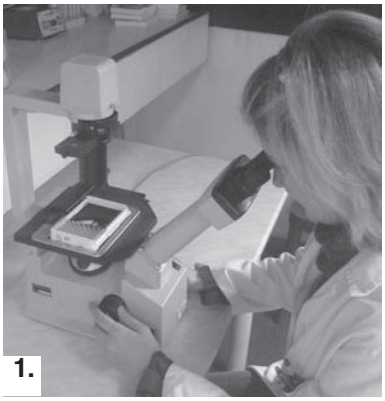
Клетките треба брзо да се приготват, да се внесат во медиум и да се употребат. Општо земено, лимфоцитите не издржуваат живи во ладилник оставени преку ноќ.

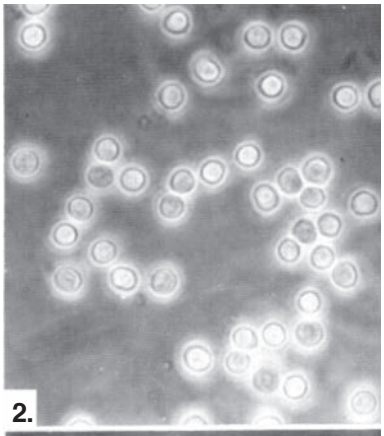
Мембраната на живата клетка не дозволува навлегување боја во внатрешноста и според оваа особина можат да се разликуваат мртвите од живи клетки. За оваа намена постојат повеќе бои: трипанско синило, еозин, нигрозин и други.

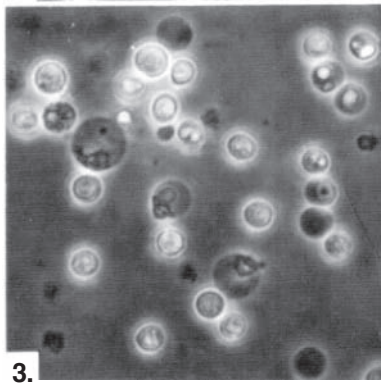
За оваа постапка потребни се следниве материи: 0.2% трипанско синило во физиолошки раствор, хемоцитометар (модифицирана Нојбауерова комора за броење клетки), суспензија од клетки, светлосен микроскоп, водено бања (37°Ц), епруветка (најдобро **полистиренска**, 12 x 75 мм).

1. Во пластична епруветка се внесуваат 0.1 мЛ од клеточната суспензија и 0.1 мЛ од боја трипанско синило. Епруветката се инкубира 3 мин на 37°Ц, се вади и се остава 5 мин на собна температура.
2. Модифицираната Нојбауерова комора се поставува на светлосен микроскоп, се наоѓа мрежата и се нанесува покривно стакло.
3. Во просторот меѓу покривното стакло и комората се внесува суспензија од обоените клетки, се чека 1 мин клетките да се исталожат и се бројат клетките.
4. Клетките се бројат во петте мали квадрати од централниот квадрат и тоа се бројат сите клетки (необоени и обоени) и одделно се бројат само мртвите клетки, оние кои се со обоени јадра.
5. Под микроскоп со фазен контраст живите лимфоцити просветлуваат, додека мртвите клетки се гледаат како темни кругови (Слика 4.5).
5. Процентот на живи лимфоцоти се пресметува според следнава формула:

Живи % = (Број на живи клетки *100)/Вкупен број клетки


1.


2.


3.

Слика 4.5: Лимфоцити погледнати со фазен контраст:

1. Инвертен микроскоп со фазен контраст;

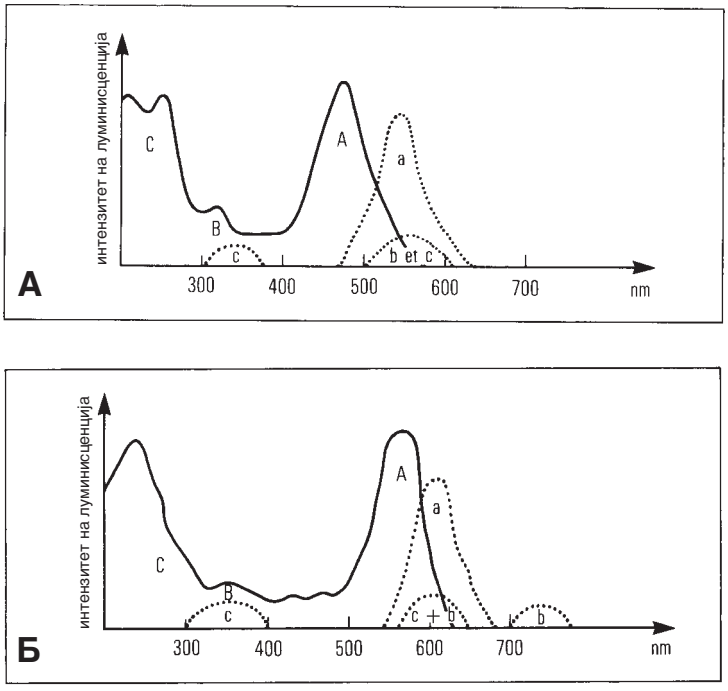
2. Свежи лимфоцити во одлична состојба;

3. Топлотно оштетени лимфоцити (загреани на 45°Ц).

Мртвите клетки се гледаат како темни кругови, а во некои клетки има пикнотички јадра.

4.2. Имунофлуоресценција

Имунофлуоресцентните техники имаат висока осетливост и специфичност на реакцијата противген-противтело, како и можност за директно микроскопско прикажување на имуните комплекси во ткива и клетки. За да се овозможи имунофлуоресценцијата, неопходно е еден од реактивите во реакцијата претходно да е обележен со некој флуорохром. Флуорохромите се бои кои имаат својство да апсорбираат светлина со помала бранова должина, при што дел од апсорбираната светлина се претвора во светлосно зрачење од видниот спектар со значаен интензитет. Овој процес се означува како **ФЛУОРЕСЦЕНЦИЈА** (слика 4.6). Во имунохистохемијата како откривачки реагенси се користат противтела обележени со соодветни флуорохроми. Обично се употребуваат флуорохроми кои располагаат со хемиски активни групи погодни за конјугирање на противтелото со



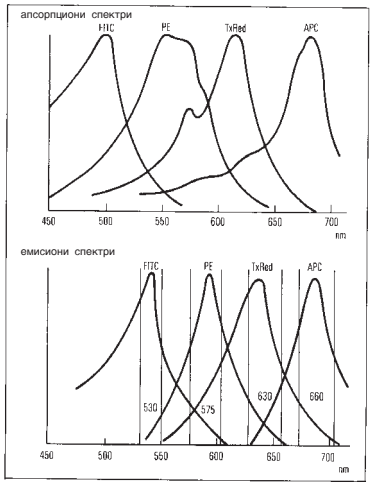
Слика 4.6: Спектрите на апсорпција (полна линија) и на емисија (испрекината линија)на флуоресцеиноt (А) и на родаминоt (Б).

фрлуорохромот. При конјугирањето, значајно е да се сочува имунолошката активност на обележеното противтело. Кои флуорохроми ќе се употребат зависи од супстанцијта која ќе се фиксира(протеини, ДНК, РНК, митохондрии или др.), но најчесто употребувани флуорохроми се:

- флуоресцеин изотиоцијанат (ФИТЦ);
- тетраметил родамин изотиоцијанат (ТМРИТЦ);
- родамин Б изотиоцијанат (РБИТЦ);
- лизамин родамин Б (РБ200);
- 1-Диметил-амино-нафтален-5
- сулфонова киселина (ДАНЦИЛ);
- етидиум бромид;
- акридин оранж.

Спомнатите флуорохроми зрачат светлина со карактеристична боја: флуоресцеинот и ДАНЦИЛ-от зрачат жолтозелена светлина, додека другите родамински соединенија зрачат портокалово-црвена светлина. Сите имаат свој спектар на апсорпција и спектар на емисија. На пр. ФИТЦ има три дела во спектарот на апсорпција: еден на 490 нм, друг на 320нм и трет на 280нм, а спектарот на емисија е кон 520нм (Слика 4.7).

Погодната флуоресценција,освен од квалитетите на бојата и нејзината концентрација, зависна е и од изворот на ексцитација (денешните халогени и живини лампи се многу погодни) и од pH на растворачот (најдобар е физиолошки раствор со pH 7.2-7.4). Имунофлуоресцентната техника најчесто се употребува за идентификирање и утврдување локализација на определен антиген во ткивата и клетките со помош на флуорохромно конјугирано противтело со позната специфичност. Но може да се користи и за идентификирање и определување на противтела за што се потребни пурифицирани антигени маркирани со определени флуорохроми.



Слика 4.7: Шема за спектри на апсорпција и спектри на емисија на повеќето флуорохроми.

Основни фази во имунофлуоресценцијата се:

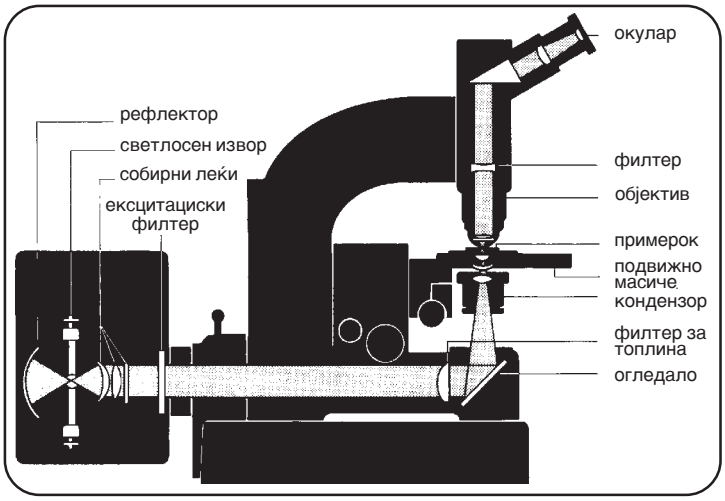
1. флуоресцентна микроскопија,
2. добивање конјугирани противтела,
3. подготовки на клетки и ткива,
4. боење, читање и документирање.

4.2. 1. Флуоресцентна микроскопија

За читање на вака специфично подготвените препарати (витални клетки или ткива) неопходен е посебен флуоресцентен микроскоп и затемнета просторија. Сите овие специфичности довеле до развиток на т.н. флуоресцентна микроскопија. Флуоресцентната микроскопија се одликува со висок степен на осетливост и контраст во приказот. Ако во обичната светлосна микроскопија разликата меѓу густините од две зони изнесува 1%, таа во флуоресцентното прикажување се разликува 100%. Постојат два основни вида флуоресцентна микроскопија: флуоресцентна микроскопија со пропусно светло и флуоресцентна микроскопија со опаѓачко светло (епиосветлување). Овие две можат да бидат комбинирани со фазен контраст, како и со испитување на две бранови должини (црвена и зелена) со што се обезебдуваат дополнителни можности (утврдување живи и мртви клетки).

4.2.1.1. Флуоресцентна микроскопија со пропусно светло

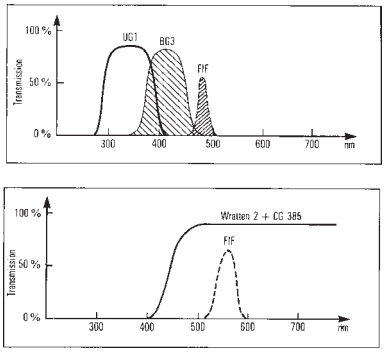
Светлоста се создава во живина ламба со висок притисок, се одбива од светлосното огледало и се упатува низ собирните леќи до ексцитирачкиот филтер, кој оддава флуоресцентен сноп светлина. Флуоресцентниот сноп светлина минува низ топлинско апсорбирачки филтер и се одбива низ



Слика 4.8: Флуоресцентен микроскоп со пропусно светло.

рефлексното огледало, преку кондензорот во примерокот. Секундарниот филтер (апсорбирачки) ги отстранува другите светлосни зраци, освен примарната флуоресценција, и по зголемувањето се пренесува до окуларот (Слика 4.8).

Како извор на светлина се користи светлост со мала бранова должина (ултравиолетна, виолетна или сина), најчесто од живина ламба под висок притисок, сместена во затворен носач и рефлексно огледало за да ги насочи зраците кон леќата. Живината ламба има максимум на 365 и на 437 нм. Можат да се користат и јодно кварцна ламба или ксенонска ламба (Слика 4.8). Задачата на првичниот (ексцитациски) филтер е да ја пропушти само светлината со бранова должина која создава флуоресценција во примерокот, додека на вторичниот (апсорбирачки) филтер е да ги задржи светлините со бранови должини различни од флуоресцентната бранова должина во примерокот, а да ја пропушти само флуоресцентната светлина од флуорохромот. Изборот на примарниот и секундарниот филтер се многу значајни за квалитетите на флуоресцентниот микроскоп и зависат од изворот на светлината и од апсорпциониот и емисиониот максимум на флуорохромот. Така на пример, за ФИТЦ ќе се земат филтри кои имаааат апсорпциски максимум на 492-495 нм, а емисионен максимум на 520-525 нм. За родаминските методи потребни се филтри со апсорпциски максимум на 550 нм и емисионен максимум на 580 нм (Слика 4.9).



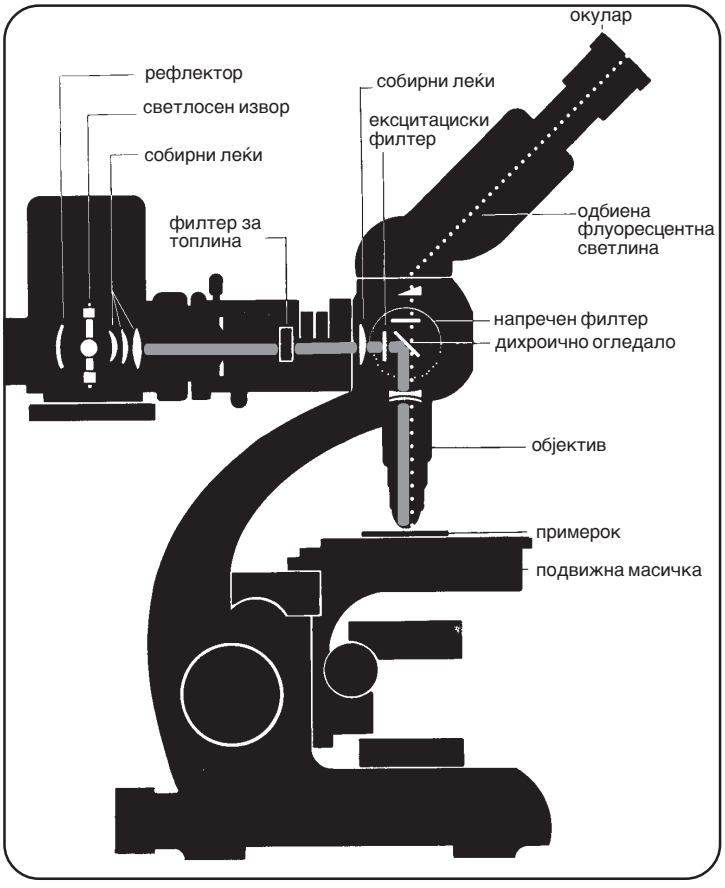
Слика 4.9: Трансмисија низ филтрите и доминантите бранови должини со UG1, BG3 и FIF (горе) и Wratten 2 + CG385 (долу).

4.2.1.2. Флуоресцентна микроскопија со пагачко светло

Оваа микроскопија има неколку предности во споредба со пропусната: 1) Објективите се со широк отвор и мал фокус па ја концентрираат ексцитациската светлина во помала зона; 2) центрирањето на светлоста и фокусирањето кон објектот се вршат истовремено; 3) можно е истовремено гледање под фазен контраст со што се зголемува квалитетот на микроскопирањето (Слика 4.10). Технички е овозможено гледање со опаѓачка светлост кога се внесени дихотомните

(разделувачки) огледала низ кои е овозможено минување на одбиената светлост од примерокот.

Флуоресцентниот сноп минува низ ексцитирачкиот филтер и паѓа врз примерокот. Дихроичното огледало дозволува светлоста да се упати на едната, но не и на другата страна. По осветлувањето на ткивото, светлосниот сноп се одбива, минува низ дихроичното огледало и се гледа зголемен во окуларот.



Слика 4.10: Флуоресцентен микроскоп со горно осветлување.

4.2.2. Добивање конјугирани противтела

Денес ни стојат на располагање голем број високо квалитетни конјугати со различна специфичност, приготвени од многу фирми за скоро секаква потреба. Нивниот број постојано расте и се проширува зависно од потребата на истражувачите и дијагностичарите. Затоа најчесто е непотребно да се приготвуваат сопствени конјугирани противтела. Само во ретки случаи, кога нема готови конјугати (особено при некои оригинални истражувања), потребно е да се приготват сопствени конјугати. Во таков случај најчесто се користи конјугирањето со флуоресцеин- изотиоцијанат (ФИТЦ), со тетраметил-родамид-изотиоцијанат (ТМРИТЦ) и со родамин-Б-изотиоцијанат (РБИТЦ).

4.2.3. Подготовка на ткива и клетки

Постојат различни подготовки на супстратот во ткивата зависно од целта на испитувањето. Во имунохистохемијата најчесто се користат ткивни препарати приготвени со криостат. Криостатните препарати можат да бидат фиксирани или свежи. Поретко се користат препарати калапени со парафин. Клетките можат да се испитуваат или фиксирани или при запазена виталност на клетките - мембранска имунофлуоресценција (види 2.1 и 2.2). При приготвувањето ткивни и клеточни препарати за имунофлуоресцентно испитување, неопходно е:

- да се запазат противгените детерминанти во супстратот;
- максимално да се сочуваат морфолошките структури.

4.2.3.1. Ткивни препарати

Ткивните препарати се приготвуваат со нагло смрзнување на ткивото, негово сечење уште додека е смрзнато или чување во смрзната состојба до моментот кога ќе се сече. Ткивото не смее да се одмрзнува.

1. СМРЗНУВАЊЕ СО CO_2 И АЛКОХОЛ. Се мешаат парчиња компримиран сув јаглероден двеоксид со алкохол (метанол или ацетон) во термос со широко грло на -70°Ц. Смешата може да се користи веднаш или по нејзино чување во замрзнувач. Ткивото (мали парченца до 5 мм дебелина) се внесуваат на дното од широка епруветка, се затвора со гумен затворач и се внесува на дното на термосот. Замрзнувањето настанува моментално. Смрзнатото парченце се вади со ладна пинцета и се става врз микротомната масичка, на која претходно била ставена капка пуфериран физиолошки раствор. Парченцето ткиво се притиска со парченце сув мраз (задолжително да се носат азбестни ракавици) за да се залепи на масичката. Блокот се префрла во криостат и по дваесетина минути (за да се изедначат температурите) се сече со дебелини зависни од целта на испитувањето.

2. СМРЗНУВАЊЕ ВО ТЕЧЕН АЗОТ. Ткивото се поставува врз капка пуфериран физиолошки раствор на микротомната масичка и се потопуваат заедно во течен азот. Смрзнувањето настапува веднаш. Понекогаш се забележуваат пукнатинки во примерокот.

3. СМРЗНУВАЊЕ ВО ИЗОПЕНТАН. Се внесува изопентан во метален или пластичен сад кој целосно се потопува во течен азот за да се излади. Кога на дното од изопентанот ќе се забележат матни капки, значи дека температурата е близу неговото мрзнење. Во тој момент се внесува ткивото во изопентанот исто како и во точка 1. (Смрзнување со CO_2 и алкохол). Во оваа модификација не настанува напукнување на ткивото, но е можно делумно растворање на ткивните структури (и да се добие послаба флуоресценција од нормално) или да се откријат некои противгени детерминанти (и да се добијат попозитивни флуоресцентни наоди од нормално).

4. ФИКСИРАЊЕ НА КРИОСТАТСКИТЕ ИСЕЧОЦИ. Криостатските исечоци може да се користат нефиксирани или фиксирани зависно од растворливоста и отпорноста на противгенот кон фиксаторот. Имуноглобулините и комплексите противген-противтело се фиксираат во етанол, метанол или ацетон (краткотрајно и на ладно). При докажување пневмококни полисахариди, хормон за раст и други може да се фиксира со 4% пуфериран формалин (pH 7.2-7.4).

4.2.3.2. Парафински препарати

Се користат при недостаток на криостат и можности за смрзнување на ткивата. Погодни се за испитување имуноглобулини и комплемент во бубрежни биопсии, имуноглобулини во плазматските клетки и на ревматоиден фактор во ткивата, но не и за испитување противјадрени противтела.

1. Фиксацијата на ткивата со дебелина од 5 мм се врши во 95% алкохол на 4°Ц за еден час. Потоа ткивото се сече на 2-4 мм и се остава во 95% алкохол на 4°Ц во тек на 15-20 часа.

2. Дехидрирањето на ткивото се врши низ четирикратно минување низ апсолутен алкохол, на 4°Ц (секое по 1-2 часа).

3. Осветлувањето се врши низ трикратно минување на ткивото низ ладен ксилен на 4°Ц (секое по 1-2 часа).

4. Калапењето во парафин се врши со четирикратно минување на ткивото во течен парафин (секое по 1-2 часа) на 56°Ц во термостат.

5. Сечењето на препаратите се изведува како за рутинско парафинско сечење. Треба да се избегнува загревање на исечоците при нивно ставање врз предметно стакло.

6. Депарафинирањето се врши двократно во ладен ксилен (секое по 10-15 секунди).

7. Плакнењето се врши трикратно со пуфериран физиолошки раствор (по 1 мин во секое минување).

4.2.3.3. Клеточни препарати

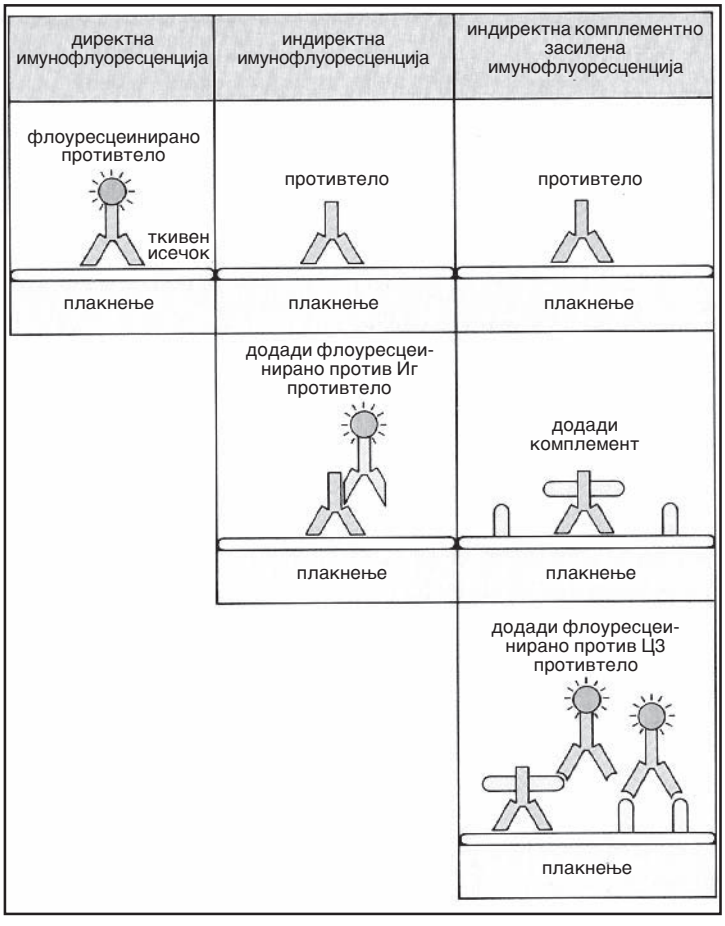
Пред боењето интраклеточни антигени се препорачува фиксација на клетките во 1% пуфериран параформалдехид за 15 мин на pH 7.2. Потоа клетките се плакнат и се внесуваат во желатински капсули (5% желатин и 5% говедски серумски албумин). Вака приготвената суспензија се замрзнува и се сече како за ткивните препарати (види погоре). Постојат специфични постапки за одделни видови клетки (тимоцити, миеломски клетки и други), како и за изведување имунофлуоресцентни истражувања во методики кои бараат клетките да бидат живи (цитотоксични тестови, класи на диференцијација и сл.). Овие постапки корисниците треба да ги консултираат пред да почнат со работа.

4.2.4. Боење, отчитување и документирање

Постојат два вида методики, кои според механизмот на реакциите се делат на директна и индиректна имунофлуоресценција (многу слично како противглобулинската реакција на Coombs).

4.2.4.1. Директна имунофлуоресценција (ДИФ)

Во оваа техника, противсерумот што содржи противтела е веќе маркиран со флуорохром и директно стапува во реакција со соодветниот антиген од исечокот на ткивото или од живите клетки, па реакцијата се одвива во "едно време". (слика 67). Реакцијата е погодна за откривање антигени на бактерии, лимфоцити, детекција на антитела и секако за користење двојно боење (имунофлуоресценција со употреба на два флуорохроми- типичен пример е двојното боење со етидиум бромид и акридин оранж при разликувањето мртви од живи клетки кај лимфоцитотоксичниот тест). Меѓутоа, тестот може да биде лажно позитивен; бара работење со чист материјал, исклучување на страничната екстрафлуоресценцијата и особено изразит афинитет, авидитет и специфичност меѓу антигенот и противтелата. Со директната



Слика 4.11: Механизми на директна имунофлуоресценција- обележување на противгеност со примарно противтело (лево); директна имунофлуоресценција со флуоросцеинирано против Иг (средина); индиректна комплемент засилена имунофлуоресценција (десно).

имунофлуоресценција може да се детерминираат и противтела кога антигенот е познат и маркиран со определена флуоресцентна боја. Овој начин поретко се користи.

4.2.4.2. Индиректна имунофлуоресценција (ИИФ)

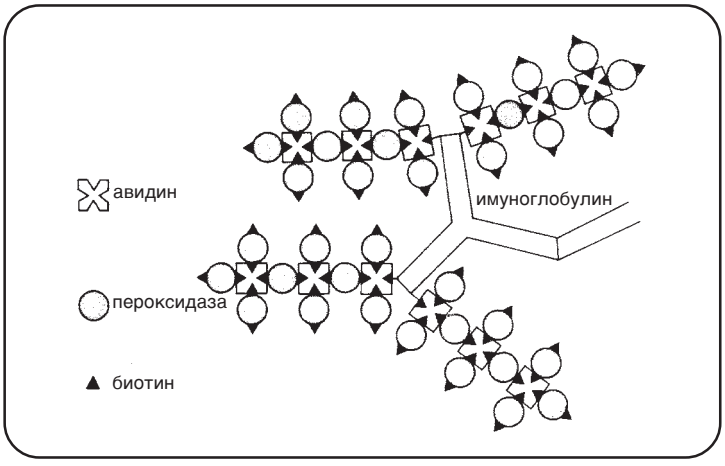
Индиректната имунофлуоресценција се користи при откривањето противтела и автопротивтела, кои се насочени кон определени антигени во клетките и ткивата. Сврзувањето на тие противтела со соодветниот антиген во супстратот се утврдува со помош на коњугати со гама глобулин (неспецифичен противглобулински коњугат) или со коњугати кон одделни класи имуноглобулини. Методот може да се употреби за докажување противтела создавачки клетки кон определен антиген, доколку располагаме со соодветниот антиген и коњугирано противтело насочено кон испитуваниот антиген. ИИФ може да се употреби и кога не е можно директно обојување поради недостаток на соответен коњугат. Во таков случај, супстратот го третираме со необележено противтело (може и со серум), а настанатата имунолошка реакција ја докажуваме со дополнително боење со специфичен противглобулински коњугат (на пример, против ИгГ1). Во основа на оваа техника, која се одвива во "две времиња", е модификацијата на индиректната противглобулинската реакција (Кумбсов тест) или техниката која содржи двојни противтела. Имунокомплексот се формира со инкубација на антигенот во супстратот со необележено противтело. Потоа се додава обележениот со флуорохром противглобулински серум (Слика 4.11).

Индиректната имунофлуоресценција има предности пред директната. Таа е многу поосетлива (понекогаш и до десет пати), а можат да се користат повеќе видови специфични испитувања со ист коњугат кон општите имуноглобулини или некои од нивните супкласи (против нуклеарните, против базалномембранските и други противтела можат да се откријат со исти коњугирани имуноглобулини). Полиспецифичниот противглобулински серум овозможува да се откријат имунокомплексите од сите видови реакции со противтела од иста врста, како и противтелата кои користат комплемент бидејќи противглобулинскиот серум може да содржи и противтела специфични за компонентите на комплементот.

4.2.4.3. Системот биотин-авидин

Познато е дека биотинот (витамин со слаба молекуларна маса, растворлив во вода) има својство лесно да се поврзува со огромен број најразлични биолошки молекули. Така тој може многу цврсто да се врзе и со авидинот (4 молекули биотин се врзуваат со една од авидинот). Авидин е гликопротеин кој се добива од албуминот од јајцето; има молекулска маса од 68.000 и може лесно да се обележи со флуорохром на пр. ФИТЦ или родамин, при што повеќе молекули флуоробоја се врзуваат за една молекула авидин.Така, во оваа реакција се користат својствата на биотинот што може лесно да се врзе за противтелата со ковалентна врска (Слика

4.12), а потоа и со авидинот кој веќе сме го обележале со некоја флуоробоја. При испитувањето на противтелата со овој систем, реакцијата започнува со поставување на серумот во контакт каде се испитуваат противтелата и соодветниот антиген. Потоа се додава противпротивтелото (слично како при противглобулинскиот тест на Coombs) обележено со биотин. За да биде реакцијата видлива, на крај се додава авидин обележан со флуорохром. Се добива многу јасна флуоресценција, а реакцијата е многу осетлива бидејќи открива и најмали концентрации антитела затоа што тие се биотинилизирани - значи повеќе молекули биотин се врзуваат за една молекула од противтелото и овој нов комплекс пак преку биотинот формира многу цврста врска со додадениот авидин обележен со флуорохром. Овие цврсти врски овозможуваат моќна и јасна флуоресценција. На таков начин, реакцијата изразито е амплифицирана без да се влијае врз точноста на резултатот. Во овој систем, исто така може да се користи обележување со два флуорохроми.



Слика 4.12: Механизам на авидин биотин-пероксидазен тест за определување имуноглобулини.

4.2.4.4. Квантитативна имунофлуоресценција

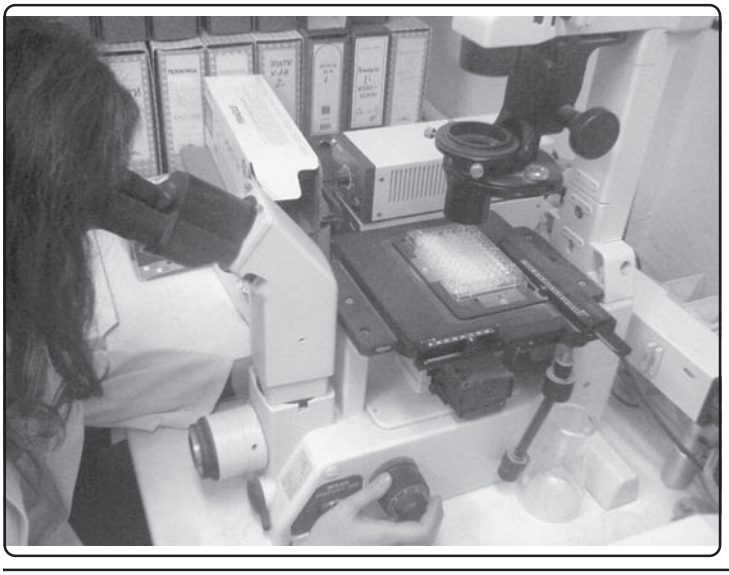
Главниот недостаток на имунофлуоресценцијата е субјективноста при отчитување интензитетот на имунофлуоресценцијата. Денес има развиено неколку технолошки постапки за квантификација на имунофлуоресценцијата. Со помош на микрофлуорометар може прецизно да се измери количината на светло со определена бранова должина која ја праќа флуоресцентниот примерок. Развиени се имунофлуоресцентни тестови за квантифицирање на ИгГ, ИгА, ИгМ, Це3, Це4 и други материи во хистолошките препарати, како и противјадрени и против ДНК противтела. Количината на флуоресцентните противтела врзани за нерастворливиот противген се мерат со посебно вградени микрофлуориметри и се претвораат во мг% со помош на стандардна права дадена од производителот на опремата и/или на хемикалиите.

4.2.4.5. Грешки и лажно позитивни резултати

Понекогаш во имунофлуоресцентните испитувања се јавуваат грешки и лажно позитивни резултати кои се должат на неспецифични имунолошки реакции. Неспецифични боења можат да се добијат поради лошо пречистување на коњугатите и присуство на флуорохромирани неимуноглобулински материи во нив. Неспецифични боења можат да се добијат при несоодветно мрзнење на примероците, гребнатинки на предметното стакло, лошо прилепување на примерокот врз стаклото, присуство на бактерии (кои апсорбираат коњугат) во коњугатот или пак, некротични промени во ткивата. Често неспецифично боење прикажуваат гранулите на еозинофилните леукоцити што може значително да се намали со апсорпција со црнодробен прав. Голема група животински ткива (кои се користат како супстрат за докажување ткивно специфични противтела во серумот од болни луѓе) може да даде лажно позитивни резултати заради хетероспецифичните противтела во испитуваниот серум, особено ако тој е со висок титар. При испитување мембрански имуноглобулини кај Б-лимфоцитите, потребно е да се утврди бројот на моноцити во суспензијата. Потполното отстранување на моноцитите е тешко и со големи губитоци на Б-лимфоцитите, затоа е најдобро да се утврди нивниот број со фазен контраст или со дополнително боење на препаратите за пероксидаза. Треба да знаеме дека некои ткивни и клеточни материи имаат карактеристична автофлуоресценција (калциумовите талози, липофусцинот и витаминот А (жолта боја), рибофлавинот (жолтозелена боја), порфиринте (темно црвена боја) и слично.

4.2.4.6. Документирање на резултатите (фотографирање)

Фотографирањето на флуоресценцијата значајно не се разликува од обичното микроскопско фотографирање. Обично меѓу апаратот и објективот се поставува филтер (најчесто ОГИ). Времето на експозиција зависи од јачината на филмот



Слика 4.13: Инвертен флуоресцентен микроскоп со можност за фотографирање (Nikon, Diaphot 300).

и се определува од искуство (од 10 секунди до 20 мин). Експозиција подолга од 20 мин не дава добри резултати затоа што доаѓа до "гаснење" на флуоресценцијата по продолженото осветлување. Добри резултати даваат црно белите или колор филмови со голема осетливост (на пр. од 400 до 1.600 ASA).

4.3. Задача

Одвои лимфоцити од човекова периферна крв и определи го бројот на живите и на мртвите клетки во 1 мЛ. Изброј колку лимфоцити има во дадениот милилитар Хенксов медиум и нивниот број дотерај го до $2*10^6$ во 1 милилитар. Резултатите внеси ги во Табела 4.1.

Табела 4.1: Табела за внесување резултати од издвоените лимфоцити.

	Пример	Случај
Број на издвоени лимфоцити во милитар	$5*10^7$	
Додадени милилитри пуфер	24	
Конечен број на лимфоцити во милилитар	$2*10^6$	$2*10^6$

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 5: ПРОТОЧНА ЦИТОМЕТРИЈА

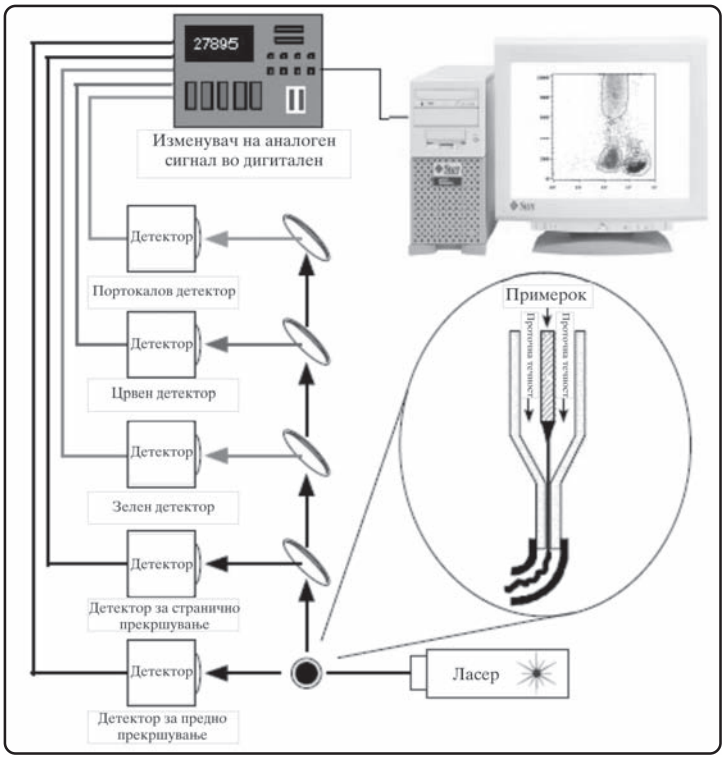
5.1. Систем за проточна цитометрија

Првите цитометри базирани на светлина, беа малку повеќе од течна патека, извор на ексцитација и фотодетектор. Како и повеќето инструменти, и проточните цитометри стануваат софистицирани апарати кои комбинираат, течности, оптика, електроника и софтвер со што се овозможува мерењето да биде на микроскопски честички со брзина од повеќе десетици илијади во секунда. Овие инструменти го искористија развојот на повеќе технолошки достигнувања (како полупроводници и телекомуникации),со што ја зголемија точноста и довербата со значително намалување на големината.

Институтот за имунобиологија и хумана генетика располага со проточен цитометар CyAnADP од фирмата ДАКО. Апаратот има три ласери со можност за анализирање клетки со пет бои и соодветен софтвер за анализа (Слика 5.1).



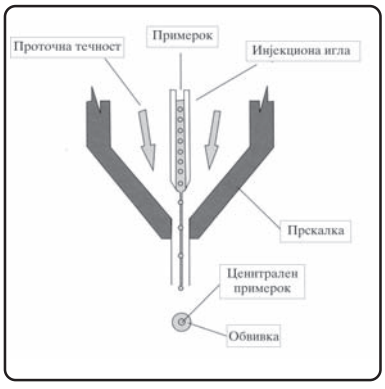
Слика 5.1: Систем за проточна цитометрија CyAnADP од фирмата ДАКО на Институтот за имунобиологија и хумана генетика.



Слика 5.2: Шематски приказ на проточен цитометар.

5.1.1. Проточна цитометрија

Припремените примероци честички кои треба да се испитуваат, го почнуваат своето патување низ проточниот цитометар уште во епруветаката за примерокот (плочка со повеќе бунарчиња или некој сличен носач). Кога ќе пристапиме кон анализа, примерокот се всмукува (аспирира) од епруветката и се пренесува (транспортира) низ цевчиња до проточната кивета или прскалката. Во проточната кивета, примерокот се внесува во центарот на најбрзиот проточен носач и патува до светлосниот извор кој се ексцитира (Слика 5.2). Светлосното расејување и/или флуоресценцијата се регистрира, спектрално се филтрира и се насочува кон соодветните фотодетектори за конверзија во електрични сигнали. Електронското кружење се користи за обработка на овие сигнали за анализа, класификација, категоризација и чување на податоците. За сортирање, секоја честичка се следи во инструментот како што минува низ централниот млаз, се одделува од него и како поларизирана честичка се сортира. Капката поминува низ електрично поле и на крајот се собира во соодветен контејнер за понатамошно анализирање или изучување, или се фрла како отпад.



Слика 5.3: Хидродинамичните особини на течностите во врвот на проточната игла од цитометарот.

5.1.2. Течни системи

Течните системи на проточниот цитометар се користат за транспортирање на честички од случајна тридимензионална суспензија на примероците до уреден проток на честички кои патуваат низ еден или повеќе осветлувачки бранови.Во

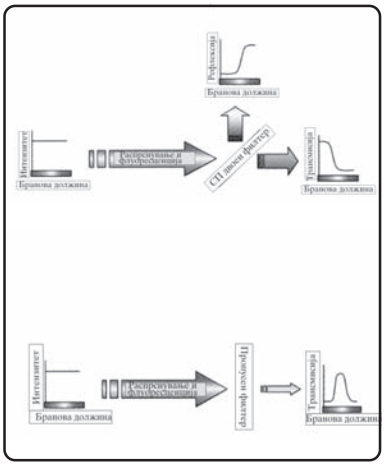
сортерите овие честички се транспортирани во електрично проводлив течен носач. Течниот систем често користи регулација со воздушен притисок за стабилно работење и се состои од најмалку една млазна линија и линија на примероци за снабдување на проточната кивета.

Со влегување на примерокот во комората од проточната кивета, надворешната, брза млазна течност, хидродинамично ја фокусира течноста во тесен централен млаз од единечни честички до изворот на ексцитација (Слика 5.3). Оваа геометрија овозможува зголемена точност за позиционирање на точката од ласерското испитување, за постојаноста на ексцитирачкото зрачење и во голема мера го намалува блокирањето на честичките во проточната кивета. За инструментите само за анализа, проточната кивета има типична квадратна или правоаголна форма со димензии од редот на неколку стотици микрони. За сортерите течноста излегува од прскалката низ кружен отвор (обично со дијаметар 50 -200 микрометри) и се создава континуиран млаз пред да се распрсне во капки. Во зависност од дизајнот на инструментот, честичките се или испитуваат додека се во проточната кивета, или кога излегуваат и се задржуваат во млазот во воздухот. По испитувањето примерокот се исфрла во отпадот, освен ако не се побара сортирање на честичките. За да се одреди вклучувањето и чистењето на инструментот, обично е обезбедена вакум линија.

5.1.3. Оптички систем

Оптичкиот систем е клучен за проточната цитометрија - за осветлување на обележените и необележените честички како и за откривање (детекција) на распрсканите и флуросцентните светлосни сигнали.

Ексцитација и емисија. Повеќето проточни цитометри користат еден или повеќе ласери за клеточна ексцитација. *Емисијата*, во форма на светлосно распрснување, се јавува кога светлината од ексцитацијата е абсорбирана и потоа повторно распространета од честичките кои ги испитуваме, без промена во брановата должина. Распрскувачот е, типично, најсилен во директното насочување, во однос на инцидентната дразба од изворот. *Флуоресценција* се јавува кога молекулата е надразнета од светлината со една бранова должина, а се враќа на пониско ниво со емитирање на светлина со подолга бранова должина. Светлината од емисијата и ексцитацијата, која во тој момент е од вишокот бранови должини, може да биде блокирана или диференцирана со оптички филтер. Некои клеточни компоненти можат да се измерат со примена на неколку извори на ексцитација и неколку клеточни обележувачи кои емитираат на различни бранови долдини. Оваа клучна способност за откривање (детектирање) на флуросценција, истовремено од повеќе различни компоненти врзана за една или повеќе клетки, доведува проточната цитометрија да биде техника на избор за повеќепараметарски флуросцентни анализи на клеточните популации.



Слика 5.4: Дихроични филтри (горе) и апсорпциски филтри (долу) овозможуваат просторно одвојување на светлината.

Собирање на светлината. Во вообичаените проточни цитометри,светлината се собира преку две леќи, наречени предна и странична леќа за собирање, зависно од нивната поставеност кон влегувачкиот ласерски сноп светлина. Предната собирачка леќа ја собира распрснатата светлина околу центарот на влезниот сноп. Податоците од оваа леќа се користат за определување големината на честичките. Страничната собирна леќа има голем отвор за ефикасно собирање на флуоресценцијата и собира светлина поставена 90 степени (перпендикуларно) на светлосниот ласрски сноп. Страничното собирање се користи за разликување на клетките врз основа на нивниот изглед (морфологија).

Оптички филтри. Кога флуоресцентната светлина од клетката е уловена од собирачките леќи, спектралниот дел кој не интересира за секој обележувач мора просторно да се одвои заради детекција. Ова одвојување на брановите должини се постигнува со дихронични (45 степени) и емисиони филтри. Долгобрановите филтри дозволуваат трансмисија на долги бранови должини, а краткобрановите на кратки бранови должини. Селективните филтри дозволуваат поминување на одредени бранови должини кои ни се од интерес, додека останатите несаканите бранови должини не ги пропушта (Слика 5.4).

Детектори. Двата главни типови на фотодетектори кои се користат во проточната цитометрија се силиконските фотодиоди и фотомултипликациски цевки. Силиконските фотодиоди обично се користат за насочено распрскувачка детекција, каде што нивото на сигналот е висок. Додека фотомултипликациските цевки имаат висока сензитивност, и затоа се задолжени за страничниот распрскувач и флуросцентната детекција.

Електроника. Улогата на електрониката е за надгледување и контрола на работењето на проточниот цитометар, од моментот на откривање на честичката која поминува низ фокусот на ласерот, до физичкото скршнување на таа честичка во садот за собирање. Кога честичката од интерес поминува низ фокусот, флуоресцира, и е забележана од фотодетекторот, се создава електричен сигнал, а електрониката го обработува тој сигнал. Овој инструмент се вклучува кога овој сигнал го надминува однапред одреденото ниво на шумот. Овој шум се користи првенствено за да ги отфрли случувањата кои не се предизвикани од честичките, како шумови од оптичките и електронски извори. Пулсните карактеристики се детерминирани од големината и брзината на честичките, ширината на осветлувачкиот бран, а во случај на флуросценција, од диструбуција на флурохроми во честичката.

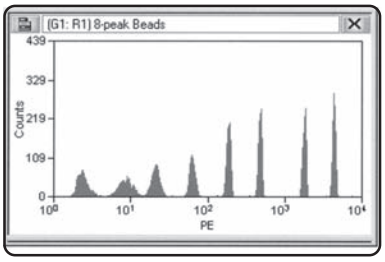


Слика 5.5: Особини на пулсните мерења.

Различните форми на обработка на пулсните карактеристики овозможува различните мерења да се направат од ист сигнал како висина на врв, интеграл (површина), ширина, косина, итн (Слика 5.5). Во некои случаи, линеарната амплификација и анализата на флуросценцијата или распрснувањето е соодветна со особините на честичките, како што е случај кај ДНК испитувањата. Во многу случаи, како кај студиите на имнунофенотипизација, мерењето и

на обележените и необележените честички, бара мерење на повеќе големини. За да се постигне овој широко динамичен ранг, се користат различни аналогни, дигитални или хибридни електронски системи за обработка на сигналот. Аналогните апарати, како логаритмичките амплификатори, обезбедуваат висока амплификација на мали сигнали, и единечна амплификација на големи сигнали, додека апаратите за обработка на дигиталните сигнали се користат за дигитализација на пулсните параметри. Некои инструменти користат комбинација од аналогни и дигитални електронски елементи за да се искористат предностите на двете направи. Времената каклкулацијата и способноста за донесување одлука овозможува и двете функции да се одвиваат со голема брзина.

Софтвер. Првите проточни цитометри користеа осцилоскоп за едноставни покажување на висината на пулсните карактеристики и нивна анализа. Денес, повеќето инструменти користат софтвер за контрола на инструментот, складирање, анализирање и прикажување на податоците.



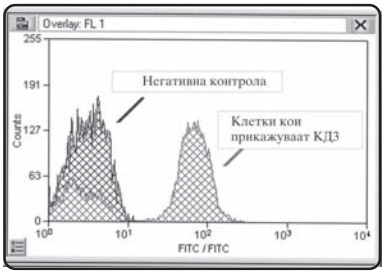
Слика 5.6: Флуоресцентна шема (хистограм) со 8 врва за ПЕ параметарот. Внатре во хистограмот има честички кои се дистрибуирани на база на детектираниот интензитет на боја. Оние кои што емитираат појак сигнал се поставени на повисоките канали по должина на X оската, додека послабите се лоцирани во пониските канали.

5.1.4. Анализа на податоците

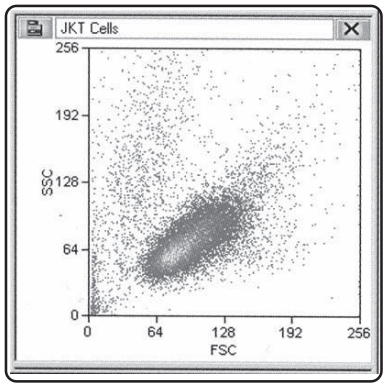
Проточниот цитометар во комбинација со моќен софтверски програм им овозможува на истражувачите софистицирана метода за брзо собирање и анализирање на податоци за голема популација клетки. Комерцијалните инструменти се достапни и можат да обработат преку 70.000 честички (партикли) во секунда и да ги откријат со помош на девет флуоресцентни бои и два распрснувачи на светлина. Способноста да се анализираат повеќекратни (мултипли) параметри, симултано за една дадена клетка, им овозможи на истражувачите подобро да ги разберат комплексните клеточни процеси како што се: онкогенезата, апоптозата или клеточната регулација со помош на фенотипски дефинирани популации.

5.1.4.1. Анализа

Денешните софтверски програми даваат можност за прикажување и анализирање на податоците од проточната цитометрија. Една од опциите вклучува хистограм каде истражувачот може да гледа во проточната шема само еден параметар од една популација. Хистограмот прикажан на Слика 5.6 ни прикажува фикоеритрин (phycoerythrin – PE) флуоресцентна шема за примерок од 8-врва (шилци). Кога се анлаизира со проточен цитометар, овие врвови се дизајнирани така да ни прикажат осум различни популации со различни флуоресцентни интензитети. Врвовите се индуцирани од 488 нм ласер, а податоците се складираат и се зачувуваат со користење на логаритамска скала. За употреба на податоците, вклучувајќи ги и флуоресцентните 8-врва, податоците од логаритамските скали подобро е да бидат прикажани на линеарна скала. Ова е вообичаено кога се работи со флуорохроми за да се прикаже просторното собирање на изложената флуоресценција.



Слика 5.7: Препокривање. Лимфоцитите се одбележени и анализирани со ФИТЦ конјугирани против-ЦД3 противтела.



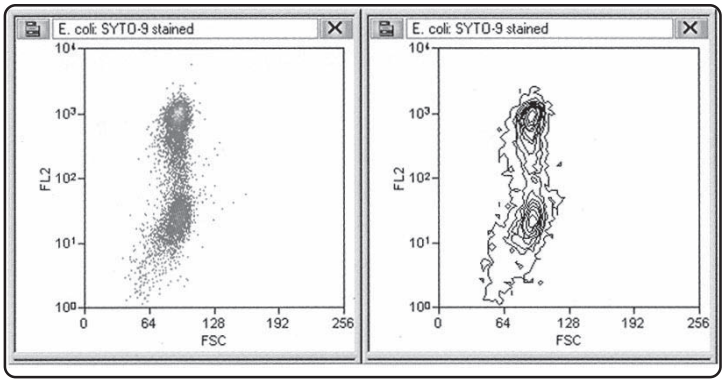
Слика 5.8: Графикон од точки од Јуркатови Т-лимфоцити.

Препокривањето формира специјализиран тип на хистограм кој дозволува (дава можност) за симултано прикажување податоци од бројни примероци (Слика 5.7). Со овој приод, одделни примероци можат да се споредуваат врз основа на одреден флуоресцентни параметри или да се изврши преглед на податоците. Неколку примени кои се предност на овој тип анализирање вклучуваат прикажување на специфични протеини од гените, идентификација на клеточни линии со неправилно (со аномално) генско прикажување, или следење на генското прикажување во одредена популација како одговор за надворешните фактори, како што се биолошките значајни составни делови.

Точките и густината на цртежите даваат можност за взаемна врска и да се утврди флуоресцентната информација симултано за два параметра. На пример, оваа шема од точки на Јуркат (JKT) Т-лимфоцити користи преден и страничен параметар од распрскувачот на светло. Сигналот од предниот распрскувач (ФСЦ) настанува од прекршените зраци во предната насока како што клетките поминуваат низ точката на ласерското испитување и вообичаено се заробува (фаќа) со помош на фотодиода поврзана со (или во пар со) жлеб или група на филтри со конфигурација(структура) за емисија на спектрум од изворот на светлина. Овој параметар е во корелација со големината на честичката, додека стра-ничниот распрскувач на светлина (ССЦ) служи за клеточната гранулираност или внатрешната морфологија на клетката или честичката (Слика 5.8).

Наизменичните методи за прикажување податоци се достапни за две-параметарски шеми. Една од опциите е обликот(рељефот), кој ни прикажува податоци за низа (серија) од клеточни линии, нешто слично на тоа што се набљудува со топографски мапи. Рељефната шема е во корелација со дистрибуцијата и нивото на густина на клетките или честичките внатре во шемата и можат да се користат за олеснување (помагање) на анализата на податоци или да се скицира (зацрта) популацијата која ни е од интерес (Слика 5.9:десно).

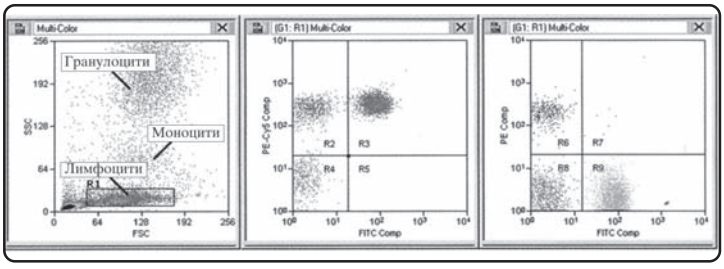
Различни статистики се достапни за анализа на податоците внатре во хистограмите и шемите од точки. Статистиката вклучува вкупни пресметки, популациски проценти, просекот, средината, коефициентот на варијација (КВ) и стандардната девијација. На пример, вкупната пресметка и



Слика 5.9: Шема од точки и облик за E.coli одбележени со боја нуклеинска киселина, SYTO-9.

процентот за специфична клеточна популација можат да се искористат во клиничката дијагноза на болеста. Во случај на ХИВ инфицирани пациенти утврдувањето (проценувањето) на Т клеточната експресија на ЦД4и ЦД8 може да се користи за да се утврди имунолошката состојба на пациентот. Статистичкиот исказ на коефициентот на варијација традиционално се користи заедно со врвовите на калибрацијата и дневната контрола на квалитетот во инструментот, а истотака може да се користи и за квантифицирање на флуоресцентниот интензитет на клетките со користење на стандардни калибрациони единици или молекули на еквивалентен солубилен флуорохром (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF)).

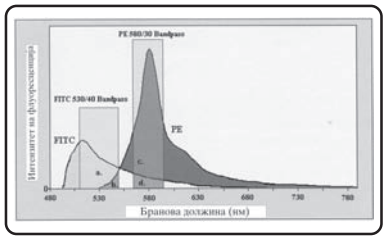
За да се направи статистика за субпопулациите, внатре во хистограмите можат да се создадат подрачја. Во случај на дијагноза на болест, клиничарите често се потпираат на статистиките од различните лимфоцитни подсетови за да окарактеризираат и третираат многу типови на леукемии и лимфоми. Најголем дел од студиите за овие пореметувања се базираат на идентификација на клетките кои содржат одредени шеми за прикажување (експресија) на површинските клеточни протеини. Факторите како што се целосен број на клетки, проценти на популација, светлина (бистрина) или флуоресцентни разлики меѓу популациите и статистичкиот однос (сооднос) помеѓу популациите, можат да се искористат за да се анализираат и квантифицираат податоците.



Слика 5.10: Шема од точки и Порти за анализа на лимфоцитни субпопулации. Податоците се компензирани за да се коригира флуоресцентното преклопување помеѓу флуорохромите.

Регионите може да се користат и за создавање и примена на порти. Портите моде да вклучуваат еден или повеќе региони и се користат примарно за минимизирање или елиминирање на надворешни (неважни) случувања внатре во шемата за анализа или да се изолираат специфични клетки и партикли кои ни се од интерес. Некои софтверски програми истотака овозможуваат да се избираат бои за тие настани кои се наоѓаат внатре во одреден регион или порта, а според тоа ни се овозмодува лесна идентификација на оние клетки кои се во други хистограми или шеми со точки.

Шемите на Слика 5.10 ни илустрираат патека на полна крв која е анализирана со проточна цитометрија. Платото на левата страна ни прикажува малку од целата клеточна популација и може да се идентификува со користење на предните и страничните распрскувачки параметри. Во овој експеримент клетките се обоени со флуоресцентно обележени противтела насочени кон специфични површин-



Слика 5.11: Графикон на спектрално емитирање. Полињата б и д ни го покажуваат очекуваното прелевање во ФИТЦ и ПЕ детекторите.

ски клеточни противгени, специфично FITC – конјугирано противтело против CD3, PE-конјугирано противтело кон CD19, и PE-Cy5 конјугирано противтело против CD45.

Создадена е порта специфична за лимфоцитна популација (R1) и истата се применува за други хистограми кои содржат експериментално доста значајни параметри. Ова овозможува идентификација и анализа на лимфоцитните субпопулации кои прикажуваат на својата површина различни протеини. Средишната слика ни ги идентификува оние лимфоцити кои прикажуваат или CD3 или CD19 противген. Лимфоцитите кои прикажуваат CD3 се зелени (долу десно), оние кои прикажуваат CD19 се сини (горе лево), а оние кои не прикажуваат ниеден од овие протеини се со виолетова боја (долу лево) (на Сликата 5.10 десно, сите се во сиви нијанси). Оваа можност за симултано анализирање на мултипли параметри за дадена клеточна популација е една од најголемите придобивки од користењето на проточната цитометрија.

5.1.4.2. Надомест (компензација)

Кога се спроведува повеќеобоен (мултиколорен) експеримент мора да се земе во предвид можноста за флуоресцентно мешање и попречување кое се создава како резултат од боење или од флуорохромите кои се состојат од блиско или од преклопувачко емитување на спектар.

Многу програми во проточните цитометри имаат алгоритми кои можат математички да ги корегираат спектралните преклопувања. Во светот на проточната цитометрија овој процес е познат како надомест (компензација). Ова се однесува на специфични софтверски или хардверски постапки кои математички ги отстрануваат флуоресцентните преклопувања за да се поедностават толкувањата на повеќеобоените податоци и да се разликуваат популациите во двојно-параметарскиот хистограм (Слика 5.11). Една од придобивките од овој процес е дека на крај им овозможува на истражувачите подобро да ги скицираат популациите, врз основа на прикажување или неприкажување на специфични клеточни компоненти, како што се повр-шинските клеточни противгени.

5.1.4.3. Складирање податоци

Предност на проточната цитометрија е можноста за симултана детекција и анализа на мултипли параметри. Информациите собрани од голем број комерцијални проточни цитометри се зачувани во стандардизирани досијеа познати како FSC (Flow Cytometry Standard). Прифаќањето на ова униформирано досие им даде на истражувачите можност да собираат податоци од различни инструменти, а потоа да ги анализираат податоците користејќи различни софтверски програми.

5.1.5. Проточно сортирање клетки

Употребата на сортирачката проточна цитометриска технологија привлекува внимание во разновидни сегменти од биологијата и индустријата.

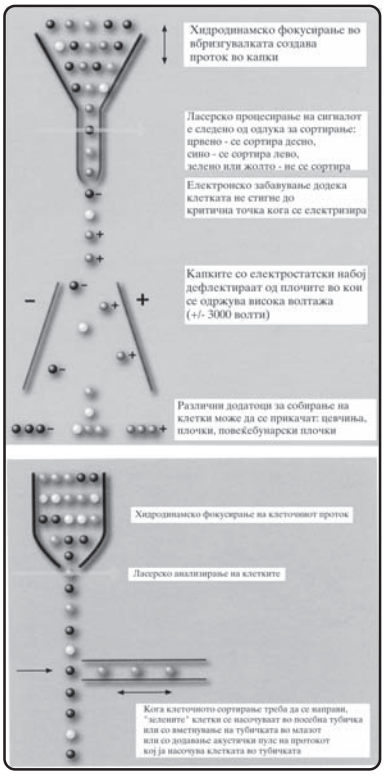
Засега оваа технологија овозможува моќна и уникатна способност за брза изолација на чисти популации клетки или честички со посакуваниот (побараниот) сет на биолошки карактеристики. Потоа овие популации се достапни за морфолошко или генетско испитување, како и за функционални и терапевтски анализи.

Историски гледано, оваа технологија била развиена за да се олесни сортирањето на клетки и други честички, а многу брзо е прифатена и искористена во испитувањата кои се користат во имунологијата за прочистување на лимфоцитните подтипови. Оттогаш па наваму примената на оваа технологија постојано се проширува, така да тековното подрачје за употреба се движи од еколошко следење до индустриско создавање ензими.

Постојат два метода за сортирање честички со проточната цитометрија: електростатски и механички метод.

Во ***електростатскиот метод*** (Слика 5.12 горе), честички се исфрлаат низ прскалка и се присилуваат да се разделат во вид на капка со употреба на вибрации во самата прскалка. Капките содржат честички кои можат да скршнат од главната насока на движење со примена на полнеж во самите капки.

Со ***механичкиот метод*** (Слика 5.12 долу), честичките кои ни се од интерес се пренасочуваат или со движење на капилара за фаќање или се отклонуваат со помош на акустичен (звучен) пулс во фиксирана капилара.



Слика 5.12: Електростатско сортирање (горе) и механичко сортирање (долу).

5.2. Функционален тест за клетки природни убијци (КПУ)

5.2.1. Основи на тестот

Во овој тест како целни клетки се употребува клеточната линија K562 добиена од пациент со хронична миелоидна леукемија во терминална бластна криза. Ваквите целни клетки не поседуваат класа 1 и класа 2 молекули од ГТСК и се исклучително осетливи кон дејството на КПУ.

Основно кај секој тест со кој се испитува цитотоксичната активност е да се прави разлика помеѓу ефекторните и целните клетки. Поради тоа клетките од K562 клеточната линија се обоени со зелена флуоресцентна боја, која се позиционира во нивната мембрана. Оваа боја не се врзува за ефекторните клетки.

Литичкиот процес е карактеризиран од неколку фази: препознавање на целната клетка, врзување на ефекторната клетка за целната, активирање на процесите кои ќе доведат

до лиза и умирање на целната клетка. КПУ ги убиваат целните клетки или преку механизмите засновани на дејството на перфорините и гранзимите или преку директно/индиректно активирање на апоптозата во целната клетка. По инкубацијата на ефекторните и на целните клетки во смешата се додава црвена флуоресцентна боја за боење на ДНК. Оваа боја ги обојува само оние клетки кои имаат оштетена клеточна мембрана. На овој начин можат да се разликуваат четири популации клетки: живи целни клетки, мртви целни клетки, живи ефекторни клетки и мртви ефекторни клетки. Оттука може да се пресмета со-односот помеѓу ефекторните и целните клетки. Рутински, за одредување на цитотоксичната активност, се пресметуваат само ФЛ1 позитивните сигнали (мртви и живи целни клетки).

5.2.2. Протокол за работа

5.2.2.1. Општи подготовки

1. Се загрева воденото купатило на 37^{0}Ц.
2. Се загрева комплетниот медиум на 37^{0}Ц.
3. Во купатилото со мраз се стават носачите за епруветите.
4. Се вклучува и се калибрира проточниот цитометар.

Од особено значење е да постои прецизна контрола на температурата.

5.2.2.2. Изолација на ефекторните клетки (Слика 5.13)

Со венепункција од секој пациент се зема по 5 мЛ хепаринизирана крв. Земањето на крв мора да биде во асептични услови. Ефекторните клетки се издвојуваат со помош на Ficoll-Hypaque (со густина 1.077).

Добиениот талог после второто центрифугирање се ресуспендира во 1 мЛ комплетен медиум, се бројат клетките и нивниот број се дотерува до 5x10^6 клетки/мЛ комплетен медиум.



Слика 5.13: Изолација на лимфоцити од периферна крв (ефекторни клетки) за користење во тестот за КПУ.

5.2.2.3. Одмрзнување на K562 клеточната линија (Слика 5.14)

За да се добијат вијабилни целни клетки неопходно е одмрзнувањето на K562 клеточната линија да биде брзо.

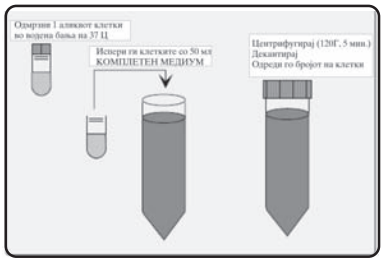
1. Пластичната епрувета од 50 мЛ се полни со 50 мЛ претходно загреан на 37^0Ц комплетен медиум.

2. Се одмрзнува едно шишенце целни клетки. Одмрзнувањето треба да биде во водена бања, за време од 20-60 секунди, со континуирано мешање.

3. Откога ќе се растопи, шишенцето се отстранува од водената бања. Неговата содржина се префрла во епрувета која содржи 50 мЛ комплетен медиум. Епруветата внимателно се меша.

4. Клеточната суспензија се центрифугира 5 минути на 120 г. Супернатантот се фрла.

Клеточниот талогот се ресуспендира во 1 мЛ комплетен медиум. Се бројат клетките и се дотеруваат до концентрација од $1x10^5$/мЛ комплетен медиум.



Слика 5.14: Одмрзнување K562 целни клетки за користење во тестот за КПУ.

5.2.2.4. Подготовка на примерокот за мерење (Слика 5.15)

Ефекторните клетки (Е) се мешаат со K562 целните клетки (Ц) во определени соодноси почнувајќи од 50:1 па се до 12.5:1 (Табела 5.1). Смешата од ефекторните и целните клетки (во краен волумен од 200 мкЛ) се инкубира.

Табела 5.1: Шема за подготовка на контролните и испитуваните примероци.

Соднос Е:Ц клетки	Суспензија од ефекторни клетки (мкЛ)	Суспензија од целни клетки (мкЛ)	Комплетен медиум (мкЛ)
50:1	100	100	0
25:1	50	100	50
12.5:1	25	100	75
Контрола	0	100	100

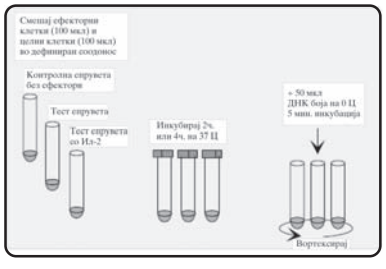
1. Се пипетира смешата од ефекторни/целни клетки во епрувети (12x75 мм) според шемата дадена во Табела 5.1. Во една епрувета се додаваат само целни клетки (контролен примерок). Оваа епрувета ќе ни служи како контрола за да видиме колку од целните клетки ќе лизираат сами од себе за времето за кое се изведува тестот (на пр. поради староста на клетките, нивната вијабилност, дејството на некои компоненти од медиумот и др.)

2. Во некои од примероците се додава по 30 мкЛ интерлеукин-2 (200 Е/мЛ). Овие примероци ни служат како "високи контроли". Интерлеукинот-2 секогаш треба да се додаде во суспензијата од ефекторни клетки пред да се додадат целните клетки.

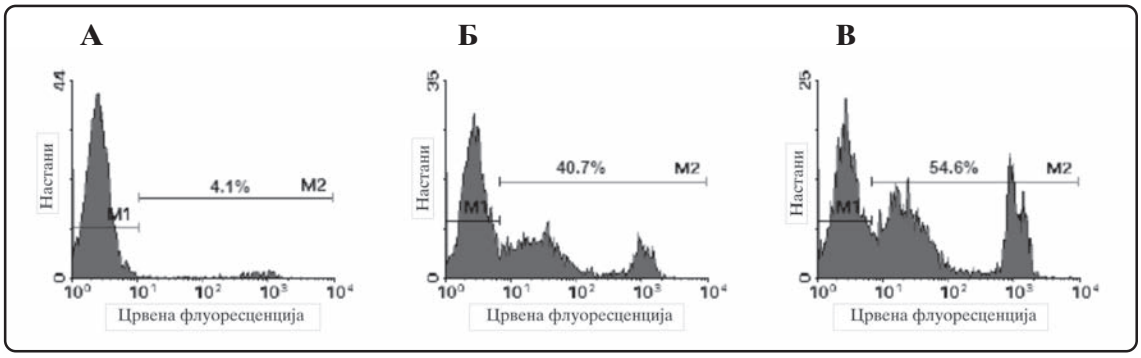
3. Сите епрувети се центрифугираат 2-3 минути на 120 г.

4. Потоа сите епрувети се инкубираат во инкубатор, во атмосфера со 5% CO_2 во времетраење од 120 или 240 минути. По инкубацијата епруветите се префрлаат на мраз и така се чуваат се додека не се почне со мерењето.

5. Во секоја од епруветите се додава 50 мкЛ боја за боење на ДНК. Епруветите се мешаат и се инкубираат 5 минути на 0^0Ц (во купатило со мраз, заштитени од светлина). Клеточната суспензија се мери во рок од 30 минути по додавањето на бојата за обојување на ДНК молекулата.



Слика 5.15: Изведување на функционалниот тест за КПУ.



Слика 5.16: Типичен ФЛ хистограм на функционалниот тест за КПУ.

5.2.2.5. Мерење и анализа на податоците добиени со проточниот цитометар

Клетките се анализираат со проточен цитометар кој користи плаво-зелено ексцитирачко светло (480 нм аргон-јонски ласер).

Мерење. Во текот на прибирањето на податоците "Live" капијата се позиционира во ФЛ1 хистограмот на зелените флуоресцентни целни клетки, за да може да се направи разлика помеѓу ефекторните и целните клетки. За оваа цел се употребува контролната епрувета која содржи само целни клетки. Бидејќи ФЛ1 интензитетот на флуоресценцијата од мртвите клетки опаѓа за одреден степен, долната граница на каналот треба да се постави онака како што е прикажано на Слика 5.16А. Од секоја епрувета треба да се измерат најмалку 2500 целни клетки.

Анализа на податоците. Се анализира процентот на мртви целни клетки (= ФЛ2 или ФЛ3 позитивни). Црвената флуоресценција која потекнува од обојувањето на ДНК молекулите може да се открие со помош на ФЛ2 или ФЛ3 каналот. За оваа цел капијата за анализа се поставува во ФЛ3/ФЛ1 делот околу сите живи и мртви целни клетки (Слика 5.16Б).

Процентот на специфичната цитотоксичност се пресметува преку одземање процентот на мртви клетки измерени во инкубираната епрувета која содржи само целни клетки (контролниот примерок, Слика 5.16А) од процентот на убиени целни клетки измерен во епруветите со примерокот од пациентот (Слика 5.16Б, В).

Табела 5.2: Шема за внесување резултати од изброени клетки со проточен цитометар.

Вид на клетки	Број	Процент
Вкупно		
КД3+		
КД4+		
КД8+		
КПУ		

5.3. Задача

Измери го бројот на КД3+, КД4+, КД8+ и КПУ со помош на проточен цитометар и вредностите внеси ги во Табелата 5.2.

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 6: ТОЛКУВАЊЕ РЕЗУЛТАТИ ОД КЛЕТОЧЕН ИМУНИТЕТ

6.1. Нормални вредности на бели клетки

Нормалните вредности на белите клетки (неутрофилите, еозинофилите, базофилите и моноцитите), вкупните лимфоцити, Т-лимфоцитите (КД4+ и КД8+), Б-лимфоцитите и тромбоцитите се дадени на Табела 6.1.

За поголемиот број бели клетки нивниот број варира според возраста, а се искажуваат како апсолутен број клетки во еден литар крв, или како процент од сите бели клетки.

Методите за определување бројот на белите клетки се различни, почнувајќи од наједноставните со хемоцитометар и комора, преку автоматизираните бројачи до методите со проточна цитометрија.

Табела 6.1. Нормален број на бели клетки и тромбоцити во периферна крв од луѓе.

Тест	Возраст	Нормални вредности
Бели клетки (БК) (леукоцити)	<12 мес. 1-6 год. >6 год.	6.4-11.0×10^9/Л 6.8-10.0×10^9/Л 4.0-11.0×10^9/Л
Неутрофили		2.0-7.5 ×10^9/Л 40-75% БК
Еозинофили		0.4-0.44×10^9/Л 1-6% БК
Базофили		00.1-0.10×10^9/Л 0-1% БК
Моноцити		0.2-0.8×10^9/Л 1-10% БК
Вкупни лимфоцити	<12 мес. 1-17од. >17год	2.7-5.4×10^9/Л 2.0-4.1×10^9/Л 20-45% БК 1.6-3.5×10^9/Л
Т лимфоцити	1-6 год. 7-17 год. >17 год.	2.7-5.3×10^9/Л 2.0-2.7×10^9/Л 1.6-2.4×10^9/Л
КД4$^+$	<12 мес. 1-6 год. >6 год	1.7-2.8×10^9/Л 1.0-1.8×10^9/Л 0.7-1.1×10^9/Л
КД8$^+$	0-6 год. >6 год.	0.8-1.5×10^9/Л 0.5-0.9×10^9/Л
Б лимфоцити	0-6 год. >6 год	0.6-1.4×10^9/Л 0.2-0.5×10^9/Л
Тромбоцити		150-400×10^9/Л

6.2. Имунофенотипизирање

6.2.1. Вовед

Под имунофенотипизирање на биолошките примероци се подразбира употреба на имунолошки материи (на пр. моноклонски и/или поликлонски противтела) за специфично откривање на противгените. Овие противгени, кои најчесто потекнуваат од протеините, се прикажани врз клетките или врз други честички (на пр. апоптотичните телца) и се локализирани или на нивната површина или во нивната внатрешност. Во споредба со порано употребуваните методи, проточната цитометрија е поедноставна за изведување, поосетлива е и ни овозможува истовремено квантитативно одредување на повеќе противгени во голем број клетки. Нејзиниот главен недостаток е што има потреба од еднородна клеточна суспензија. Исто така, информациите кои ги добиваме за морфологијата и локализацијата на молекулите внатре во клетката се ограничени. Поради ова проточната цитометрија поголема примена наоѓа во испитувањето на хематопоетските клетки одколку на клетките кои потекнуваат од органите или од ткивата.

Денеска имунофенотипизирањето со проточната цитометрија наоѓа широка примена. Со боењето на клетките со помош на противтела можат да се идентифицираат, да се избројат и да се карактеризираат било кои клетки или субклеточни елементи. Во последните години проточната цитометрија најчеста примена нашла во хематологијата и имунологијата (Табела 6.2).

Табела 6.2: Клиничка примена на имунофенотипизирањето со проточна цитометрија.

Заболување	Дијагноза	Класификација	Прогноза и/или определување на стадиум	Следење на заболувањето
Акутна леукемија	Да	Да	Контроверзно	Да
Хронично лимфопролиферативно растројство	Да	Да	Да	Да
Миелодисплазија	Се утврдува	Не	Се утврдува	Не
Пароксизмална ноќна хемоглобинурија	Да	Да	Не	Да
Мастоцитоза	Да	Да	Не	Да
Примарни тромбоцитопатии	Да	Контроверзно	Да	Не
Првични имунонедостатоци	Да	Да	Не	Не
ХИВ инфекција	Не	Да	Да	Да
Исход при пресадување	Да	Да	Да	Да

Дијагностичкото значење на дефинирањето на клетките од крвта со користење на противтела произлегува од точноста, објективноста и високата репродуцибилност на техниката.

Имунофенотипизацијата е од критично значење за иницијална дијагноза и класификација на акутни леукемии, хронични лимфопролиферативни болести или малигни лимфоми, имајќи предвид дека терапевтскиот пристап кај овие болести во многу зависи од противгенските параметри. Понатаму, имунофенотипизацијата овозможува прогностички информации кои не се достапни со други техники, следење прогресијата на болеста кај болни после хемотерапија или трансплантација на коскена срцевина и често овозможува откривање минимална резидуална болест. Проточно цитометриските анализи за апоптоза, отпорност кон лекови, цитокински рецептори и други параметри би можеле да обезбедат дополнителни дијагностички или прогностички информации во блиска иднина (Табела 6.3).

Табела 6.3: Дефинирање на крвните клетки со помош на моноклонски противтела.

Тип на клетки	Противтелна реактивност	Број/мкЛ
Леукоцити	КД45	4000-11000
Гранулоцити	КД13, КД33, КД65	2000-8000
- неутрофили	КД15, КД16	2000-7500
- еозинофили	КД16-	50-700
- базофили	$КД45_{слабо}$, КД13, КД24	50-200
Моноцити	$КД4_{слабо}$	200-800
- големи	$КД14_{јако}$, $КД16_{слабо}$, КД64	
- мали	$КД14_{слабо}$, $КД16_{средно}$, КД64	
Дендритични клетки	$КД4_{слабо}$, КД3-, КД14-, КД16-	
Лимфоцити		1200-3500
- Т клетки	КД3	850-3000
- Т помагачки	КД4	400-2000
- Т цитотоксични	КД8	200-1000
- Б клетки	КД19, КД79	100-800
- КПУ клетки	КД16 и/или КД56, КД2, КД8, КД3-	100-1000
Нормобласти	КД45-, КД71	$3,8\text{-}5,2*10^6$
Еритроцити	КД45-	$30\text{-}120*10^3$
Ретикулоцити	КД71	$150\text{-}400*10^3$
Тромбоцити	КД41, КД42, КД61, КД45-	1-2
Прогениторни клетки	$КД34, КД45_{слабо}$	

6.2.2. Дијагноза на хематолошки малигнитети

Леукемиите претставуваат абнормална пролиферација на хематопоетски клетки заробени во одредена фаза на клеточната диференцијација. Класифицирани се во акутни или хронични форми во зависност од клиничките и лабораториските анализи. Врз основа на морфолошките и имунофенотипските карактеристики на аберантните клетки, леукемиите понатаму се делат на повеќе подтипови.

Имунофенотипизирањето на малигните хематолошки заболување е една од најчестите клинички примени на проточната цитометрија. Неговата примена е фокусирана на карактеризирањето на малигните клетки и класификација на заболувањето, откога претходно ќе биде поставена дијагнозата за постоење на леукемија/лимфома. Во текот на овој период имунофенотипизирањето е од голема помош во:

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Т-клеточен лимфом: Случајот на Донка Момировска, последица од незадржлив раст на цитокин создавачки клон од Т-лимфоцити.

1) разликувањето помеѓу лимфоидна и миелоидна леукемија, особено ако постои сомнителен/нејасен морфолошки и цитохемиски наод;

2)субкласификациите на акутните лимфобластни леукемии;

3) дијагноза на субтиповите на минимално диференцираните еритроидни и мегакариоцитни акутни миелобластни леукемии; и

4) препознавање на Т и Б клеточните хронични лимфопролиферативни растројства.

Имунофенотипизирањето на малигните хематолошки заболувања со помош на повеќепараметриската проточна цитометрија е високо сензитивен и специфичен метод за идентификација на малигните клетки, дури и кога тие се присутни во многу мал број помеѓу мноштвото на нормални

Табела 6.4: Фрекфенција на аберантните фенотипови кај малигните хематолошки заболувања откриени со проточна цитометрија.
НА: не се анализирани на голем примерок.

Хематолошко малигна заболување	% на аберантни случаи
Б-прекурсорна акутналимфобластна леукемиа	>95%
Т клеточна акутна лимфобластна леукемија	>99%
Акутна миелобластна леукемија	>75%
Бифенотипска акутна леукемија	100%
Б клеточно хронично лимфопролиферативно растројство	>95%
Хронични Т клеточни лимфопролиферативни растројства	НА
КПУ - големи грануларни лимфопролиферативни растројства	>40%
Моноклонски гамопатии	>90%
Миелодиспластични/миелопролиферативни растројства	НА

хематопоетски клетки. Ова е поради тоа што кај малигните хематопоетски клетки има прикажување на аберантни фенотипови. Со леукемија/лимфома асоцираните фенотипови (на пример, вкрстеното прикажување на линиските противгени, асинхроното прикажување на противгените,

Табела 6.5: Имунофенотипски карактеристики на Б-клеточни лимфопролиферативни болести.

	сИг	КД5	КД10	КД11ц	КД23	КД43	КД103	Циклин-Д
CLL/SLL	Слабо	+	-	-	+	+	-	-
MCL	Јако	+	-	-	-/+	+	-	+
FL	Јако	-	+	-	-	+/-*	-	-
MZL	Јако	-	-	+/-	-	+/-	-	-
HCL	Јако	-	-	+	-		+	-
PL	Јако	+/-	-	-	-		-	-
LPL	Јако	-	-	-	-	+/-	-	-

Легенда:

sIg – мембрански имуноглобулин; CLL – хронична лимпхоцитна леукемија; MCL – mantle cell лимфом; FL – фоликуларен лимфом; MZL – лимфом од маргинална зона; HCL – hairy cell леукемија; PL – пролимфоцитна леукемија; LPL – лимфоплазмоцитна леукемија.

прекумерното прикажување на противгените, ткивноограничените фенотипови, абнормалниот начин на созревање) многу лесно се откриваат со проточната цитометрија (Табела 6.4).

Табела 6.6: Имунофенотипски карактеристики на Т-клеточни лимфопролиферативни болести.

Легенда: MF- Mycosis fungoides; SS Sezary синдром; ATLL- Т клеточна леукемија/лимфом кај возрасни; ALCL- Анапластичен големоклеточен лимфом; ETL- Т-клеточен лимфом од тип ентеропатија.

	КД2	КД3	КД4	КД5	КД7	КД8	КД25	КД30
MF	+	+	+	+	-	-	na	na
SS	+	+	+	+	+/-	-	na	na
$ATLL_1$	+	+	+	+	-	-	+	+/-
$ALCL_2$	+	-/+	+	-	-	-	+	+
ETL_3	+/-	+	-	-	+	-/+	na	+/-

Постои голем број на различни противтела кои се користат за анализа на клеточните противгени кај хематолошките малигнитети. За потврдување на Б или Т-клоналноста на малигниот клон, се користат т.н. пан-Б панел кој вклучува противтела кон КД19, КД20 и КД22 (Табела 6.5) или пан-Т панел кој се состои од против-КД2, -КД3, КД4 и/или КД7 противтела (Табела 6.6), додека дополнителни панели или единечни противтела се користат за дефинитивно типизирање на специфичната лимфопролиферативна болест.

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Икс врзан тежок комбиниран имунонедостаток:
Случајот на Мартин Деливанов, без Т-Ли животот не може да се одржи.

6.2.3. Останати клонални/генетски хематолошки и имунолошки заболувања

Денес имунофенотипизирањето е една од примарните дијагностички методи за дијагностицирање на пароксизмалната ноќна хемоглобинурија, системската мастоцитоза, примарните тромбоцитопатии и имуните недостатоци. Кај сите овие заболувања генските абнормалности кои се присутни во клонските хематопоетски клатки се преведуваат како промени во фенотипот и во дистрибуцијата на нивните специфични популации. Ваквите фенотипски промени, кои се високо асоцирани со соодветните генски абнормалности, можат многу лесно да се идентификуваат со имунофенотипизирање со проточен цитометар.

И покрај фактот дека со имунофенотипизирањето не можеме да поставиме крајна дијагноза кај најголем број првичните недостатоци во имунолошкиот систем, тоа има големо значење како метода за скрининг. Бидејќи веќе извесно време се знае дека постои асоцијација помеѓу дистрибуцијата на различните популации лимфоцити од периферната крв, нивните имунофенотипови и промените во гените, се повеќе се употребува имунотипизирањето со проточната цитометрија за точна генска локализација на дефектот кај првичните имуни недостатоци. На пример, за идентификација на дефектот кај Икс-врзаниот синдром, кој се карактеризира со зголемена продукција на ИгМ, се повеќе се употребува имунофенотипизирањето со проточен цитометар за испитување на способноста на ин витро активираните Т лимфоцити да прикажуваат КД154.

6.2.4. Трансплантација

Имунофенотипизирањето со проточен цитометар во последно време се повеќе се употребува и во трансплантацијата, како на хематопоетски клетки така и на солидни органи. Таа се повеќе се употребува за броењето на КД34+ хематопоетските прогенитори, со цел да се контролира квалитетот на биолошките продукти кои се добиваат после трансплантацијата на коскената срцевина. Така, денес се знае дека одредување вкупниот број на КД34+/КД45дим хематопоетските прогенитори во трансплантантот е најсигурниот показател за преживување на калемот. Најновите студии покажаа дека врз преживувањето на калемот може да влијае и присуството на други типови клетки, различни од КД34+ прогениторите. Според тоа, се

покажало дека фрекфенцијата на тешките инфекции кај пациентите кои биле подложени на автологне трансплантација е директно поврзана со бројот на КД4+ Т лимфоцити присутни во калемот.

Уште една примена на имунофенотипизирањето со проточен цитометар во транспалантацијата е таканаречената вкрстена реакција. Со ваквата реакција се одредува присуството на против-ХЛА противтела во серумот на потенцијалниот дарител, се одредува нивниот титар и нивната специфичност.

6.2.5. Дијагноза и следење на инфективните заболувања и имуни недостатоци

Можеби најчестата примена на имунофенотипизирањето со проточен цитометар во дијагноза и следење на инфективните заболувања е неговата употреба за следење абсолутниот и релативниот број на КД4+ Т лимфоцитите кај заболените од СИДА. Кај овие пациенти идентификацијата на КД4+ Т лимфоцитите се базира врз боењето на примероците од периферната крв со против-КД45 моноклонски противтела во комбинација со против КД45 и/или против-КД3 моноклонски противтела. Покрај губењето на КД4+ Т лимфоцитите, кај болните со СИДА, има зголемување и на против-вирусниот имун одговор, претставено преку зголеменото создавање на цитокини и останати растворливи протеини. Сето тоа оди заедно со модулација на останатите протеини асоцирани со Т клеточната мембрана, како на пример КД38. Имено, се покажало дека средната вредност на КД38 молекулите, кои се прикажани врз мембраната на КД8+ Т лимофоцитите, се зголемува кај ХИВ позитивни пациенти. Денеска многу добро се знае дека зголемувањето на прикажувањето на КД38 врз КД8+ лимфоцитите не само што е независен прогностички показател за предвидување на прогресијата на болеста во СИДА и смртен исход, туку служи и за следење ефектот од терапијата кај ХИВ-1 позитивните пациенти кои примаат високо активна против-ретровирална терапија.

За жал имунофенотипизирањето со проточен цитометар сеуште не наоѓа поголема примена во дијагностицирањето и следењето на останатите инфективни заболувања. Сепак постојат напори за неговата примена во испитувањето на вирусно- и пептидно-специфичниот Т клеточен одговор кај имунодефициентни пациенти кај кои постои сомневање дека се инфицирани со цитомегаловирус, Епштајн-Баров вирус или со *Mycobacterium tuberculosis*. Во овие случаи се врши проценка на цитокинскиот одговор и идентификација на противген-специфичните Т лимфоцити со употребата на ХЛА-мултимери поврзани со специфични вирусни пептиди.

6.3. Толкување резултати од функционални тестови во клеточен имунитет

6.3.1. Функционален тест за клетки природни убијци

Овој тест служи за испитување цитотоксичната активност на клетките природни убици (КПУ). Во него како целни клетки се користат замрзнати (криопрезервирани) клетки од клеточната линија К562. За да можеме да ги разликуваме овие клетки од ефеторните, нивната мембрана се обележува со една зелена липофилна флуоресцентна боја. После инкубациониот период, убиените целни клетки ги препознаваме благодарение на обојувањето на ДНК млекулата во нивните јадра, бидејќи бојата за боење на ДНК молекулата може да продре во убиената клетка. На овој начин може да се одреди процентот на убиени целниклетки од страна на КПУ. На овој начин се испитуваат промените во активноста на КПУ кои можат да настанат кај различни заболувања или под дејство на некои лекови.

Клетките природни убици на почетокот биле дефинирани како "нулта" лимфоцити, кои своето цитотоксично дејство го остварувале врз некои туморски или вирусно заразени клетки, без да има потреба од присуство на класа 1 и класа 2 молекулите од главниот ткивно совпадлив комплекс (ГТСК) врз целните клетки. Околу 70-95% од клетките кои појавуваат активност карактеристична за КПУ морфолошки имаат изглед на големи гранулирани лимфоцити. КПУ на својата површина имаат ИгГ Фц 3 рецептор (КД16 противген) и КД56 NCAM противген. Поради ова имунофенотипски се дефинираат како $КД3^-$ и $КД16^+$ и/или $КД56^+$. Мора да се спомене дека и мал дел од Т лимфоцитите ($КД3^+КД56^+$) можат да појават активност карактеристична за КПУ.

Намалување активноста на КПУ е едно од многуте имунолошки нарушувања кое може да се сретне кај заболените од СИДА. Нарушувањето активноста на КПУ може да се сретне и кај болните од мултипла склероза, болните со системски лупус еритематозус, како и кај болните со синдромот на Сјогрен. Намалување активноста на КПУ се сретнува и кај болните од синдромот на хроничен замор, како и кај пациентите со Тип 1 шеќерната болест.

Депресија во активноста на КПУ може да се сретне и кај пациентите во напреднат стадиум на малигно заболување, при постоење метастази и кај пациенти со акутна/хронична леукемија. Одредување активноста на КПУ има прогностичко значење во можноста за развој на метастази кај болни со примарни тумори. КПУ играат централна улога и во одбраната од вируси. Золемување на нивната активност може да се јави при некои акутни вирусни инфекции.

Забележано е дека различни имуномодулатори (на пр. ИЛ-

2, интерферони) можат да ја засилат активноста на КПУ *ин вишро* и *ин виво*.

6.3.1.1. Очекувани резулшаши

Вредностите на нормалната цитотоксичната активност на КПУ со помош на анализи на еднојадрените клетки од периферната крв кај здрави лица. Резултатите се прикажани во Табела 6.7 (по инкубација од 2 часа) и Табела 6.8 (по инкубација од 4 часа).

Табела 6.7: Нормални вредност за активноста на КПУ после инкубација од 2 часа.

Соднос Е:Ц клетки	% на специфична активност	% на специфична активност после додавање на ИЛ-2 (6 Е/примерок)
12.5:1	5.6-14.3 (χ=9.9)	8.4-20.6 (χ=14.5)
25:1	9.9-26.1(χ=18.0)	14.8-33.4 (χ=24.1)
50:1	13.7-33.5 (χ=23.6)	23.2-48.0 (χ=35.6)

Табела 6.8: Нормални вредности за активноста на КПУ после инкубација од 4 часа.

Соднос Е:Ц клетки	% на специфична активност	% на специфична активност после додавање на ИЛ-2 (6 Е/примерок)
12.5:1	8.6-21.3 (χ=15.0)	13.2-37.7 (χ=25.5)
25:1	13.8-34.8 (χ=24.3)	24.0-54.2 (χ=39.1)
50:1	18.4-43.8 (χ=31.1)	33.6-67.6 (χ=50.6)

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

БЛОК 3 - ИМУНОГЛОБУЛИНИ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 7. ТАЛОЖНИ ПРОТИВТЕЛА - ИМУНОПРЕЦИПИТАЦИЈА (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да отчитаат резултат од РИД плочка;
- да пресметаат концентрација на имуноглобулин.

ВЕЖБА 8. ПРОТИВТЕЛЕН ОДГОВОР (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да избројат и пресметаат имуноглобулин М секретирачки спленоцити;
- определат имуноглобулински класи со имунонефелометар.

ВЕЖБА 9. АНАЛИЗА НА КЛЕТОЧЕН ИМУНИТЕТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од клеточен имунитет;
- анализираат случаи од клеточен имунитет.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

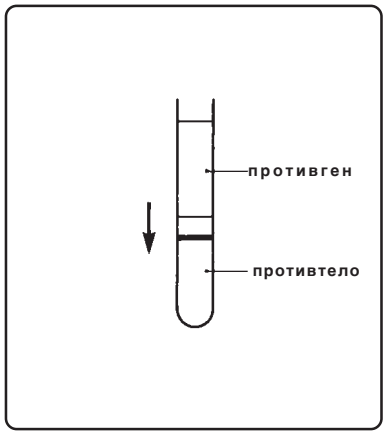
ВЕЖБА 7: ТАЛОЖНИ ПРОТИВТЕЛА - ИМУНОПРЕЦИПИТАЦИЈА

Имунолошката преципитирачка реакција е откриена од Kraus во 1897 год., а потоа поставена како имунохемиски метод од Heidelberger и Kendall во 1929 год. Помасовно се употребува во дијагностиката по неговото поставување како метод во гел средина (Oudin 1946, Mancini 1960, Laurell 1966). Денес имунопреципитирачките методи многу се перфекционирани и за определување на преципитирачките противтела се користат турбидометрија и нефелометрија. За постигнување на имунопреципитацијата покрај соодветниот квантитативен сооднос меѓу противгенот и противтелата, потребно е исполнување на определени физикохемиски услови што се: pH, T°Ц, јонски сили, соленост на средината и др. Имунопреципитацијата може да се изведува во течна и во гел средина.

Способноста на противтелата да ги исталожат (преципитираат) противгените од раствор е една од нивните најпознати карактеристики. Во овој процес се создава комплекс од вкрстена молекула противген-противтело која е преголема за да остане растворлива во растворот. Треба да се спомене дека таложење не настанува секогаш кога противтелото ќе дојде во допир со противгенот. Концентрацијата на противгенот и на противтелото кога настанува имунолошко таложење е во определени граници и се наречува "зона на еквиваленција". Надвор од овој сооднос, било кој од противгенот или противтелото да е во вишок, се формира само мал дел (растворлив) од нивниот заеднички комплекс. Во извесни случаи (кај моновалентни противгени и моноклонални противтела) никогаш не доаѓа до имунопреципитација.

7.1. Преципитација во течна средина

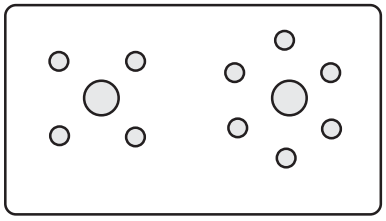
Преципитацијата во течна средина (преципитација во кругпрстен, "ring test") лесно е апликабилна кај солубилни противгени и преципитирачки противтела (слика 7.1).



Слика 7.1: Реакција на противген и противтело во течна средина (Oudin-ова реакција)

Во микроепруветка (висина до 1 cm) на дното се поставува серум и внимателно врз него се додава еднаква количина противген (на пр. 2 капки + 2 капки). Се поставува и контролен тест. За цело време на испитувањето, епруветките се поставени вертикално. По определена инкубација, со помош на странично светло на темна заднина, се чита реакцијата. Реакцијата е позитивна ако се појави преципитирачки прстен во интерфазата (на допирното место меѓу серумот и противгенот) за време од 5 мин. Во контролната епруветка не се појавува таков прстен.

7.2. Двојна имунодифузија на агар



Слика 7.2: Двата најчесто користени облици за испитување двојна имунодифузија.

Ова е една од наједноставните и доста информативни техникиа во имунологијата на противтелата. Се приготвува пуфериран агарозен гел, а противгенот и противтелото се внесуваат во одделни бунарчиња од агарот, оддалечени 0.5 до 2 см едно од друго. По инкубација од 12-48 часови се создава имунопреципитирачка линија меѓу противгенот и соодветното противтело. Предноста на оваа техника е што автоматски се создава концентрациски градиент на противгенот и противтелото во текот на дифузијата. Имунопреципитацискатa линија ќе настане некаде меѓу двете бунарчиња зависно од местото каде ќе се постигне еквивалентна концентрација меѓу противгенот и противтелото.

За изведување на методов потребни се следниве материјали и опрема: квадриперм пластични плочи, агар, сад со вода (заради рамнење на површината), солен фосфатен пуфер кој содржи 0.02% натриум азид(СФП-азид), вакуум пумпа, остра игла со рамен врв, серумски албумин 1 мг/мЛ во СФП-азид, против-хуман серум или против-хуман серум албумин, контролен пре-имун серум, водена бања, инкубатор за клетки.

Изведување:

1. Се приготвува 1% агар со загревање на 1 г агар во 100 мЛ СФП-азид во водена бања се додека комплетно да се ратсвори (прозирен раствор).

2. Се лади агарот на 45ºС во водена бања, се стават квадриперм плочите да пливаат во воденатa бања и во секоја преграда се внесуваат по 5 мЛ од агарот (да се користи пипета од 10 мЛ со широк врв). По израмнување на агарската површина, плочите се префрлаат во кадичка со ладна вода и таму се чуваат до зацврстување на агарозниот гел. Плочите се бришат и се стават во ладилник половина час за да се стврдне гелот.

3. Плочата се става врз цртеж (Слика 7.2) и со иглата приклучена на вакуум се приготвуваат бунарчиња. Во секоја преграда се прават по три групи бунарчиња.

4. Се приготвуваат разредувања на противсерумот, контролниот серум и противгенот во СФП-азид. Најдобри разреду-

вања за повеќето системи се 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32.

5. Во горниот систем бунарчиња, се пипетираат 10 микролитри (мкЛ) неразреден противсерум во централното бунарче, а во околните бунарчиња се внесуваат по 10 мкЛ од разредувањата на човечки албумин.

6. Во средниот систем бунарчиња се пипетираат 10 мкЛ неразреден човечки албумин во централното бунарче, а во околните бунарчиња по 10 мкЛ од разредениот противсерум. Плочите се инкубираат преку ноќ во инкубатор за клетки на 37°Ц.

7. Во долниот систем бунарчиња се пипетираат 10 мкЛ од пре-имун серум (серум земен од истото животно или човек пред имунизација), а во околните бунарчиња се внесуваат по 10 мкЛ од разредениот противсерум. Овие бунарчиња служат за контрола на противсерумот.

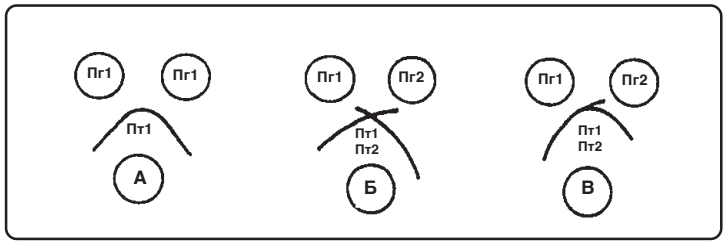
Прикажување и толкување на резултатите:

Се анализираат имунопреципитирачките линии во секој од системот бунарчиња. Ако е потребно плочите се бојат и се одбојуваат. Присуството на имунопреципитирачка линија покажува дека серумот содржи противтела специфични за противгенот. Доколку се добијат повеќе линии тоа укажува на хетерогеност на противгенот и на противтелата. Оддалеченоста на преципитирачката линија од бунарчето зависи од концентрацијата на реагенсите и нивната молекуларна маса (кои влијаат на брзината на дифузија). Отсуството на преципитирачка линија укажува дека:

-нема противтела специфични кон противгенот;
-има противтела, но не се способни да го преципитираат противегнот;
-има присутни противтела, но концентрацијата на противгенот и/или против серумот не се соодветни, не се постигнува еквиваленција.

Овие варијанти можат да се испитаат со пробување други концентрации реагенси или со употреба на други техники кои откриваат непреципитирачки противтела. Оваа техника овозможува прикажување на противгената идентичност или неидентичност. Овие поими укажуваат на способноста на противтелата да го препознае противгенот како идентичен или различен, со значење дека противгените се структурно еднакви или различни. Степенот на идентичност анализиран со двојната дифузија ги има следниве карактеристики (Слика 7.3):

а) еднаква континуирана преципитирачка линија меѓу двете противтела (Пт1 и Пт2) со противгенот укажува на имунохемиска идентичност меѓу двете противтела



Слика 7.3: Интерпретација на противгенатa идентичност со двојна радијална имунодифузија.

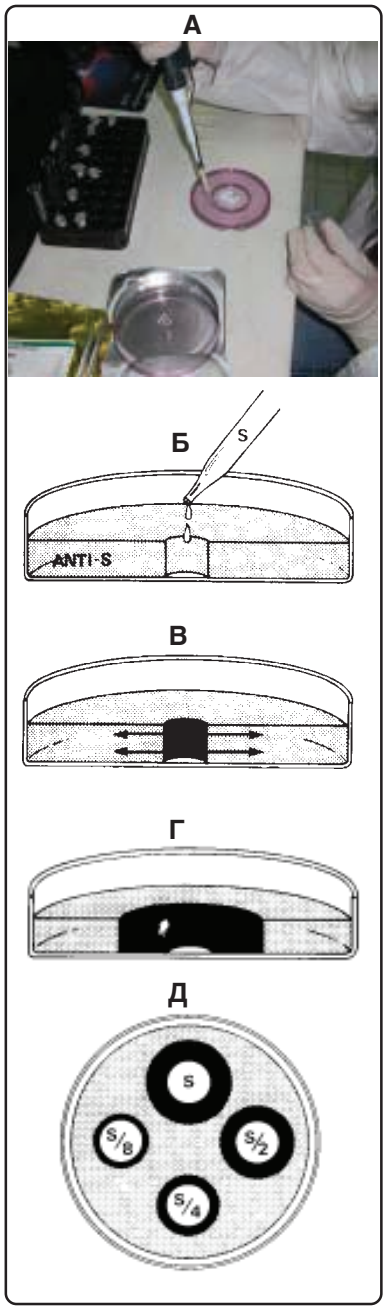
а) идентичност;
б) неидентичност;
в) парцијална идентичност;

(Пт1 и Пт2).

б) двојно вкрстување на имунопреципитирачките линии меѓу противтелата (Пт1 и Пт2) укажува на целосна нееднаквост.

в) делумното вкрстување на имунопреципитирачки линии укажува на парцијална идентичност, во случајов противгенот 2 (Пг2) има некои детерминанти кои не ги дели со противгенот 1 (Пг1), но сите детерминанти од Пг1 ги има и во Пг2 (Слика 7.3).

Внесувањето 3% полиетилен гликол 6.000 во гелот ја зголемува преципитацијата на големите молекуларни комплекси и може да ја зголеми сензитивноста. Ова особено се користи при анализирање моноклонски противтела.



Слика 7.4: Единечна имунодифузија на агар. А) нанесување серум со микропипета; Б) шематски приказ на внесување серум; В) дифузија на серумот низ агарот; Г) имунопреципитација во агарот; Д) сериско разблажување на серумот 2, 4 и 8 пати.

7.3. Единечна (радијална) имунодифузија на агар

Во оваа техника се приготвува агарозен гел со фиксна концентрација противтела. Противгенот дифундира во гелот и се соединува со противтелото кога ќе се постигне еквиваленција. Во таа точка се создава имунопреципитирачко заматување околу бунарчето, а Манцини покажа дека дијаметарот на ова заматување при еквиваленцијата е во сооднос со концентрацијата на противгенот. Квантитативниот аспект на оваа техника е нејзината најголема предност.

Материјал и опрема: квадриперм пластични плочи, агар, сад со вода (заради рамнење на површината), солен фосфатен пуфер кој содржи 0.02% натриум азид(СФП-азид), вакуум пумпа, остра игла со рамен врв, серумски албумин 1 мг/мЛ во СФП-азид, против-хуман серум или против-хуман серум албумин, контролен пре-имун серум, водена бања, инкубатор за клетки, линеар (постојат и готови плочи за радијална имунодифузија на ИгГ, ИгА и ИгМ).

Изведување со комерцијални плочи:

1. Плочите се отвораат и се брише капакот за да се отстрани кондензираната вода.

2. Серумот се разредува: за ИгГ 1:10 (0.1 мЛ серум + 0.9 мЛ физиолошки раствор); за ИгА 1:2 (0.1 мЛ серум + 0.1 мЛ физиолошки раствор); ИгМ се испитува не е разреден.

3. Првото бунарче се полни со 5 мкЛ (микролитри) стандард од ИгГ, ИгА или ИгМ, 5 мкЛ од серумот се внесува во едно од другите бунарчиња (според порано направените разредувања). Плочата внимателно се затвора и се остава на собна температура или во инкубатор на 37°Ц.

Прикажување и толкување на резултатите:

Се мери дијаметарот на исталожениот прстен околу секое

Табела 7.1: Отчитување концентрацијата на имуноглобулин Г (ИгГ) од готови плочи

P	*г/Л*	*P*	*г/Л*	*P*	*г/Л*
ИмуноглобулинГ(ИгГ)					
4.0	*0.154*	*6.0*	*0.575*	*8.0*	*1.165*
4.1	*0.171*	*6.1*	*0.601*	*8.1*	*1.199*
4.2	*0.188*	*6.2*	*0.626*	*8.2*	*1.233*
4.3	*0.206*	*6.3*	*0.653*	*8.3*	*1.268*
4.4	*0.225*	*6.4*	*0.680*	*8.4*	*1.303*
4.5	*0.244*	*6.5*	*0.707*	*8.5*	*1.339*
4.6	*0.263*	*6.6*	*0.734*	*8.6*	*1.375*
4.7	*0.282*	*6.7*	*0.762*	*8.7*	*1.411*
4.8	*0.302*	*6.8*	*0.791*	*8.8*	*1.448*
4.9	*0.323*	*6.9*	*0.820*	*8.9*	*1.485*
5.0	*0.344*	*7.0*	*0.849*	*9.0*	*1.523*
5.1	*0.365*	*7.1*	*0.879*	*9.1*	*1.561*
5.2	*0.386*	*7.2*	*0.909*	*9.2*	*1.600*
5.3	*0.409*	*7.3*	*0.939*	*9.3*	*1.639*
5.4	*0.431*	*7.4*	*0.970*	*9.4*	*1.678*
5.5	*0.454*	*7.5*	*1.002*	*9.5*	*1.718*
5.6	*0.478*	*7.6*	*1.034*	*9.6*	*1.758*
5.7	*0.501*	*7.7*	*1.066*	*9.7*	*1.779*
5.8	*0.526*	*7.8*	*1.098*	*9.8*	*1.840*
5.9	*0.550*	*7.9*	*1.131*	*9.9*	*1.881*

бунарче со линеар, со лупа или со РИД-метар. Се поставува дијаметарот на прстенот наспроти лог10 од концентрацијата на противгенот за да се добие стандардна права. Непознатиот примерок се отчитува од оваа права. Во комерцијално направените имунодифузиски плочи се дадени табели за отчитување за секој имуноглобулин. Овде се дадени табелите за отчитување на сите имуноглобулини со комерцијалните комплети (Табели 7.1 до 7.3).

Неопходно е да настане комплетно изедначување. За тоа се потребни најмалку 24 часови на собна температура (или 6 часови на 37°Ц), но се препорачуваат 48 часови (12 часови во инкубатор на 37°Ц), или 3 до 5 дена. Доколку серумот содржи значајни количества ИгМ неопходна е инкубација

Табела 7.2: Отчитување концентрацијата на имуноглобулин А (ИгА) од готови плочи

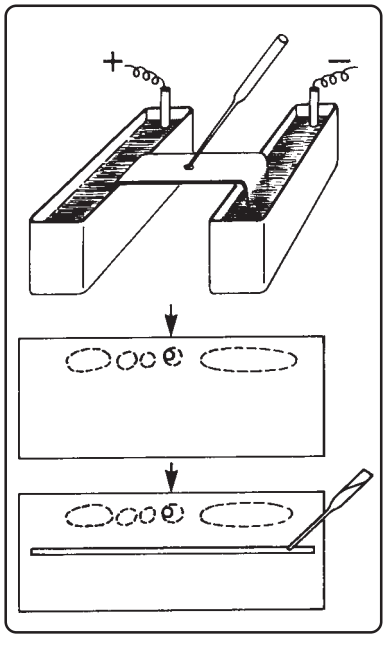
P	*г/Л*	*P*	*г/Л*	*P*	*г/Л*
Имуноглобулин А (ИгА)					
4.0	*0.134*	*6.0*	*0.701*	*8.0*	*1.494*
4.1	*0.157*	*6.1*	*0.735*	*8.1*	*1.539*
4.2	*0.181*	*6.2*	*0.770*	*8.2*	*1.585*
4.3	*0.205*	*6.3*	*0.805*	*8.3*	*1.632*
4.4	*0.230*	*6.4*	*0.841*	*8.4*	*1.679*
4.5	*0.255*	*6.5*	*0.878*	*8.5*	*1.727*
4.6	*0.281*	*6.6*	*0.915*	*8.6*	*1.776*
4.7	*0.307*	*6.7*	*0.952*	*8.7*	*1.824*
4.8	*0.334*	*6.8*	*0.991*	*8.8*	*1.874*
4.9	*0.361*	*6.9*	*1.029*	*8.9*	*1.924*
5.0	*0.389*	*7.0*	*1.069*	*9.0*	*1.975*
5.1	*0.418*	*7.1*	*1.109*	*9.1*	*2.026*
5.2	*0.447*	*7.2*	*1.149*	*9.2*	*2.078*
5.3	*0.477*	*7.3*	*1.190*	*9.3*	*2.130*
5.4	*0.507*	*7.4*	*1.232*	*9.4*	*2.183*
5.5	*0.538*	*7.5*	*1.274*	*9.5*	*2.237*
5.6	*0.569*	*7.6*	*1.317*	*9.6*	*2.291*
5.7	*0.601*	*7.7*	*1.360*	*9.7*	*2.345*
5.8	*0.634*	*7.8*	*1.404*	*9.8*	*2.401*
5.9	*0.667*	*7.9*	*1.448*	*9.9*	*2.456*

Табела 7.3: Отчитување концентрацијата на имуноглобулин М (ИгМ) од готови плочи

Р г/Л	*Р*	*г/Л*	*Р*	*г/Л*
Имуноглобулин М (ИгМ)				
4.0	*0.605*	*6.0*	*1.381*	*8.0*	*2.469*
4.1	*0.638*	*6.1*	*1.428*	*8.1*	*2.531*
4.2	*0.668*	*6.2*	*1.476*	*8.2*	*2.595*
4.3	*0.701*	*6.3*	*1.525*	*8.3*	*2.659*
4.4	*0.735*	*6.4*	*1.574*	*8.4*	*2.724*
4.5	*0.770*	*6.5*	*1.624*	*8.5*	*2.789*
4.6	*0.805*	*6.6*	*1.675*	*8.6*	*2.856*
4.7	*0.841*	*6.7*	*1.727*	*8.7*	*2.923*
4.8	*0.878*	*6.8*	*1.779*	*8.8*	*2.991*
4.9	*0.916*	*6.9*	*1.832*	*8.9*	*3.059*
5.0	*0.954*	*7.0*	*1.886*	*9.0*	*3.129*
5.1	*0.993*	*7.1*	*1.941*	*9.1*	*3.199*
5.2	*1.033*	*7.2*	*1.996*	*9.2*	*3.270*
5.3	*1.074*	*7.3*	*2.053*	*9.3*	*3.342*
5.4	*1.116*	*7.4*	*2.110*	*9.4*	*3.415*
5.5	*1.158*	*7.5*	*2.168*	*9.5*	*3.488*
5.6	*1.201*	*7.6*	*2.226*	*9.6*	*3.562*
5.7	*1.245*	*7.7*	*2.286*	*9.7*	*3.637*
5.8	*1.290*	*7.8*	*2.346*	*9.8*	*3.713*
5.9	*1.335*	*7.9*	*2.407*	*9.9*	*3.790*

од 80 часови на собна температура (24 часови во инкубатор на 37°Ц). Употребата на пречистени ИгГ или противтела може да даде подобри резултати.

Боењето на таложните прстени со Комаси сино може да даде подобри резултати, особено при помалите концентрации. Потребно е да се внесе контролен серум од животните пред нивната имунизација, затоа што радијалната имунодифузија е особено чувствителна на артефакти. Постојат и готови апарати за автоматско читање и пресметување на радијалната имунодифузија (Dinatech и други).



Слика 7.5: Шематски приказ на апаратот за електрофореза.

7.4. Имуноелектрофореза

Во оваа техника белковините најпрвин се двојат со електрофореза на агар или агароза. Потоа се додава противсерум во централната бразда (паралелна со електрофоретското патување) оставајќи го спонтано да дифундира низ гелот. На местото каде што се сретнуваат противгенот и противтелото се создава таложен (преципитациски) лак. Најголемото ограничување на овој метод е релативно малото раздвојување (резолуција) за најголемиот број противгени, кога се употребува агарна електрофореза.

Материјал и опрема: секачи за имуноелектрофореза, човечки серум, влажна комора, 2% агар во барбитонски пуфер, барбитонски пуфер, микроскопски стакла, 7% оцетна киселина, апарат за електрофореза со придружни делови (Слика 7.5), Комаси брилијантско синило.

Изведување :

1. Се загрева агарот во вода што врие.

2. Се бришат стаклата со алкохол и етер, се обележуваат стаклата со бројки и нивната позиција во однос на анода и катода и се стават во специјалните лежишта.

3. Со четкичка внимателно се премачкуваат краевите на стаклата и рамката со топол агар. Се разлеваат по 10 мЛ течен агар во секоја колона (има по три стакла). Плочата се става во ладилник 24 часови.

4. Со посебен калап се прават по две бунарчиња и една бразда на секое микроскопско стакло. Со вакуум и со пинцета се вадат агарозните отпадоци.

5. Во бунарчињата се нанесува околу 10 мкЛ од испитуваниот примерок обележен со бром фенолно синило.

6. Се полнат резервоарите со пуфер, се поставуваат плочите, се нанесува филтер хартија и се вклучува електрична струја (по 8 мА за секое стаклење).

7. Откако ќе заврши патувањето на белковините, внимателно се вади средишниот дел од браздата, се нанесува по околу 1 мЛ противсерум. Се остава 24 часови во влажна комора за спонтано да се исталожат лаците.

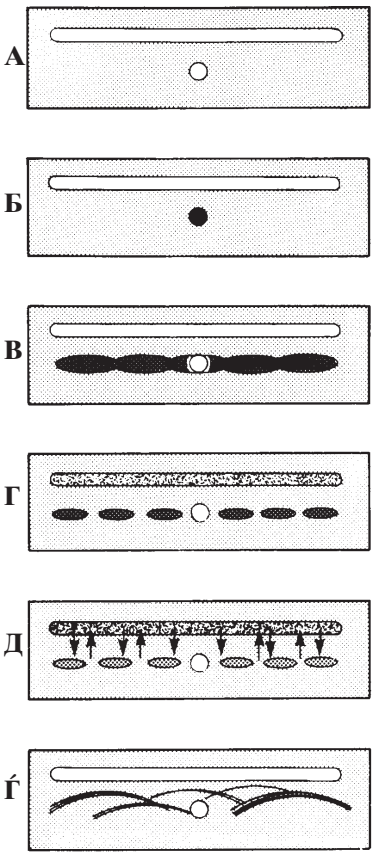
8. Плочата се потопува во физиолошки раствор 24 часови за да се отстранат неисталожените белковини. Се плакне со дестилирана вода и се потопува 5-10 мин во 7% оцетна киселина (фиксација на лаците).

9. Плочата се потопува во боја (Комаси брилијантско сино) и стои 6-10 мин. Плочата се одбојува во оцетна киселина и метанол 12-24 часови.

10. Примероците се сушат на 37°Ц најмалку 24 часови. Стаклениата внимателно се одделуваат и се лепат етикети со објаснување што има на нив (слика 7.6).

Прикажување и толкување на резултатите:

Зависно од електричниот полнеж, белковините патуваат кон анодата или кон катодата. За разлика од другите фракции, гама глобулините патуваат кон катодата, албумините заради својата најмала молекулска маса патуваат најдалеку кон анодата. Најмалку патуваат ИгМ и фибриногенот заради најголемата молекулска маса.



Слика 7.6: Прикажување на електрофоретските постапки: А, изглед на плочката; Б, нанесување примерок; В, електрофоретско движење; Г, нанесување противтела; Д, дифузија на противтелата и примерокот; Ѓ, имунопреципитациски лаци.

7.5. Задачи

Измери дијаметар на преципитациските прстени од ИгГ, ИгА и ИгМ, внеси ги во Табела 7.4 и пресметај ја нивната концентрација.

Табела 7.4: Формулар за внесување концентрација на имуноглобулин Г (ИгГ), А (ИгА) и М (ИгМ) од готови плочи.

Пример			Случај		
Примерок	**Дијаметар (мм)**	**Концентрација (г/Л)**	**Примерок**	**Дијаметар (мм)**	**Концентрација (г/Л)**
Стандард 1 ИгГ	2.5	0.1	Стандард 1 ИгГ		0.1
Стандард 2 ИгГ	7.75	1.0	Стандард 2 ИгГ		1.0
Примерок 1 ИгГ	4.6	2.63 (0.263x10)	Примерок 1 ИгГ		
Примерок 2 ИгГ	8.8	14.48 (1.448x10)	Примерок 2 ИгГ		
Стандард 1 ИгА	4.8	0.5	Стандард 1 ИгА		0.5
Стандард 2 ИгА	6.75	1.0	Стандард 2 ИгА		1.0
Примерок 1 ИгА	5.8	1.268 (0.634x2)	Примерок 1 ИгА		
Примерок 2 ИгА	9.4	4.366 (2.183x2)	Примерок 2 ИгА		
Стандард 1 ИгМ	2.75	0.5	Стандард 1 ИгМ		0.5
Стандард 2 ИгМ	5.0	1.0	Стандард 2 ИгМ		1.0
Примерок 1 ИгМ	5.0	0.954	Примерок 1 ИгМ		
Примерок 2 ИгМ	9.5	3.488	Примерок 2 ИгМ		

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 8: ПРОТИВТЕЛЕН ОДГОВОР

8.1. Броење противтела секретирачки Б лимфоцити

Б лимфоцитите од слезинката на стаорец кои не дошле во допир со туѓи противгени не лачат имуноглобулини и ги нарекуваме лимфоцити девици. По интраперитонеалното внесување овнешки црвени крвни зрнца кај стаорецот, тие стапуваат во контакт со нив, се оспособуваат да лачат имуноглобулин М и при повторното мешање во полуцврста состојба, во присуство на комплемент, имуноглобулинот М дифундира во околината по што се врши хемолиза на овнешките црвени крвни зрнца.

Потребен е следниов материјал и опрема: Исплакнати овнешки црвени крвни зрнца, стаорци, Quadriperm плочи, Индубиоза, солен фосфатен пуфер, комплемент, челично сито од 100 микрони, стаклен клип, инвертен микроскоп.

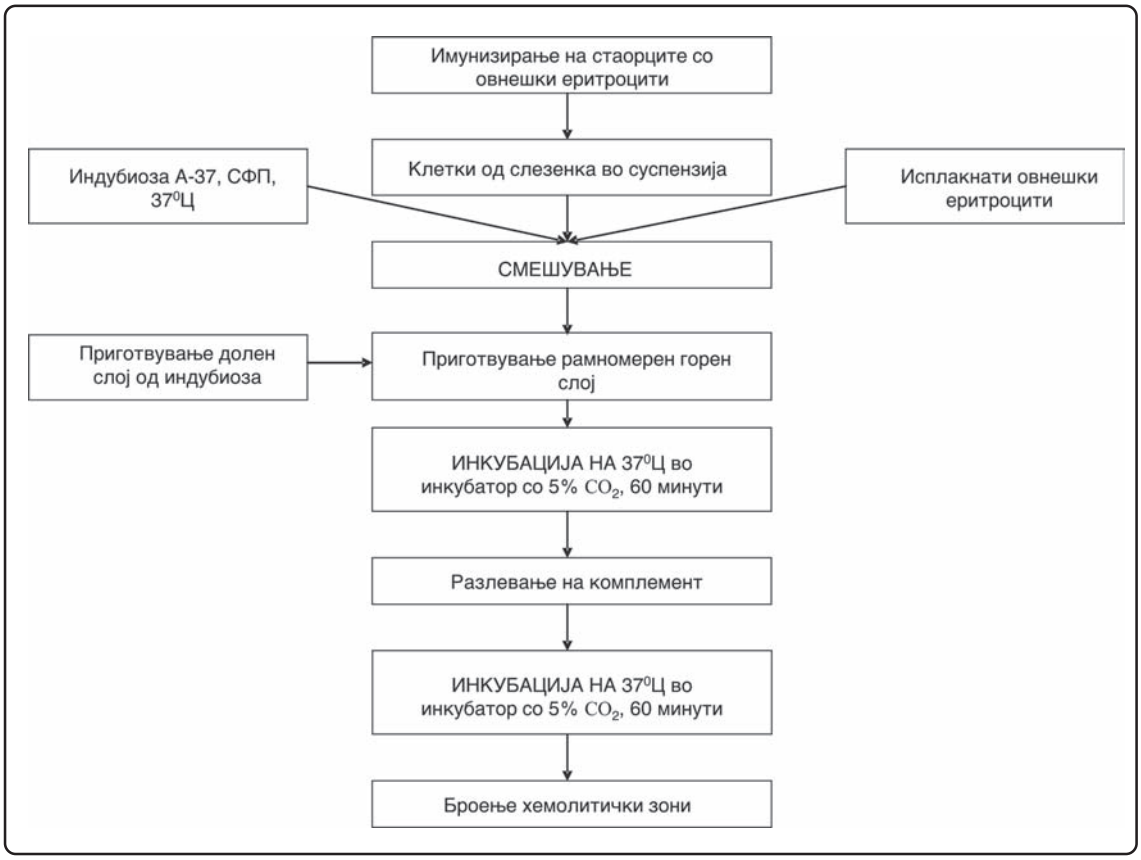
Изведување на тестот: Методот за броење имуноглобулин М секретирачки спленоцити е модифициран метод врз основа на оригиналните постапки од Јерне и сор., 1963 и Дресер и Вортис, 1967 (Слика 8.1).

Овнешките еритроцити се плакнат три пати во физиолошки раствор и се прави 10% суспензија. На секој стаорец му се внесуваат по 0.5 мЛ од оваа суспензија и.п. за да се изврши примарна имунизација (примарен имунолошки одговор). По четири дена стаорците се жртвуваат со искрвавување од аорта, а слезинката се сече на мали парченца и се пасира низ челично сито од 100 микрометри со 10 мЛ Хенксов раствор. За цело време на работата, суспензијата од спленоцити се чува во мраз.

Методата се изведува во пластични плочи Quadriperm од фирмата Hereaeus (или слични). Се приготвува 1% раствор од Индубиоза во солен фосфатен пуфер и се разлеваат по 2.5 мЛ за да се формира долен слој. Горниот слој се прави од 0.5% Индубиоза во солен фосфатен пуфер и тоа во стаклени епруветки на 45°Ц во следниов состав: 0.5 мЛ Индубиоза,

0.05 мЛ плакнети овнешки еритроцити (10% суспензија), и 0.02 мЛ од суспензијата на спленоцити. Смешата се нанесува во рок од 3-5 секунди врз долниот слој. За секој примерок се прават по два теста (Слика 8.2:А).

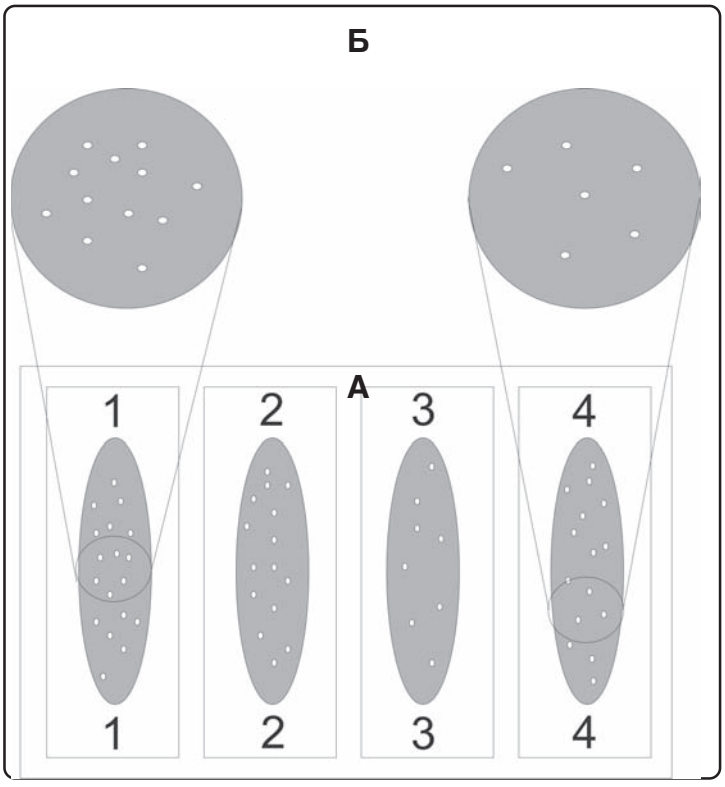
Плочите се затвораат, се инкубираат 60 мин на 37°Ц во инкубатор со 5% CO_2, се додава комплемент од заморец (разреден 1:10 со Хенксов раствор) и се инкубира уште 60 мин. Се истура комплементот, се суши и се бројат хемолитичните прстени под стерео микроскоп под мало зголемување со долно светло (Слика 8.2:Б).



Слика 8.1: Шематкси приказ за изведување на тестот за броење имуноглобулин М секретирачки спленоцити во Quadriperm плочи.

Прикажување и толкување на резултатите:

Броењето хемолитични зони се врши зависно од вкупниот број. Ако се малку, се бројат на цело видно поле, ако ги има во средна густина се прават поделби на дното од плочата, а доколку ги има во голем број, тогаш се лепи мрежа од летрасет и се брои во малите квадратчиња со корекција на нивниот вкупен број. Резултатите се искажуваат како број на имуноглобулин М секретирачки спленоцити во цела слезинка.



Слика 8.2: Изведување на тестот за броење имуноглобулин М секретирачки спленоцити во Quadriperm плочи (А) и изгледот на хемолитичните зони под микроскоп со мало зголемување (Б).

8.2.Имунонефелометриско определување имуноглобулински класи и поткласи

8.2.1. Принцип на имунонефелометрија

Нефелометријата е најчесто употребуваниот принцип за имунохемиско мерење на протеините во серумот, урината и другите телесни течности. На ИИБХГ располагаме со автоматизиран имунонефелометар (Слика 8.3). Ако се внесат во кивета соодветниот противген и соодветното противтело, се формираат противген-противтело комплекси. Во оваа метода се мери светлоста која се распрснува од создадените противген-противтело комплекси.

8.2.2. Оптички патеки на светлината

Ласерската диода создава светлост со бранова должина од 840 нм. Светлосниот сноп е збир од практично паралелни зраци и минува низ киветата. Светлоста се распрснува од честичките создадени во кивета од страна на противген-противтело комплексите и под агол од 13-24^0 се упатува кон детекторот (диода).



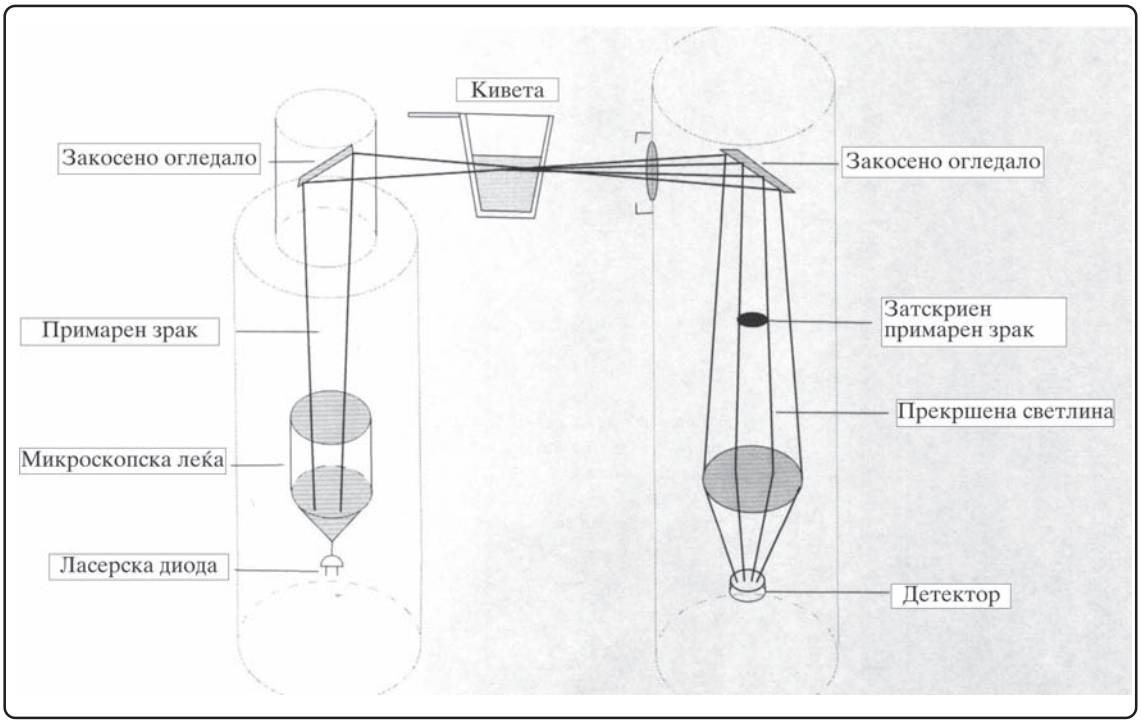
Слика 8.3: Автоматизиран имунонефелометар на ИИБХГ PN ProSpec System.

Создадената распрсната светлина се фокусира кон фотодетекторот со систем од леќи. Поради геометрискиот облик на детекторот, се открива само мал дел од распрснатата светлина. Детекторот ја претвора распрснатата светлина во електричен импулс. Концентрацијата на протеините во примерокот се мери како разлика помеѓу сигналот пред започнување на реакцијата и сигналот по завршување на реакцијата со математички постапки и со споредба со референтната крива. Поради интензитетот на упадната светлина, не е потребно дополнително засилување (постамплификација) во светлосниот засилувач (фотомултипликаторот) (Слика 8.4).

8.2.3. Принципи на имунотурбидиметриско мерење

Хајделбергер-Кендаловата крива го прикажува соодносот помеѓу нивото на противгенот и мерениот светлосен сигнал при константно ниво на противтела (Слика 8.4). Хајделбергер-Кендаловата крива може да се подели во три подрачја:

1. *Вишок на противтела.* Во ова подрачје има *вишок противтела*, односно има многу слободни врзни места. Додавањето на секоја молекула противген, веднаш се врзува и доведува до натамошно вкрстено врзување.
2. *Рамнотежни граници.* При приближно еднакви концентрации на противгенот и противтелото површината на кривата се наречува *рамнотежни граници*. Овде вкрстеното врзување е најјако и растворливоста на комплексот противген-противтело е најмала.
3. *Вишок на противген.* Во случај на вишок противген, растворливост на имуните комплекси повторно се зголемува бидејќи повеќе нема вишок противтела за



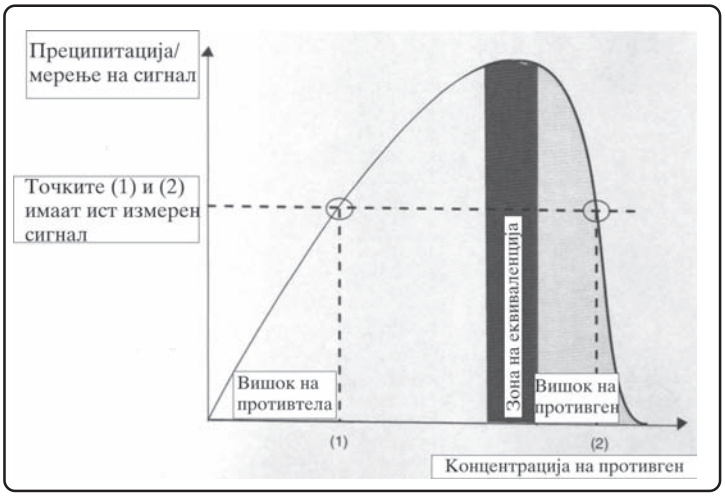
Слика 8.4: Оптички систем на имунонефелометаро̄т.

да ги врзат сите противгени. Ова значи дека измерениот сигнал е помал отколку тој во рамнотежните граници.

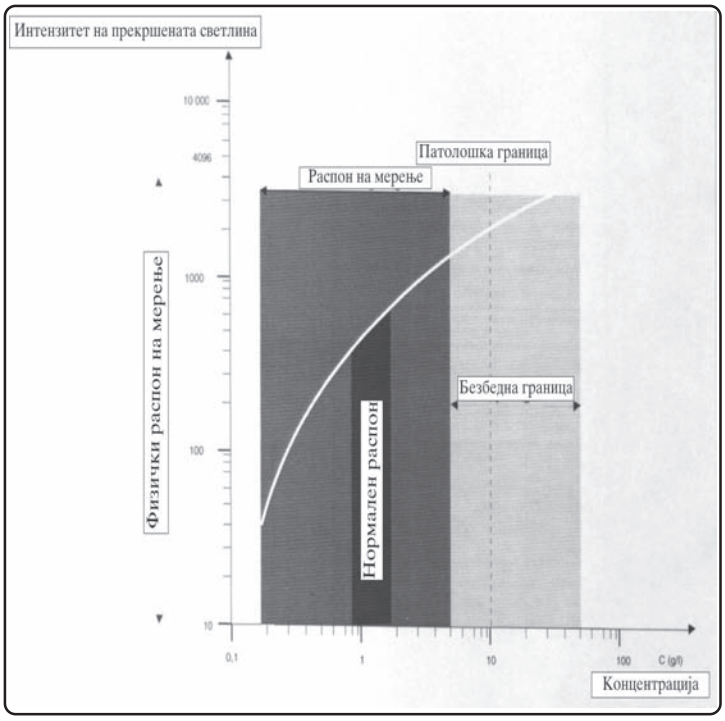
Во авалуацијата на Хајделбергер-Кендаловата крива, две концентрации на противгенот би можеле да бидат одговорни за определено мерење на сигналот (Слика 8.6):

- Првата точка лежи врз нагорниот дел од вишокот противтело (ниска концентрација на противген).
- Втората точка лежи врз надолниот дел од вишокот на противген (висока концентрација на противген).

Со оптимизација на условите на реакција во BN ProSpec, максимумот на Хајделбергер-Кендаловата крива е



Слика 8.5: Хаиделберг̄ер-Кенделова (Heidelberger-Kendall) крива за имунонефелометриско о̄пределување имуноглобулински класи и по̄дкласи.



Слика 8.6: Оптимизирана Хајделберг-Кенделова крива.

поместена кон повисоките концентрации на противген до тој степен што измерениот сигнал сеуште паѓа во левиот дел од кривата, дури и при поголеми концентрации на протеини (Слика 8.7). За да се гарантира точност во услови на вишок на противген, дури и во случаи кога се присутните протеини во високи концентрации, или кога покажуваат големи биолошки варијации (на пример, уринарните протеини), за определени методи се користат предреакции.

8.2.4. Предреакции

Во предреакциите, дел од примерокот се приготвува со комплетно количество реагенс.

- Доколку, за време на предреакцијата, не се надмине прагот на реакцијата, се пипетира вообичаеното количество и се изведува мерењето. Пресметаната сирова вредност се определува од референтната крива.
- Доколку постои значајно зголемување на сигналот кој го надминува дефинираниот праг на реакцијата, мерењето се повторува автоматски со следното разредување, доколку е направена конфигурација на апаратот за *автоматско повторено мерење*.

Предреакцијата исто така прво се мери за ново разредување.

-Ако има повторно значајно зголемување, примерокот се приготвува со следното разредување и се проверува со предреакција.

Оваа постапка се повторува се додека резултатот од предреакцијата не лежи под пропишаниот праг на

реакцијата или додека системот не ги достигне границите дозволени за разредување на примерокот. Ако и после тоа не може да се добие резултат, до измерената вредност се додава знакот ">".

Прагот на реакцијата се пресметува од предреакцискиот сигнал на горната точка од калибрационата крива, оваа вредност се множи со фактор специфичен за определениот есеј, и на крај се додава специфична константа за есејот.

8.2.5. Проверување турбидитет

Ако мерениот сигнал го надминува дефинираниот праг на реакција, резултатот се означува со така наречениот *турбидитетен знак*. Проверувањето турбидитет се изведува врз основа на два критериуми:

1. Ако разликата помеѓу почетната вредност (првата мерена вредност после 7.5 секунди) и вредноста на слепата проба е поголема од 1800 бита. Вредноста од 1800 бита се наречува *општ турбидитетен праг*. Со овој критериум се мерат примероци со многу висок интензитет (на пример липемични серуми) или брзи реакции (на пример моноклонски имуноглобулини).
2. Ако разликата помеѓу почетната вредност (првото мерена вредност после 7.5 секунди) и слепата проба во киветата се поголеми од 800 бита плус 15% од разликата помеѓу второто мерење и почетната вредност. Овој критериум е развиен за да се исклучи *неспецифичниот турбидитет*, или појава на атипични реакции со мали разлики на измерениот сигнал помеѓу второто мерење и почетната вредност.

Вредноста од 800 бита се наречува *турбидитетен праг*, а 15% се наречува *турбидитетен фактор*. Даде Беринг ги пресметува општиот турбидитетен праг и општиот турбидитетен фактор и ги ги дава како стандардни вредности.

Доколку се појави неспецифична реакција, се вади примерокот од апаратот и се очистува (на пример, липемичниот серум се очистува со центрифугирање 10 минути на 15.000 ввм). Примерокот се враќа во анализаторот и се процесира без мерење на неспецифичната реакција.

8.3. Задачи

8.3.1. Изброј ИгМ секретирачи спленоцити од готова плоча

1. На задната страна од плочката дамката (која одговара на содржината на епруветата) во секоја од преградите,со помош на фломастер, се дели на 4 приближно еднакви делови.

2. Се става плочката под микроскоп и се набљудува со

најмалото зголемување.

3. Се бројат сите полиња на лиза (дефекти во хомогениот распоред на еритроцитите). На пример, да земеме дека во една четвртина од дамката се избројани 25 полиња на лиза.

4. За да утврдиме колку полиња на лиза има во целата дамка, 25 треба да го помножиме по 4 (25x4=100). Ова значи дека во целата дамка има вкупно 100 полиња на лиза, односно има 100 Б лимфоцити. Имено секое поле на лиза одговара на еден Б лимфоцит кој околу себе излачил ИгМ. ИгМ за себе врзал еритроцити, кои во текот на втората инкубација се уништени од страна на додадениот комплемент.

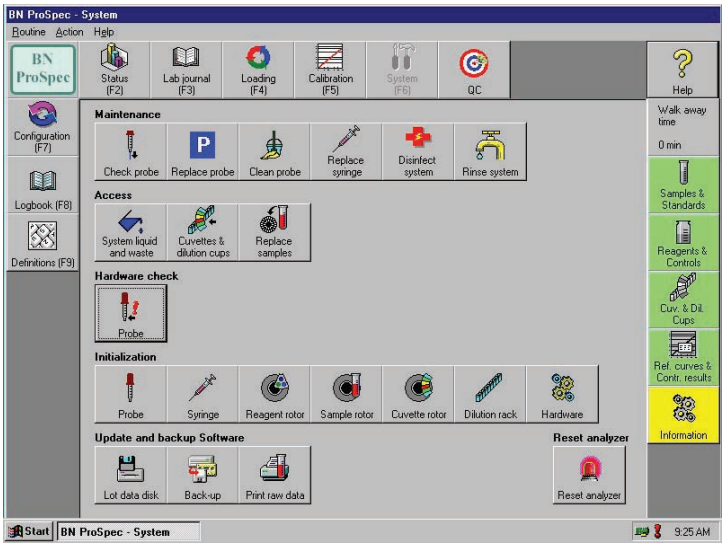
5. Овие 100 Б лимфоцити се содржат во 20 микролитри на спленоцитната суспензија, колку што беше ставено во епруветата. Бидејќи целата слезина е пасирана во 10 мЛ Хенксов раствор, што е 500 х повеќе од 20 микролитри, добиениот број на Б лимфоцити треба да го корегираме. Така добиениот број 100 ќе го помножиме по 500 (100x500=50000). Добиениот број се изкажува како цел број $x10^n$. Во нашиот пример, резултатот би се прикажал како $5x10^4$ Блимфоцити во една слезина (Слика 8.7).

Пример		Случај	
Изброени полиња на лиза	**Вкупен број на плазма клетки во слезината**	**Изброени полиња на лиза**	**Вкупен број на плазма клетки во слезината**
25 x 4 =100	100 * (10 мЛ/0.02 мкЛ) = 50.000 или 5.0×10^4		

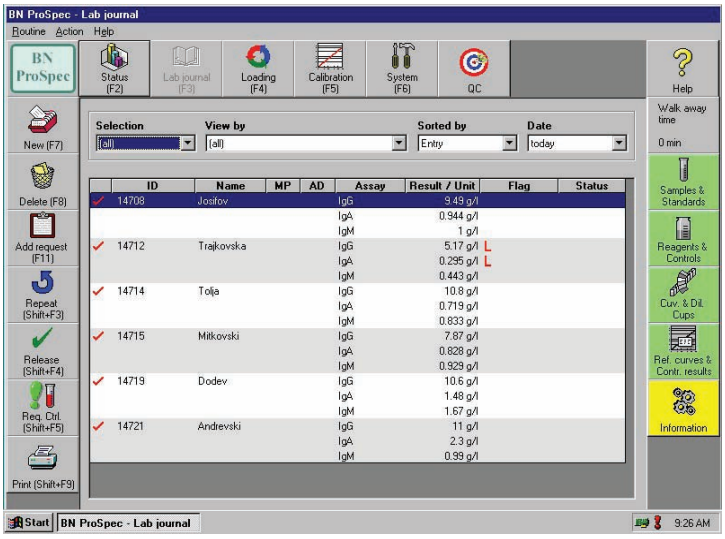
Слика 8.7: Формулар за внесување резултати од имуноглобулин М секретирачки спленоцити.

8.3.2. Измери концентрација на Иг класи со имунонефелометар

Во главното мени (Слика 8.8) со кликнување на соодветната икона, најпрвин се одбира опцијата Lab journal. Во добиениот прозорец се кликнува на копчето New. Сега можеме да ги



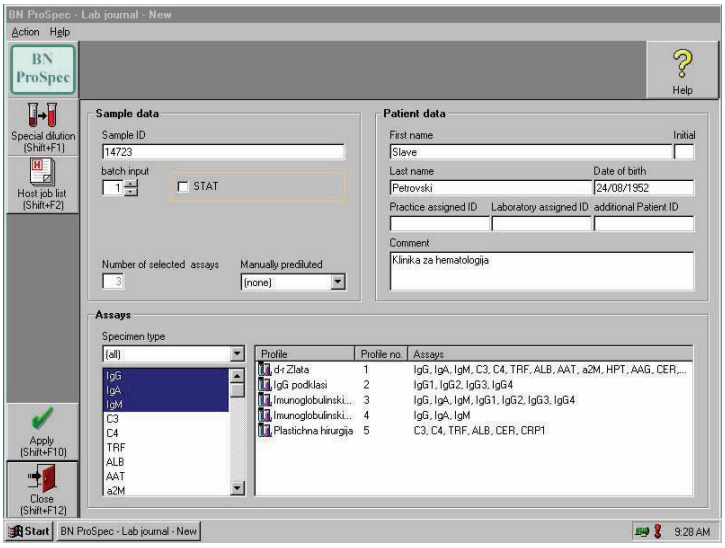
Слика 8.8: Главното мени на автоматизираниот нефелометар BN ProSpec.



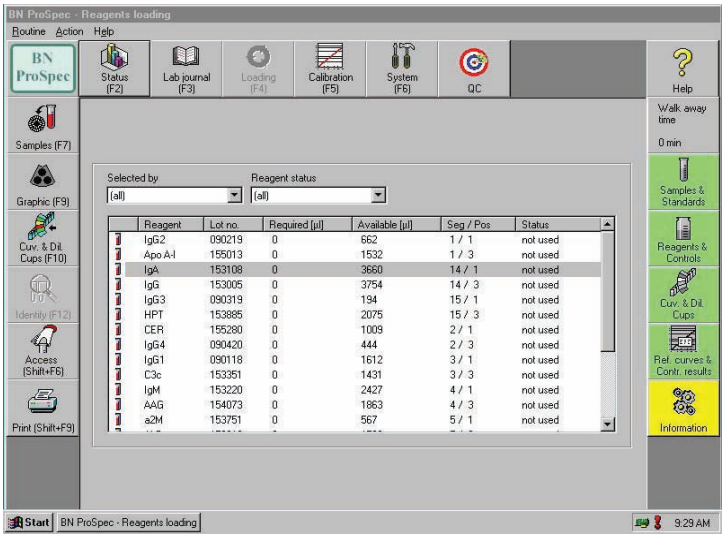
Слика 8.9: Пристап кон прозорецот за внесување на податоци за пациентите и за видот на анализите кои треба да се направат.

внесеме податоците за пациентот и анализите кои треба да се изработат (Слика 8.9). Најпрвин се внесуваат податоците за пациентите: лабораториският број на пациентот (Sample ID), неговото име (First name) и презиме (Last name), датумот на неговото раѓање (Date of birth) и кој го испратил за анализа (Comment). Движењето помеѓу полињата е со копчето Tab или со едноставно кликнување на курсорот на даденото поле. Откога ќе ги внесеме податоците за пациентот во долниот лев прозорец (Speciemen type) ги назначуваме анализите кои ќе треба да се изработат. По проверувањето на точноста на сите внесени податоци кликнуваме на иконата Apply, па на иконата Close (Слика 8.10).

Потоа апаратот сам си пресметува колку од реагенсите ќе му бидат потребни за да се изведат потребните анализи. Доколку во роторот за реагенси некој од реагенсите е со помала количина од потребната, иконата Reagents&controls на главното мени ќе добие црвена боја. Со кликнување на неа, апаратот веднаш ќе ни покаже кои од реагенсите имаат

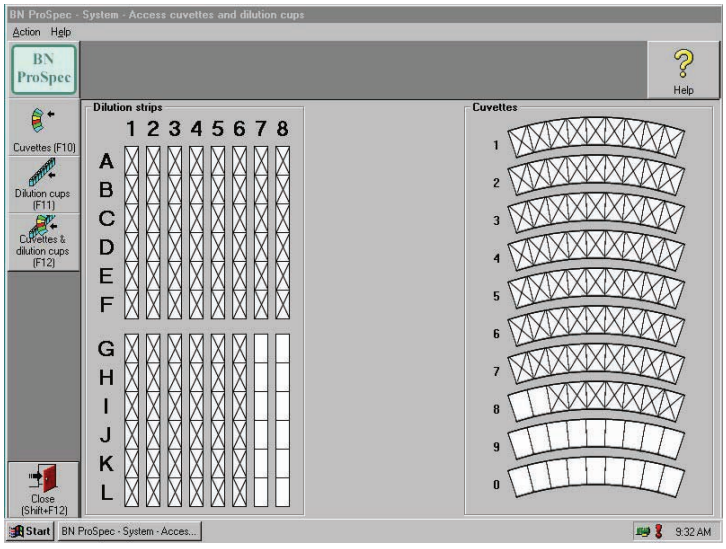


Слика 8.10: Прозорец за внесување податоци за пациентите и за видот на анализите кои треба да се направат.



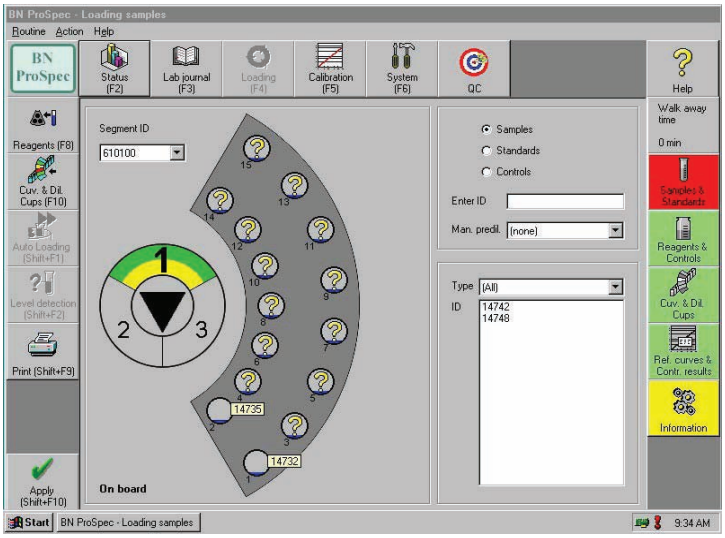
Сика 8.11: Прозорец за замена на реагенсите.

помала количина од потребната. Се осветлува дадениот реагенс и се кликнува на копчето Access (Слика 8.11). Дури откога апаратот ќе не извести дека левиот капак на апаратот е ослободен, можеме да пристапиме кон негово отворање. Откога ќе го отвориме левиот капак на апаратот, го отвораме и капакот на роторот за реагенси и го заменуваме дадениот реагенс. По заменувањето на реагенсот, ги затвараме капакот на роторот за реагенси и левиот капак на апаратот и го стиснуваме копчето Close. По известувањето дека реагенсот е заменет, кликнуваме на копчето OK.



Сика 8.12: Замена на киветӣте и бунарчињата за разредување.

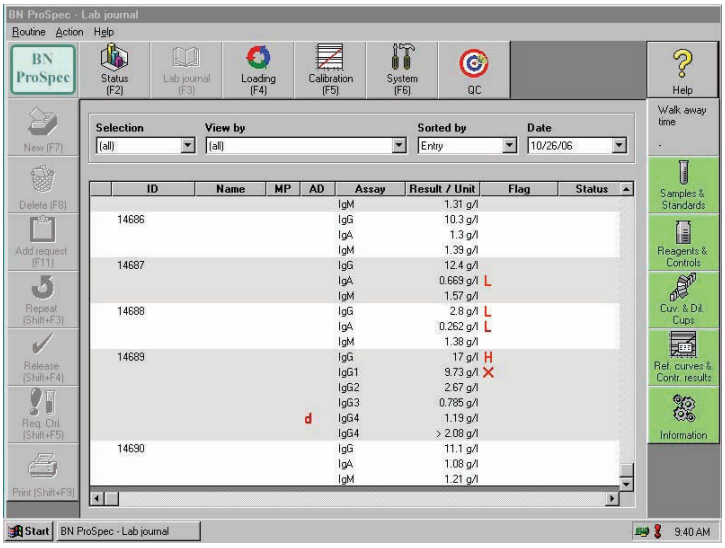
Истовремено со пресметувањето колку од реагенсите ќе бидат потребни да се изведат зададените анализи, апаратот пресметува и колку од киветите за мерење и бунарчињата за разредување ќе му бидат потребни. Доколку нема доволен број од киветите и/или бунарчињата за разредување, тогаш иконата Cuvettes&Dilutions cups на главното мени ќе стане црвена. Со кликнување на неа, се отвара нов прозорец во кој можеме да избереме дали ќе ги заменуваме само



Слика 8.13: Прозорец за внесување на примероците серум во автоматизираниот нефелометар BN ProSpec.

киветите, само бунарчињата за разредување или и киветите и бунарчињата за разредување. Со кликнување на саканата икона, апаратот ќе ни дозволи да го отвориме левиот капак и да ги замениме искористените кивети во роторот за кивети или искористените бунарчиња за разредување од нивниот носач. Откога ќе ја извршиме саканата замена, со курсорот, на шематскиот приказ на роторот за кивети и носачот на бунарчињата, ги осветлуваме киветите и бунарчињата за разредување кои сме ги заменили. Потоа кликнуваме не иконите Save и Close. По известувањето на апаратот дека замената е извршена, кликнуваме на OK.

Следниот чекор е да ги внесеме примероците серум во апаратот. Ги редиме епендорфите со серум на носачот за примероци. Кликнуваме на иконата Replace samples од главното мени. По известувањето на апаратот дека десниот капак е ослободен го отвориме и го ставаме носачот на примероци. Кликнуваме на иконата Close и откога апаратот ќе не извести дека носачот е ставен, кликнуваме на OK. Во овој момент апаратот распознава дека е поставен носач на



Слика 8.14: Листа на направени анализи.

примероци, но не расознава кој епендорф на која позиција во носачот е поставен. Поради тоа кликнуваме на иконата Loading од главното мени. Ни се отвара нов прозорец на кој е прикажан роторот за примероци, а во десниот дел има прозорче во кој се прикажани лабораториските броеви на примероците кои треба да се изработат. Позицијата на која е поставен носачот на примероци е прикажана со жолто-зелена боја. Со кликнување на неа, апаратот ни два визуелен приказ на носачот. Сега со курсорот го осветлуваме даденият лабораториски број и го влечеме до позицијата на носачот каде е сместен соодветниот епендорф со серум. Откога на овој начин ќе ја дефинираме позицијата на секој епендорф на носачот, кликнуваме на иконата Apply. Активнот носач од жолто зелена-боја, ќе премние во плаво-жолта боја.

За да ја набљудуваме работата на апаратот, повторно кликнуваме на иконата Lab journal. Секоја започната анлиза, апаратот ќе ја означи со мал часовник. По завршување на истата, до името на анализата апаратот, ќе ја впише измерената вредност.

По завршувањето на сите анализи, резултатите се печатат. Тоа се прави на тој начин што најпрвин се осветлуваат сите анализи, па се кликнува на иконата Print. Се отвара нов прозорец на кој ни е дадено како ќе изгледа отпечатениот извештај. Се кликнува на иконата на која има печатар. Откога ќе го отпечатиме извештајот, го затвараме овој прозорец и се враќаме на главното мени преку кликнувањето на иконата System.

Добиените вредности се внесуваат во Табелата 8.1.

Табела 8.1: Формулар за внесување резултати од имунотурбидиметриско определување имуноглобулински класи.

Имуноглобулин	Волумен на примерокот	Серумска концентрација (г/Л)
Имуноглобулин М		
Имуноглобулин А		
Имуноглобулин Г		

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 9: АНАЛИЗА НА ХУМОРАЛЕН ИМУНИТЕТ

9.1. Нормални вредности од испитувањето хуморален имунитет

Нормалните вредности на имуноглобулинските класи и поткласи варираат во првите месеци и години, како и според полот на децата (Табела 9.1). Најголеми промени во првите месеци од животот на децата имаат ИгМ и ИгГ, помалку ИгА, а имуноглобулинските поткласи се менуваат помалку и немаат значајни разлики помеѓу машките и женските деца.

Возраст	ИгМ (г/Л)	ИгА (г/Л)	ИгГ (г/Л)	ИгГ1 (г/Л)	ИгГ2 (г/Л)	ИгГ3 (г/Л)	ИгГ4 (г/Л)
новородени	0.06-0.21 (ж) 0.06-0.21 (м)	0.01-0.06	6.6-17.5	2.4-1.6	0.87-4.1	0.14-0.55	0.04-0.55
1 месец	0.1-0.36 (ж) 0.1-0.36 (м)	0.025-0.15	3.9-10.5	1.8-6.7	0.38-2.1	0.14-0.70	<0.03-0.36
2 месеца	0.17-0.66 (ж) 0.17-0.66 (м)	0.05-0.34	2.5-6.8				
3 месеца			2.0-5.5				
4 месеца			2.0-5.4				
5 месеца	0.22-0.83 (ж) 0.22-0.83 (м)	0.06-0.46	2.2-6.0	1.8-7.0	0.34-2.1	0.15-0.80	<0.03-0.23
6 месеца	0.26-1.0 (ж) 0.26-1.0 (м)	0.08-0.57	2.6-6.9	2.0-7.7	0.34-2.3	0.15-0.97	<0.03-0.43
7 месеца			2.9-7.7				
8 месеца			3.2-8.4				
9 месеца	0.33-1.25 (ж) 0.33-1.25 (м)	0.11-0.76	3.3-8.8				
10 месеци			3.5-9.1				
11 месеци			3.5-9.3				
1-1.5 години	0.44-1.63 (ж) 0.39-1.50 (м)	0.18-1.18	4.2-10.9	2.5-8.2	0.38-2.4	0.15-1.07	<0.03-0.62
1.5-2 години				2.9-8.5	0.45-2.6	0.15-1.13	<0.03-0.79
2-3 години	0.49-1.82 (ж) 0.42-1.6 (м)	0.25-1.67	5.1-12.85	3.2-9.0	0.52-2.8	0.14-1.20	<0.03-1.06
3-4 години				3.5-9.4	0.63-3.0	0.13-1.26	<0.03-1.27
4 години	0.52-1.93 (ж) 0.43-1.63 (м)	0.30-1.88	5.4-13.4	3.7-10.0	0.72-3.4	0.13-1.33	<0.03-1.58
5 години	0.54-2.00 (ж) 0.44-1.66 (м)	0.34-2.05	5.65-13.85				
6 години	0.56-2.08 (ж) 0.45-1.69 (м)	0.38-2.22	5.9-14.3				
7 години	0.58-2.14 (ж) 0.46-1.72 (м)	0.42-2.37	6.1-14.7	4.0-10.8	0.85-4.1	0.13-1.42	<0.03-1.89
8 години	0.60-2.20 (ж) 0.47-1.75 (м)	0.46-2.51	6.3-15.0				
9 години	0.61-2.23 (ж) 0.48-1.77 (м)	0.49-2.63	6.5-15.15	4.0-11.5	0.98-4.8	0.15-1.49	0.03-2.10
10 години	0.62-2.31 (ж) 0.48-1.79 (м)	0.52-2.74	6.7-15.3				
11 години	0.64-2.36 (ж) 0.49-1.81 (м)	0.55-2.83	6.85-15.4				
12 години	0.65-2.40 (ж) 0.49-1.83 (м)	0.58-2.91	7.0-15.5	3.7-12.8	1.06-6.1	0.18-1.63	0.04-2.30
13 години	0.66-2.44 (ж) 0.50-1.85 (м)	0.61-2.98	7.05-15.55				
14 години	0.66-2.48 (ж) 0.50-1.87 (м)	0.63-3.04	7.1-15.6				
15 години	0.67-2.52 (ж) 0.50-1.89 (м)	0.65-3.09	7.15-15.6				
16 години	0.68-2.55 (ж) 0.50-1.91 (м)	0.67-3.14	7.2-15.6				
17 години	0.68-2.58 (ж) 0.51-1.93 (м)	0.69-3.18	7.25-15.55				
над 18 години	0.40-2.80 (ж) 0.40-2.30 (м)	0.7-5.0	7.0-16.0	4.9-11.4	1.50-6.4	0.20-1.10	0.08-1.40

Табела 9.1: Нормални вредности за имуноглобулинските класи (ИгМ, ИгА и ИгГ), и за имуноглобулинските поткласи (ИгГ1, ИгГ2, ИгГ3 и ИгГ4) кај деца.

Табела 9.2: Нормални вредности за имунглобулинските класи (ИгМ, ИгА и ИгГ), за имуноглобулинските потокласи (ИгГ1, ИгГ2, ИгГ3 и ИгГ4), како и за лесните и за тешките вериги (ламбда и капа) кај возрасни луѓе.

Вид на анализа	Кратенка	Нормално
Имуноглобулин М	ИгМ	0.49-1.82 г/Л (ж) 0.42-1.6 г/Л (м)
Имуноглобилин А	ИгА	0.25-1.67 г/Л
Имуноглобулин Г	ИгГ	5.1-12.85 г/Л
Имуноглобулин Г1	ИгГ1	3.5-9.4 г/Л
Имуноглобулин Г2	ИгГ2	0.63-3.0 г/Л
Имуноглобулин Г3	ИгГ3	0.13-1.26 г/Л
Имуноглобулин Г4	ИгГ4	<0.03-1.27 г/Л
Капа имуноглобулински лесни ланци	капа	1.7-3.7 г/Л
Ламбда имуноглобулински лесни ланци	ламбда	0.9-2.1 г/Л

Нормалните вредности се искажуваат во г/Л и се приблизно еднакви за возрасните мажи и жени, освен за ИгМ.

Нормалните вредности за имуноглобулинските класи (ИгМ, ИгА и ИгГ), за имуноглобулинските потокласи (ИгГ1, ИгГ2, ИгГ3 и ИгГ4), како и за лесните и за тешките вериги (ламбда и капа) се дадени на Табела 9.2.

9.2. Клиничко значење на имуноглобулинските класи и потокласи

Промените во концентрацијата на имуноглобулините обично се класифицираат како:

- ***Хипогамаглобулинемии*** кои можат да бидат здружени со различни заболувања. Смалената концентрација може да биде поради смалена синтеза, зголемен губиток, зголемено разградување или нивна комбинација.

- ***Поликлонски и олигоклонски гамопатии*** кои можат да настанат со зголемување на повеќе или на една имуноглобулинска класа. Спектрумот на заболувања кои доведуваат до поликлонски гамопатии е голем и вклучува воспаленија, хронични болести на црниот дроб, колагени васкуларни заболувања и други.

- ***Моноклонски гамопатии*** кои се карактеризираат со тесна лента во гама-глобулинската зона од електрофорезата на серумските протеини. Моноклонските линии ги предизвикуваат масовните пролиферации (разраснувања) на Б-лимфоцитните клонови клетки кои синтетизираат имуноглобулини од една класа или еден тип.

9.2.1. Хипогамаглобулинемии

Имунонедостатоците можеме да ги поделиме во четири категории: физиолошки имунонедостаток (кај новородени и во староста), примарни специфични имунонедостатоци,

секундарни специфични имунонедостатоци и јатрогени имунонедостатоци (Табела 9.3).

9.2.1.1. Првични имунонедостатоци

Првичните имунонедостатоци се релативно ретки пореметувања на имуниот систем и се одликуваат со зголемена осетливост кон појава на инфекции. Се класифицираат во зависност од тоа кој дел од имуниот систем е зафатен.

Првичните имунонедостатоци можат да се манифестираат:

- во неонаталната возраст, во форма на зголемена преваленца на инфекциите (вродени имунонедостатоци). Оваа форма е релативно ретка (со преваленца од 1:10,000 до 1:1,000,000) и многу тешко комбинирано пореметување на имуниот систем. Дијагнозата и лекувањето на оваа форма на имунонедостаток се врши во терциерните педијатриски центри (Клиниката за детски болести при Медицинскиот факултет).

- во текот на адолесценцијата или раното полнолетство. Тука спаѓаат најчестите првични имунонедостатоци, како на пример селективниот ИгА недостаток (со преваленца од 1:700), недостатоците во ИгГ субкласите и заедничкиот варјабилен имунонедостаток. Овие имунонедостатоци се многу чести и се предмет на разгледување како во различните медицински дисциплини така и во рутинската лабораториска пракса.

Заедничка карактеристика на сите клинички значајни имунонедостатоци е зголемената осетливост и/или невообичаено тешките инфекции некарактристични за возраста на пациентот. Вообичаено, ваквите инфекции не се причинети само од еден предизвикувач, ниту се ограничени само на еден орган.

Во основа, иако може да се јават вродени пореметувања (првични имунонедостатоци) во сите делови од имуниот систем, доминираат пореметувањата во областа на хуморалниот имунитет пропратени со пореметена синтеза на имуноглобулини.

Табела 9.3: Видови имунонедостатоци кај возрасни луѓе.

	Вид имунодефицит	Етиологија
1.	Физиолошки имунодефицит	Неонатален период, старост
2.	Примарен специфичен имунодефицит	Агамаглобулинемија, дисгамоглобулинемија, дефектни Т-клетки (СЦИД);
	Моноспецифичен имунодефицит	Дефектни гранулоцити, дефектен комплемент дефектен цитокински одговор
3.	Секундарен специфичен имунодефицит	Лимфоми, (НХЛ, миелом, Hodgkin лимфом), АЛЛ, ХЛЛ, вирална инфекција, на пр. ХИВ
	Моноспецифичен имунодефицит	Малнутриција, политраума, изгореници, губиток на протеини, дијабетес, голем физички стрес, тумори, инфекции
4.	Јатроген имунодефицит	Имуносупресивна имунотерапија, хемотерапија, зрачна терапија, хируршки процедури, трансплантација на коскена срцевина
СЦИД – тежок окмбиниран имун недостаток, АЛЛ – акутна лимфатична леукемија, ХЛЛ – хронична лимфоцитна леукемија, НХЛ – нон Hodgkin лимфом		

Табела 9.4: Имунонедостаточни синдроми на Б лимфоцитите.

Во случај на постоење на некој комбиниран имунонедостаток, сите овие типови на инфекции се со зголемена преваленца. Овие случаи всушност претставуваат тежок

БОЛЕСТ	ПРОМЕНИ
Детска Икс-врзана агамаглобулинемија (Брутон-ова болест)	Значително намалување на сите имуноглобулински класи; отсуство на зрели Б лимфоцити и на типчни фоликули, герминални центри и плазма клетки; дефект на ниво на пре-Б лимфоцитите пради недостаток на бтк (Б-клеточна тирозин киназа)
Детска полово-врзана хипогамаглобулинемија со недостаток на хормон на растење	Исто како и претходното пропратено со појава на џуџест раст
Автозомна рецесивна агамаглобулинемија	Значително намалување концентрацијата на сите имуноглобулински класи и намалување бројот на циркулирачки Б лимфоцити; дефект во диференцијацијата на пре-Б лимфоцитите
Вообичаен варијабилен имун недостаток (ВВИН)	Хетерогена група, се манифестира на возраст од 15-35 години, кај обата пола; вообичаено се работи за редукција на сите имуноглобулински класи, поретко само на ИгГ; отсутно или намалено диференцирање на на Б лимфоците во плазма клетки; вообичено има нормално присуство на Б клетки; многу поретко има намалување бројот на Б лимфоцитите или на Т помагачките лимфоцити со нарушување функцијата со Б лимфоцитите; пореметување на имуноглобулинската секреција на плазма клетките; многу често има појава на создавање автопротивтела, појава на малигни лимфоми и атопични заболувања.
Имунонедостаточен синдром со зголемен ИгМ (хипер-ИгМ синдром)	Намалување концентрацијата на ИгГ и ИгА во комбинација со зголемување концентрацијата на ИгМ (и ИгД); отсутно или намалено зреење во крајните фази од Б лимфоцитната диференцијација; негативна повратна спрега со фаворизирање синтезата на ИгМ наместо синтеза на ИгГ и ИгА; има присуство на Б клетки и палазма клетки
Селективен ИгА недостаток, променлива форма: локализиран недостаток на ИгА создавачки плазма клетки, недостаток на ИгА подкласите	ИгА<0.05 г/Л, најчест првичен имунонедостаточен синдром со инциденца од 1:700, почесто присутен во некои фамилии; блокада на крајната Б лимфоцитна диференцијација, често асоцирана со автоимуни заболувања, неопластични процеси, бронхијална астма, атопија, продукција на против ИгА противтела (иако може да се јави и самостојно без асоцијација со било која друга болест)
Селективен ИгА недостаток	Обично без симптоми; предиспозиција кон дијареа и малигни процеси; четири пати почесто застапен кај мажите
Преодна хипогамаглобулинемија кај новородените	Продолжување и засилување на физиолошката хипогамаглобулинемија кај новородените
Синдром на недостаток на нормогамаглобулинемични противтела	Неможност за создавање хуморални противтела како одговор на противгената стимулација; овој дефект може да биде ограничен на одреден вид противгени и/или патогени; во најголем број од случаите има дефект во подкласите
Имунонедостаточни синдроми комбинирани со тимоми	Недостаток на зрели Т и Б лимфоцити и редукција на сите имуноглобулински класи
Имунонедостатоци асоцирани со понапредната возраст: дисфункција на Т и Б лимфоцитите	Физиолошка инволуција на тимусот; вообичаено најпрвин се пореметува синтезата на ИгГ па синтезата на ИгМ; предиспозиција кон автоимуни и/или малигни заболувања
Недостаток на ИгГ подкласите	Недостасуваат подкласите на ИгГ; патогенезата е непозната
Дефект во диференцијацијата на Икс-веригите	Непозната патогенеза
Имунонедостаток со дефекти во ензимите	Автозомно рецесивно наследен дефект на аденозин деаминазата (АДА недостаток); наследен дефект на пурин нуклеозид фосфорилазата

вид на имунонедостаточен синдром кој се манифестира веќе во неонаталната возраст. Ваквиот синдром, без соодветна терапија (на пр. пресадување на коскена срцевина), брзо резултира со смрт.

За разлика од сето досега кажано некои аномалии, кои можат да се откријат со лабораториските тестови, не се

Табела 9.5. Комбинирани имунонедостаточни синдроми.

БОЛЕСТ	ПРОМЕНИ
Синдром на тежок комбиниран имунонедостаток	Тип 1: отсуство на Т и Б лимфоцити, автозомно рецесивно наследување; патогенза: дефект во зародишните клетки; преживување - обично околу 6 месеци; хипоплазија на тимусот и лимфоидните органи Тип 2: Отсуство на Т клетките, дефект во созревањето на Б лимфоцитите; се наследува врзано за Икс-хромозомот; дефект во гама веригата на рецепторот за ИЛ-2
Дефект на клеточно остварениот имун одговор со лимфопенија и абнормална синтеза на имуноглобулини	Се наследува автозомно рецесивно; предоминира дефектот во Т лимфоцитите; преживување - една до две години; се нарекува уште и Незелоф синдром
Имунонедостаток со ataxia telangiectasia	Намалена функција на Т лимфоцитите со значаен недостаток на ИгЕ и ИгА; имунонедостаток и церебеларна атаксија, појава на телеангиектазии околу очите; Во некои случаи јајниците се неразвиени; предвремено белеење на косата, витилиго, присуство на онкофетални протеини (АФП, ЦЕА)
Имунонедостаток со дефекти во ензимите	Автозомно рецесивно наследен дефект на аденозин деаминазата (АДА недостаток); наследен дефект на пурин нуклеозид фосфорилазата

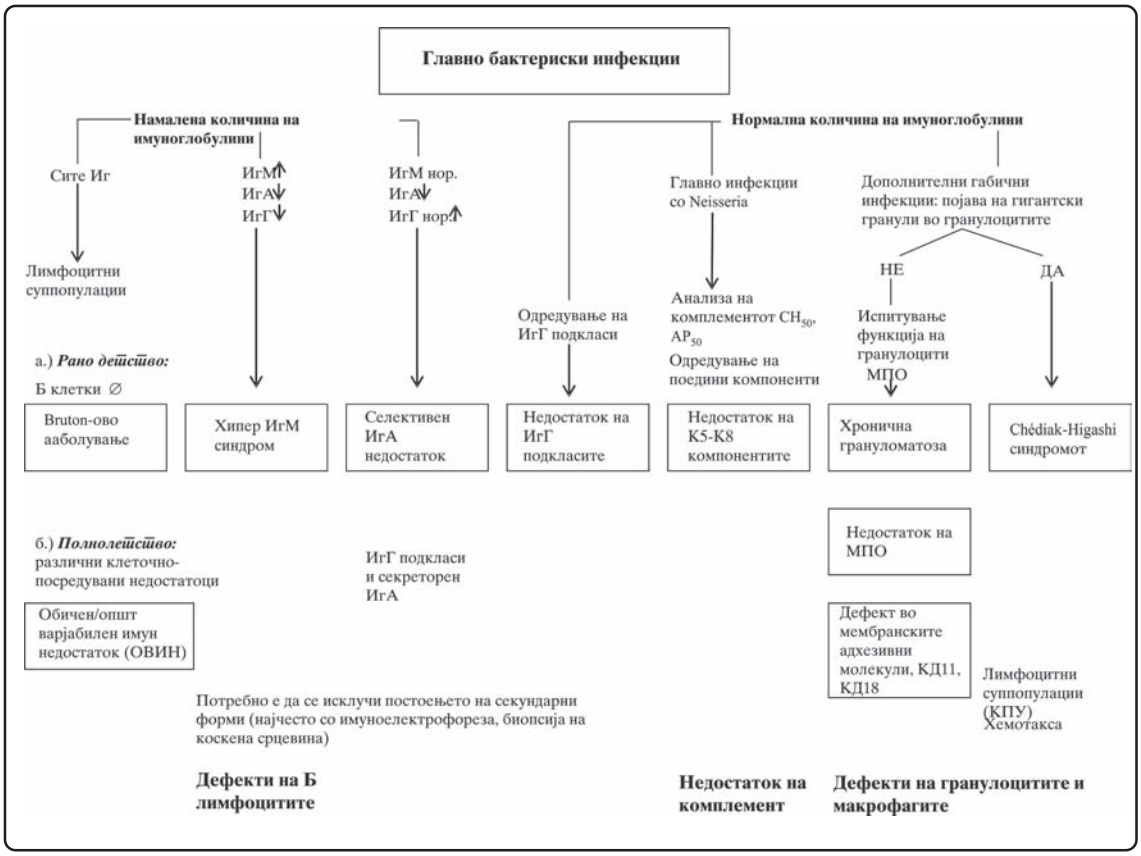
секогаш пропратени со зголемена осетливост кон инфекциите. Пример за ова е селективниот ИгА имунонедостаток (без истовремено постоење и на дефект во создавањето на ИгГ подкласите) или пореметувањето на миелопероксидазната активност.

На Табела 9.4 е даден краток приказ на првичните имунонедостатоци на Б-лимфоцитите со карактеристични наоди за секој од нив. На Табела 9.5 се дадени комбинираните имунонедостатоци.

На имунонедостаток треба да се помисли доколку:

- постојат повторувачки или невообичаено тешки инфекции кои зафаќаат повеќе органски системи, а се предизвикани од различни патогени;
- постојат повторувачки заболувања карактеристични за педијатријата, а за кои нормално постои добро развиен имун одговор
- се јават несакани компликации при вакцинирањето и/или доколку вакцинирањето е без успех, како и при инфекциите со причинители кои вообичаено не би можеле да предизвикаат заболување.

За разграничување дали се работи за првичен или вторичен имунонедостаток од особена важност е возраста на пациентот, како и податоците за постоење тешки системски заболувања и/или податоци за примањето на имуносупресивна/зрачна терапија и цитотоксични лекови. Доколку постои зачестена појава на инфекции во текот на детството,



Слика 9.1: Дијагностички пристап кон сомнителни вродени имунонедостатоци ако е присутна бактериска инфекција. МПО, миелопероксидаза, КПУ, клетки природни убијци.

пубертетот и почетокот на полнолетството, а доколку нема податоци за постоење на некои од овие причини за вторични имунонедостатоци, може да се размислува за постоење на првичен имунонедостаток.

Дијагностицирањето на имунолошките пореметувања кај помалку тешките имунонедостатоци, кои се јавуваат во текот на детството и на почетокот на полнолетството, обично почнува со вообичаените клинички иследувања:

- комплетна крвна слика, вклчувајќи ја тука и крвната размаска (диференцијална крвна слика);
- електрофореза на серумските белковини и одредување на концентрацијата на имуноглобулинските класи и подкласи;
- одредување на концентрацијата на феритинот за да се исклучи постоењето на недостаток на железо;
- детекција на противтела кон вообичаените патогени и /или поствакцинални противтела;
- микробиолошко докажување на патогенот во текот на акутната фаза на инфекцијата;
- ин-виво кожни тестови со веќе докажаните патогени причинители за да се испита функцијата на Т лимфоцитите.

Во најголем број на случаи, овие лабораториски тестови ни овозможуваат да го исклучиме или потврдиме постоењето

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Икс врзана агамаглобулинемија: Случајот на Богдан Глигоровски, студент на медицина скоро без противтела.



Слика 9.2: Дијагностички пристап кон сомнителни вродени имунонедостатоци ако се присутни тешки мешани инфекции со вируси и габи.

на најголем број од секундарните имунонедостатоци, како и да ги исклучиме останатите заболувања кои можат да го компромитираат имуниот систем (на пр. системските хематолошки заболоувања, синдромите пропратени со губиток на белковини, недостатокот на железо, синдромите пропратени со недостаток на имуноглобулини и/или синдромите со селективен имуноглобулински недостаток, моноклоналната гамопатија и др.)

На Слика 9.1 и Слика 9.2 се прикажани дијагностичките постапки кои треба да се превземат во зависност од спектарот на патогени и резултатите од базичните (прелиминарни) иследувања.

Синдром на недостаток на противтела. Овој синдром, како и селективниот недостаток на имуноглобулините (на пример недостатокот на ИгА), може да се дијагностицира врз основа на имуноелектрофорезата на серумските белковини и квантитативното одредување на имуноглобулинските класи. Од Табела 9.3 може да се види дека досега се познати неколку тешки вродени форми на овој синдром на недостаток на противтела, меѓу кои спаѓа и Брутоновата болест. Кај сите овие форми отсуството на Б

лимфоцитите може да се докаже со одредувањето лимфоцитни субпопулации, а кај Брутоновата болест може да се докаже и постоењето на мутација на генот за *бтк*.

Синдром на обичниот/општиот варијабилен имунонедостаток (ОВИН) [Common variable immunodeficiency syndrome (CVID)]: Овој имунонедостаток е значително почест одколку синдромот на недостаток на противтела. Тој преставува хетерогена група од заболувања, чија што заедничка карактеристика е присуство на синдром на недостаток на противтела. Првите клинички манифестации кај овој имунонедостаток се јавуваат помеѓу 15-35 возраст. Имунфенотипизирањето на крвните лимфоцити може да помогне во карактеризирањето на клеточните аномалии и во нивното одвојување од вторичните синдроми на противтелни недостатоци, како на пр. оние кои се поврзани со лимфомите.

Заедничко обележје на сите форми на ОВИН е неадекватното созревање на наивните зрели лимфоцити во имуноглобулин-создавачки плазма клетки, по стимулацијата со противгенот. Ваквото нешто може да се докаже со тестовите за испитување функционалноста на Б лимфоцитите. Во сомнителните случаи, за да се исклучи постоење на системско хематолошко заболување, треба да се направи и биопсија на коскената срцевина. Во случаите на ОВИН карактеристичен наод е редукцијата на бројот на плазма клеткаите.

Селективен недостаток на поединечните имуноглобулински класи: Овие недостатоци, а особено селективниот ИгА недостаток, се обично најчести во природата и не изискуваат опширно и специјализирано дијагностичко испитување. Во случаите на комплетен ИгА недостаток (серумскиот ИгА да е <0.05 г/Л), обврзно треба да се провери дали недостасува и секреторниот ИгА. За да се процени комплетното клиничко значење во овие случаи треба да се испита и концентрацијата на подкласите на ИгГ. И во случаите на парцијален недостаток на ИгА, дополнително треба да се испита нивото на ИгГ и ИгА подкласите. Во сите случаи на комплетен ИгА недостаток или со комплетен недостаток на ИгА подкласите, треба да се очекува можна појава на противтела насочени кон ИгА. Затоа на ваквите пациенти не треба да им се даваат крвни продукти кои содржат ИгА.

Хипер-игМ синдром: Овој синдром се одликува со отсуство на превклучување на ИгМ кон ИгГ и ИгА во текот на инфекцијата. Кај овие пациенти има дефект во ЦД40 лигандот кој се наоѓа на Т лимфоцитите, а кој игра многу важна улога во Т-Б лимфоцитната интеракција. Овој дефект може да се открие со имунофенотипизирање и со молекуларно-биолошки методи.

Недостаток на имуноглобулинските подкласи: Во серумот кај пациентите има незначителни количини на имуноглобулинските класи и подкласи. Ваквите пациенти страдаат од повторувачки бактериски инфекции, особено на респираторниот тракт, предизвикани најчесто од пиогени бактерии. Во зависност од локацијата на генот одговорен

за различните подкласи, со зголемена стапка истовремено се сретнуваат следните дефекти:

- недостатоци на $ИгГ_1$ и $ИгГ_3$
- недостатоци на $ИгГ_2$ и $ИгГ_4$ со можен недостаток на $ИгА_2$.

9.2.1.2. Вторични имунонедостатоци

Смалување концентрацијата на имуноглобулините поради зголемено разградување (хиперкатаболизам) се јавува во хиперметаболни состојби. На пример, ваква состојба гледаме кај болните со зголемена активност на тироидната жлезда (хипертироидизам) кога можат да бидат намалени сите имуноглобулински класи. Серумските имуноглобулини можат да бидат намалени и кај пациентите со миотонична дистрофија поради смалениот полуживот. Против противтелата се ретка причина за зголемена елиминација на имуноглобулините од циркулацијата.

9.2.2. Поликлонски и олигоклонски гамопатии

Поликлонскиот или олигоклонскот имун одговор, кој се јавува за време на инфекција со комплексни противгени (микроорганизми), доведува до зголемување на серумските имуноглобулини од една или од повеќе класи. Дијагнозата на поликлонални гамопатии се поставува со квантитативно мерење на имуноглобулинските класи и поткласи, кога ќе најдеме зголемување над нормалната вредност на повеќе класи или поткласи имуноглобулини.

Изолирано зголемување на ИгМ се смета како знак за примарна реакција на инфекција. Кај новородени, зголемувањето ИгМ во папочната врвца се смета како неспецифичен знак на внатреутерусна инфекција. Зголе-

Табела 9.6. Причини за олигоклонски гамопатии.

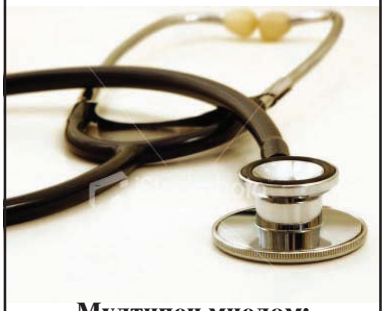
ПРИЧИНА	КОМЕНТАР
Противтела кон одредници на крвните групи	Иг противтела со лимитирана хетерогеност се спздаваат, и представуваат одредници насочени кон одредени противгени на крвните групи како А1 и IH.
Вирусни инфекции	Во тек на развојот на вирусната инфекција, зголемување на олигоклоналните имуноглобулини (Иг), ретко се јавува, содржејќи противтела кон противгените врз површината на вирусите.
Имуносупресивна терапија	Олигоклоналниот Иг облик, се јавува во тек на првите неколку недели по трансплатација на органи. Тие претставуваат показател за почеток на опоравувањето на Иг синтеза кај имуносупресивната терапија.
Автоимуни заболувања, паразитарни инфекции	Постојана стимулација на имуниот систем со непроменет спектрум на противгени, предизвикува зголемување на одделни клонови Б-клетки и селективна продукција на противтела со олигоклонален Иг облик.
Мукозни инфекции	Имуните реакции на мукозната мембрана, како оние на генитоуринарниот тракт, можат да доведат до зголемување на олигоклоналните имуноглобулини.
Заболувања на централниот нервен систем (ЦНС)	Локалниот, хуморален имун одговор во ЦНС предизвикува ограничено создавање противтела, посебно од ИгГ класата (олигоклонални ИгГ), поради ограниченото присуство на имуно-компетентни Б клетки. Обликот на олигоклоналните противтела, разоткривајќи го со помош на изоелектрично фокусирање, во цереброспиналната течност, но **не** и во серумот, е знак за локализирана имуноглобулинска синтеза. Има дијагностичко значење кај некои заболувања на ЦНС, како кај мултиплата склероза.
Имуни комплекси	Имуните комплекси во високи концентрации, како ревматоидниот фактор, можат да предизвикаат олигоклонален облик на лентите во електрофореза.

мување концентрација само на ИгГ, и лесно зголемување на ИгМ е знак за вторичен имун одговор кон веќе познат предизвикувач за организмот. Хроничните активни инфекции ја зголемуваат концентрацијата на ИгГ, но во исто време се зголемени и/или ИгМ и ИгА. Релативно големи концентрации на ИгА можат да се најдат кај црнодробните заболувања (поради токсични оштетувања, алкохол, контарцептивни лекови, антидепресиви и слично).

Причините за олигоклонално зголемување на имуноглобулините се дадени на Табела 9.6.

9.2.3. Моноклонски гамопатии

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Мултипен миелом: Случајот на Виолета Бабунска, последици од непрекинат раст на противтелно создавачки клон од Б-Ли.

Концентрацијата на лесните имуноглобулински вериги во серумот е во корелација со концентрацијата на интактните имуноглобулински молекули. Отстапување од ова има кога во серумот ќе се појават слободни лесни или тешки имуноглобулински вериги. Покрај овие случаи, зголемувањето или намалувањето концентрацијата на лесните имуноглобулински вериги може да се јави и поради појава на пролиферација (поликлонална или моноклонална) или губење на интактните инуноглобулински молекули.

Додека кај поликлоналните имуноглобулини имаме сразмерно зголемување и на капа и на ламбда лесните вериги (најчесто во сооднос 2:1), кај моноклонските имуноглобулини има зголемување на концентрацијата на само еден тип лесни вериги. Зголеменото создавање како на моноклоналните имуноглобулини така и на слободните лесни вериги ќе доведе до промена и на капа/ламбда соодносот. Поради ова вредностите на капа/ламбда соодносот кои излегуваат од нормалните граници укажуваат на постоење на моноклонски гамопатии (на пример кај мултипниот миелом). И додека интакните имуноглобулини не можат да пројдат низ интактната гломерулска филтрациска бариера, лесните имуноглобулински вериги можат да се филтрираат и повторно да се реабсорбираат во тубулите. Така, доколку имаме зголемено создавање на имуноглобулинските лесни вериги, како на пример кај моноклонските гамопатии, може да дојде до надминување на реабсорпцискиот капацитет на тубулите и до појава на лесните имуноглобулински вериги во урината. Според тоа откривањето на слободните лесни имуноглобулински вериги во урината (што е исто со Бенс-Џонсоновите протеини) е важен показател за постоење моноклонскаа гамопатија и може да се искористи како за дијагностички цели така и за следење текот на болеста.

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

БЛОК 4 - КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ И ЦИТОКИНИ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 10. КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да определат CH50 во серум;
- да определат K3, K4, K1инх.

ВЕЖБА 11. ЦИТОКИНИ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да определат концентрација на цитокин.

ВЕЖБА 12. АНАЛИЗА НА КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ И ЦИТОКИНИ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од комплементен систем;
- толкуваат резултати од цитокини;
- анализираат случаи од комплементен систем и цитокини.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 10: КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ

Комплементниот систем е група од дваесетина плазматски протеини кои се во неактивна форма, но при определени услови може да се активираат скалесто (активираниот протеин го активира следниот и тој систем продолжува сè додека не се активираат сите компоненти) (Табела 10.1).

Табела 10.1: Белковини на комплементот.

DAF=Decay Accelerating factor
MCP=Membrane Cofactor Protein
CR1-4=Complement Receptor
HRF=Homologous Restriction Factor

Ознака кирилица	Ознака латиница	Мол. маса (далтони)	Конц. во серум (мкг/мЛ)
КЛАСИЧЕН ПАТ			
Це1Кју	C1q	400 000	60 - 80
Це1Ер	C1r	85 000	30 - 50
Це1Ес	C1s	85 000	30 - 40
Це4	C4	200 000	200 - 600
Це2	C2	110 000	25
	регулација		
Це1инх	C1 - inh	105 000	180 - 240
Це4бп	C4 - bp	570 000	250
И	I	88 000	35
АЛТЕРНАТИВЕН ПАТ			
Це3	C3	190 000	1 300
Бе	B	90 000	200
Де	D	24 000	1
	регулација		
Пе	P	170 - 280 000	20 - 25
Ха	H	150 000	360 - 550
И	I	88 000	35
ДАФ	DAF	70 000	-
МКП	MCP	45 - 70 000	-
Цр1-4	CR1-4	145 - 400 000	-
ЗАЕДНИЧКИ ПАТ			
Це5	C5	190 000	76 - 80
Це6	C6	106 000	60 - 80
Це7	C7	120 000	55 - 60
Це8	C8	151 000	55 - 60
Це9	C9	71 000	60
	регулација		
Ес протеин	S protein	80 000	500
ХРФ	HRF	20 - 65 000	-

Нивното активирање може да почне со присуство на бактериски полисахариди (т.н. ***алтернативен пат на активација***) или пак, со присуство на комплекс противген - противтело, што претставува ***класичен пат на активација***.

Испитувањата може да бидат квалитативни кога се определува вкупната активност на целиот систем преку мерење на хемолитичкиот капацитет на серумот изразен врз еритроцити од овен кои се сензибилизирани со противтела од зајак (може да се користат и човечки еритроцити). Како единица обично се користи CH50, дефинирана како количина на серум неопходна да лизира 50% од еритроцитите. Но, испитувањата може да бидат и квантитативни кога се врши поединечно дозирање на секоја компонента на комплементот слично како и кај противтелата, со помош на радијалната имунодифузија или пак, нефелометриски.

10.1. Определување CH50 на комплементот

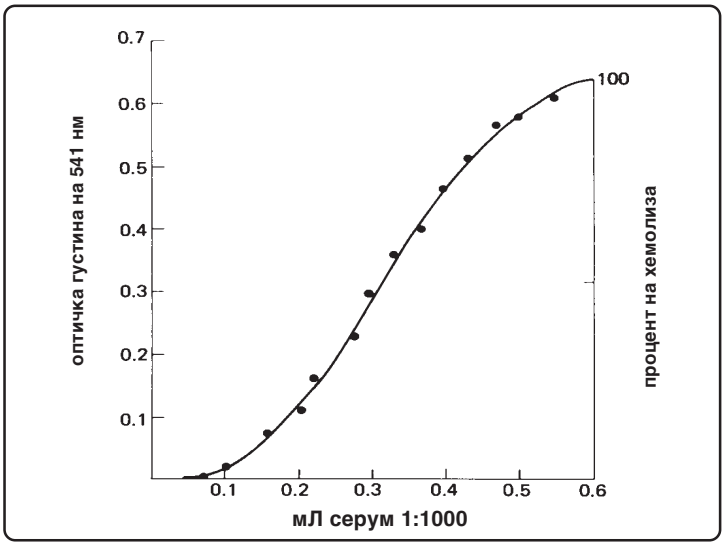
Кога се додава комплемент (свеж серум) на црвени крвни зрнца обложени со противтела во растечки пропорции, се добива карактеристично лизирање на клетките (Слика 10.2). Кривата достигнува 100% лиза асимптотски, заради што е многу тешко да се добие вкупната литичка активност на комплементот (CH100), па вообичаено се мери точката на 50% лиза (CH50).

Фон Крог (von Krogh) напишал формула која ја претставува сигмоидната крива од хемолизата со комплемент, која гласи:

$$x = k(y/(100-y))^{1/n}$$

каде што:

x= количината на комплементот (мЛ од разреден серум);



Слика 10.2: Сооднос меѓу концентрацијата на комплементот и лизираните еритроцити. Се гледа нелинеарен сооднос во помалите и поголемите разредувања на серумот.

y= пропорција на лизираните овнешки еритроцити, дел од единица (0.3/(1-0.3)) или како цели проценти (30/(100-30));

k= 50% единица на комплемент, една комплементна единица;

1/n= константа која зависи од густината на еритроцитите во тестот. При густина на еритроцитната суспензија од 0.6-1.2*10^8 константата има вредност од 0.2-0.02.

За извршување на тестот е потребно: солен веронален пуфер (СВП), овнешки еритроцити, 0.04% амониум сулфат, свеж или свежо замрзнат заморечки серум, коњски хемолитичен серум, спектрофотометар, испитуваниот серум, 0.1 % раствор од Na_2CO_3, хигроскопен памук, калибрирани пипети, мраз, термостат, центрифуга.

Стандардизирање (сензибилизирање) суспензија од овнешки еритроцити:

1. Се разредува вероналниот пуфер до работна концентрација. Се внимава да нема бактериско или габично загадување бидејќи тие имат противкомплементна активност.

2. Се плакнат 4 мЛ еритроцитна суспензија (од 25% суспензија во Алсеверов раствор) три пати во солен веронален пуфер (центрифугирање 200 г за 3 мин).

3. Се ресуспендираат исплакнатите еритроцити во однос 1:18 мЛ солен веронален пуфер (се добива приближно 5% суспензија). Суспензијата се филтрира низ тенок слој памук.

4. Се мешаат 1 мЛ еритроцитна суспензија со 25 мЛ амониум сулфатен раствор (или 1 мЛ суспензија со 14 мЛ 0.1% раствор од Na_2CO_3) за да се лизираат клетките и се чита апсорбанцијата на хемолитичкиот раствор на 541 нм наспроти слепата проба. За 6% суспензија од овнешки еритроцити, во 1 см кивета апсорбанцијата треба да биде 0.48-0.50. Доколку е потребно се прилагодува суспензија во овие граници.

5. Се мешаат 15 мЛ солен веронален пуфер, 0.1 мЛ коњски хемолитичен серум (разреден лиофилизиран хемолизин 1:150 до 1:1000), 15 мЛ 6% суспензија од овнешки еритроцити.

6. Се инкубира на 37°Ц за 15 мин. Се употребуваат сензибилизирани еритроцити во тек на 24 часа.

Понатаму се поставуваат епруветките како што е дадено на табела 14. Се користи свеж, смрзнат или лиофилизиран серум како извор за комплемент.

Епруветка број	1	2	3	4	5	6	7 0.04% амон.
1. Пуфер (СВП) (мЛ)	1.10	1.05	1.00	0.90	0.80	1.20	1.20
2. Растворен комплемент, 1:30 (мЛ)	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	-	-
3. Сензибилизирана Ер суспензија (мЛ)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30

Табела 10.2: Протокол за испитување CH50 на комплементниот систем во серум.

- Епруветките се мешаат и се инкубираат на 37°Ц 60 мин.
- Се пренесуваат епруветките во мраз и им се додаваат по 2.0 мЛ солен веронален пуфер.
- Епруветките се мешаат и се центрифугираат на 200 г 10 мин на 4°Ц.
- Се зема супернатантот од секоја епруветка и се мери апсорбанцијата на 541 нм.

Прикажување и толкување на резултатите:

- Претпоставувајќи дека седмата епруветка ја прикажува вкупната лиза, се пресметува лизата во другите 6 епруветки како процент од седмата.

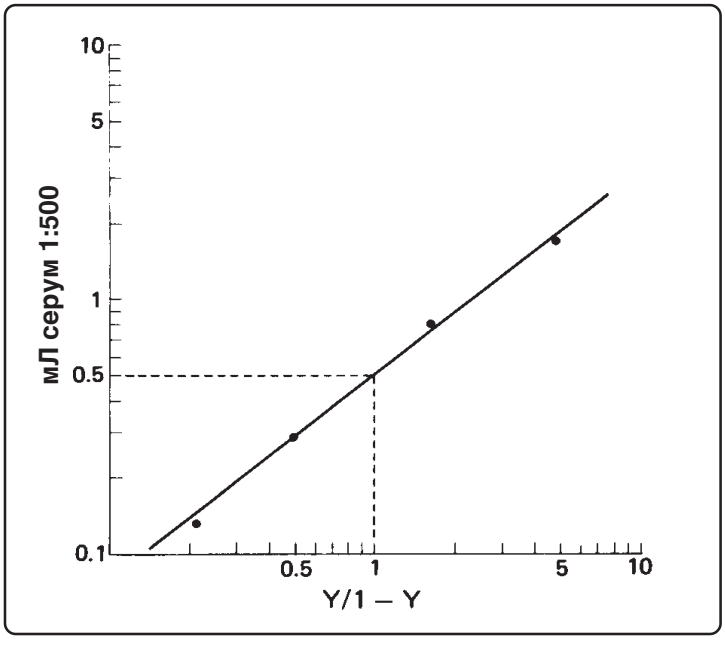
- Се поставува % на лиза наспроти концентрацијата на комплементот (мЛ неразреден серум). Ова ќе даде сигмоидна крива како на сликата 18. Оваа крива ја следи равенката на фон Крог. Равенката може да биде логаритамски трансформирана за да се добие права линија:

$$\log x = \log k + (1/n)\log(y/(100-y))$$

Се поставува log x наспроти log (y/(100-y)) за секое разредување на употребениот комплемент. Правата линија има коефициент на опаѓање (слоуп = англиски slope) 1/n со вредности кои зависат од експерименталните услови, но се движат околу 0.2-0.04 (Слика 19). Интерцептот на линијата е на апсцисата, каде што log(y/(100-y)) = 0 и претставува логаритам од разредувањето што доведува до 50% лиза. Пресметувањето може да се направи и според формулата:

$$\log k = \log x - 1/n \log((y/100-y)),$$

каде што log k одговара на една CH50. Нивото на комплементот во серумот нормално се искажува како број на CH50 единици по 1 мЛ серум (CH50 * мЛ$^{-1}$). Титарот на комплементот се корегира со разредувањето на серумот, доколку го има во поголема количина (Слика 10.2, Табела 10.2).



Слика 10.2: Логаритамска трансформација на кривата на Фон Крог од која се екстраполира вредноста на CH50 за комплементната активност во серумот.

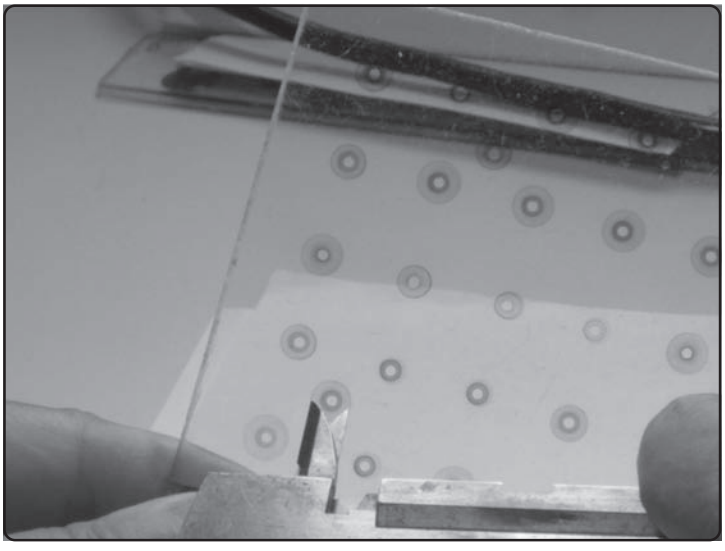
Нормални вредности за комплементот во човечкиот серум изнесуваат 25-50 CH50 единици на мЛ. Добиените нормални вредности не исклучуваат вродени или здобиени варијации на одделните компоненти од комплементниот систем. Големи варијации во комплементниот систем настануваат заради несоодветно земање и чување на серумот. Земање крв со оксалат, цитрат, ЕДТА или хепарин има противкомплементен ефект. Крвта треба да се земе во сува и чиста епруветка, без противкоагуланс, а серумот или синовијалната течност треба да се испитаат веднаш или да се замрзнат на -70°Ц. Не смеат смрзнатите примероци да се одмрзнуваат повеќе пати.

Клиничката важност на серумското ниво на комплементот е укажувањето на интензитетот на создавањето, како и неговото разградување. Смалени концентрации може да има при помало создавање и/или поголемо разградување на комплементниот систем. Намалување има при акутниот гломерулонефрит (до 25% од нормалното ниво), форми од хроничен нефрит (хипокомплементен нефрит), при системскиот лупус еритематодес, ревматоидниот артрит (особено во синовијалната течност) и кај други болести.

10.2. Испитување концентрација на K3, K4 и K1инх

10.2.1. Радијална имунодифузија (РИД)

Единечна радијална имунодифузија на плоча: раствор од примерок кој содржи противген се распределува во кружни бунарчиња од агарозен гел кој содржи моноспецифични противтела (противсерум). По определено време на инкубација (24 часа) се формираат јасно видливи имунопреципитациски прстени (Слика 10.3).



Слика 10.3. Единечна радијална имунодифузија на плоча за определување K3, K4 и K1инх.

Прибор и реагенси:

- Водено купатило.
- Грејач со мешалка.
- Стаклени плочи 10 x 10 см, 1.5 мм високи, претходно измиени со детергент и исплакнати со топла вода и етанол (1 час - 1 недела). Пред употреба плочите се плакнат со смеша од ацетон и етанол (50%-50%) (1:1).
- Дупчалка за гелот и калап.
- Влажна комора (непропустлива за воздух која е доволно голема за да го држи гелот).
- Фен за сушење.
- Држач за плочите.
- Калибриран инструмент за зголемување.
- Веронален солен пуфер (ВСП) (5 пати концениран раствор).

Подготвување раствори и гелови:

Раствор А:

- 85 г NaCl.

- 3.75 г натриум барбитурат.

- до 1 литар со H_2O.

Раствор Б:

- 5.75 г барбитурна киселина во 600 мЛ топла H_2O.

Се мешаат двата раствора (А+Б) и се надополнува до 1.8 литри со H_2O. По ладењето се подесува pH на 7.4±0.5 со 1М HCl. Се дополнува вода до 2 литра, а останатиот дел од ВСП може да се чува на 4-10 °Ц до 6 месеци.

Веронален пуфер (е исто со барбитуратен пуфер):

- 0.1 М ЕДТА раствор.
- 33.6 г Na_2 – EDTA.
- 800 mL H_2O.
- Се подесува pH на 7.6±0.05 со 2N NaOH.
- Се дополнува вода до 1 литар.
- Се чува на 4-10°C во тек на 6 месеци.

Пуфер за агароза:

ВСП пуфер 9 дела.

0.1 М ЕДТА 1 дел.

Подготвување агароза:

1.5 г агароза.
0.01 г натриум азид.
100 мЛ пуфер за агароза.
Се загрева со мешање, во тек на 5 мин. По топењето гелот се распределува на поедначкви делови (10 до 15 мЛ) и се чува на 4°C.

Раствор за боење:

1 g амидоблек.
250 мЛ метанол.
200 мЛ дестилирана вода.
50 мЛ ледена оцетна киселина (може да се употреби и 96% оцетна киселина).

Растворот е филтрира пред употреба.

Раствор за одбојување:

500 мЛ метанол.
100 мЛ ледена оцетна киселина (може да се употреби и 96% оцетна киселина).
400 мЛ H_2O.

Примерок:

Како примерок може да се користи серум или плазма од крвземена со ЕДТА како противсосирувач).

Работа со примероците:

При коистењето серум епруветката со венска крв се остава 60-120 мин на собна темепература за да настане сосирување и ретракција на сосирокот. Потоа епруветката се центрифугира на 2500 ввм на 4°Ц во тек на 5 мин. Така добиениот серум се префрла во епендорви (епруветки за чување со капаче). Земените примероци можат да се чуваат и неколку години (без да изгубат од својата активност) на -70°Ц или пократко, ако се чуваат на -20°Ц. Треба да се избегнува одмрзнување и повторно замрзнување на примероците.

10.2.2. Одредување на К3 компонентата од комплементот со радијална имунодифузија

1. Се растопуваат 15 мЛ од претходно подготвената 1.5% агароза со внимателно загревање. По ладење на 56°Ц во неа се додава 55 мкЛ против-хуман К3 ИгГ (Diasorin) при континуирано мешање.

2. Се истура смешата од противтела и агароза, на 52-55°C, на чиста стаклена плоча за да се оформи 1.5 мм тенок гел (15 мЛ за плоча со димензии 10x10). Се чека околу 10 мин.

3. Во гелот се прават бунарчиња со дијаметар од 2.5 мм.

4. Во бунарчињата се внесуваат по 5 мкЛ од примероците разредени 1:16 ($10^{-1.2}$) и по 5 мкЛ Хуман Калибратор (DAKO) (или смеша од здрав хуман серум како стандарди 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; ($10^{-0.3}$; $10^{-0.6}$; $10^{-0.9}$; $10^{-1.5}$; $10^{-1.8}$) разредени во пуфер кој го користиме за приготвување агарозен раствор.

5. Се инкубира во влажна комора на собна температура, 24 часа.

6. Плочите се плакнат со потопување во солен фосфатен пуфер или 0.9% NaCl, 2-20 часа.

7. По плакнењето плочите се вадат од растворот за плакнење и гелот се покрива со влажна филтер хартија.

8. Плочите се сушат со помош на фен (со топол воздух) или се стават во загреана комора.

9. Плочите се местат на држач и се потопуваат во раствор

за боење 10-15 мин.

10. По боењето плочите се плакнат со вода и се потопуваат во раствор за одбојување 1- 2 мин.

11. Плочите повторно се сушат со фен или во загреана комора.

12. Се прави стандардна права од концентрациите на познатите стандарди наспроти квадратот од дијаметарот ($д^2$ во однос на $мм^2$) на одговарачките преципитациски зони и концентрацијата на противгенот од примероците се одредува со интерполација од стандардната права.

Нормални вредности:

0.70 - 1.80 г/Л

10.2.3. Одредување на К4 компонентата од комплементот со радијална имунодифузија

Протоколот за одредување на К4 компонентата од комплементот со РИД е иста како за К3 компонентата (види 10.2.2.). Разлики има само во точките 1 и 4.

1. Се растопуваат 15 мЛ од претходно подготвената 1.5% агароза со внимателно загревање. По ладење на 56°Ц во неа се додава 55 мкЛ против-хуман К4 ИгГ (Diasorin) при континуирано мешање.

4. Во бунарчињата се внесуваат по 5 мкЛ од примероците разредени 1:2 ($10^{-0.3}$) и по 5 мкЛ Хуман Калибратор (DAKO) (или смеша од здрав хуман серум како стандарди 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 (10^{0}; $10^{-0.3}$; $10^{-0.6}$; $10^{-0.6}$; $10^{-0.9}$) разредени во пуфер кој го користиме за приготвување агарозен раствор.

Нормални вредности:

0.15 - 0.55 г/Л.

10.2.4. Одредување на К1 инхибитор компонентата од комплементот со радијална имунодифузија

Протоколот за одредување на К1 инхибитор компонентата од комплементот со РИД е иста како за К3 компонентата (види 10.2.2.). Разлики има само во точките 1 и 4.

1. Се растопуваат 15 мЛ од претходно подготвената 1.5% агароза со внимателно загревање. По ладење на 56°Ц во неа се додава 120 мкЛ против-хуман К1инх ИгГ (Calbiochem) при континуирано мешање.

4. Во бунарчињата се внесуваат по 5 мкЛ од примероците

разредени 1:2 ($10^{-0.3}$) и по 5 мкЛ Хуман Калибратор (DAKO) (или смеша од здрав хуман серум како стандарди 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 ($10^{-0.3}$; $10^{-0.3}$; $10^{-0.6}$; $10^{-0.6}$; $10^{-0.9}$) разредени во пуфер кој го користиме за приготвување агарозен раствор.

Нормални вредности:

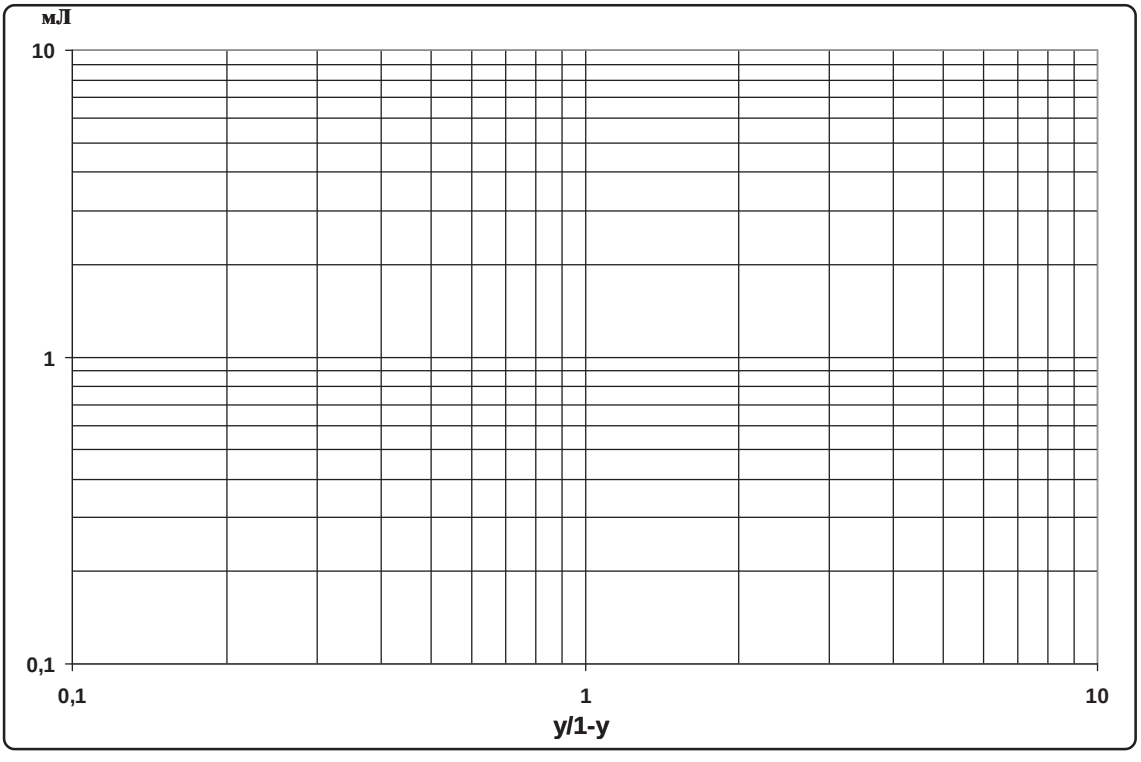
64 % - 166 % од онаа вредност добиена со нормален серум.

Одредување концентрацијата на K3, K4 компонентите, како и K1 инхибиторот, може да се направи и со помош на имунонефелометрија како што е опишано во *8.2. Имунонефелометриско определување имуноглобулински класи и поткласи.*

Единствената разлика е во видот на моноклонските противтела кои се користат (во случајов би користеле моноклонски противтела кон K3, K4 и K1 инхибитор).

10.3. Задача

Да се определи комплементната активност во серум од пациент и да се пресмета стандардната права на Слика 10.3, како и CH50 во Табелата 10.3.



Слика 10.3: Формулар за пресметување CH50 за комплементната активност во серумот.

Табела 10.3: Пример за пресметување CH_{50} на комплементот и формулар за негово пресметување.

Пример				Случај			
Епрувета	**Серум (мЛ)**	**Екст. (нм)**	**у/1-у**	**Епрувета**	**Серум (мЛ)**	**Екст. (нм)**	**у/1-у**
1	0.1	0.12	0.12 (0.10/0.96-0.10)	1	0.1		
2	0.15	0.17	0.19 (0.15/0.96-0.15)	2	0.15		
3	0.2	0.22	0.26 (0.20/0.96-0.20)	3	0.2		
4	0.3	0.29	0.39 (0.27/0.9-0.27)	4	0.3		
5	0.4	0.37	0.57 (0.35/0.96-0.35)	5	0.4		
6	/	0.02	/	6	/		
7	/	0.96	/	7	/		
Хемолитички единици (ХЕ)	46.8 ХЕ во 1 мЛ (1.56x30) (0.64 мЛ има 1 ХЕ)			Хемолитички единици (ХЕ)			

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

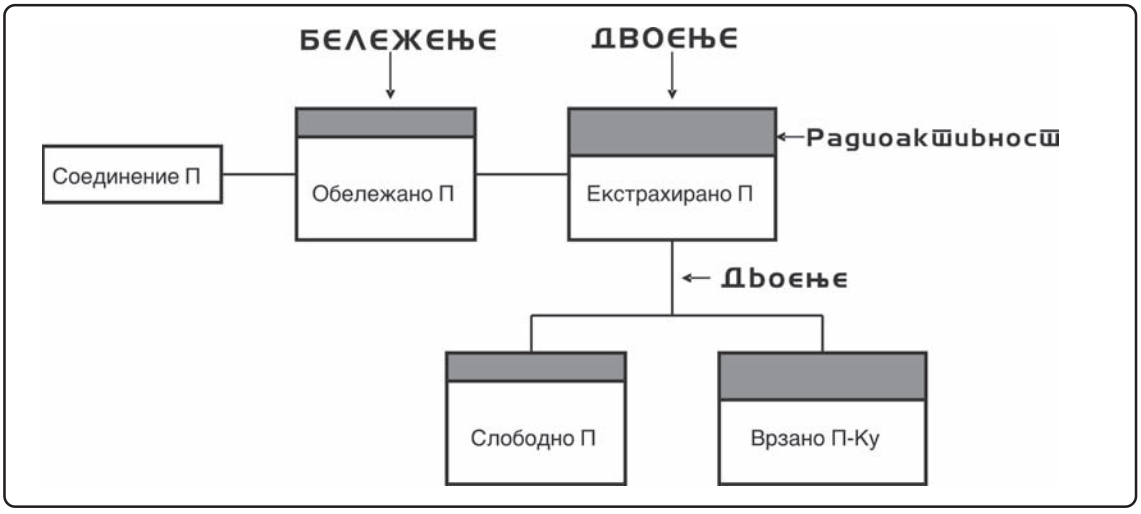
_____ _____ _____

ВЕЖБА 11: ЦИТОКИНИ

11.1. Заситувачки методи

Од заситувачките методи најпрвин се воведени радиоимунолошките методи за определување мали концентрации материи во ткивата и телесните течности (1960). Yalow и Berson добија Нобелова награда за имунологија, за истражувањето при определување на инсулинот во серумот.

Подоцна се воведени ензимоимунолошките методи со нешто помала осетливост, а најдоцна имунофлуоресцентните



Слика 11.1: Шемата на Екинс во која се поставени основите на заситувачките методи од кои се развија радиоимунолошките, ензимоимунолошките и флуороимунолошките одредувања. Засенченото поле го прикажува обележениот дел од супстанцијата.

методи за определување мали концентрации материи. Заеднички белег на сите методи е принципот на заситување воведен од Екинс во 1960 година, објавувајќи го методот за определување тироксин во серумот.

11.1.1. Општи принципи на заситувачките методи

Основниот принцип на заситувачките методи е прикажан од Екинс со едноставниот пример на кофа со вода и една

чаша: секогаш кофата вода може да се измери со една чаша (ако се знае нејзиниот волумен). Основно во овој метод е да му се овозможи на соединението што се мери (P) да реагира со специфичен рецепторен реагенс (Q), кој има ограничен капацитет на врзување.

Соединението P по заситувањето со Q, се дели на два дела (слободно P и врзано P-Q), така што нивниот сооднос варира како функција од вкупната количина на соединението P (Слика 11.1).

За да можат овие методи да се користат неопходно е ефикасно да се одвои врзаната од слободната материја и да се измерат нивните количини.

11.2. Имуноензимски одредувања (ЕЛИСА)

Имуноензимските методи користат ензим како одбележувач за определување специфичната реакција противген: противтело. Со нив може да се докажуваат противтела и противгени. Оваа методологија се појави во 1971 година со задача да ја замени радиоимунолошката методологија, односно да користи реагенси кои не се радиообележени, а притоа да не изгуби од осетливоста, точноста и другите високо оценети карактеристики на радиоимунолошките техники.Така, имуноензимските методи користат доста искуства од радиоимунологијата и имунофлуоресценцијата.Од 1972 година овие одредувања веќе се користат како многу погодни и во хисто- и цитохемиските методи. Подготовките на реагенсите, одвивањето на реакцијата и читањето на резултатите е прилично сложена процедура, меѓутоа дава многу прецизни резултати.

11.2.1. Подготовка на имуноатсорбентот

Се користат бројни атсорбенти способни да ги фиксираат противгените или противтелата пасивно или со ковалентна врска. При пасивната атсорпција протеините се дилуирани од 1 до 10 мкг/мЛ во алкален раствор со pH 9.6 и на пластика или стакло се атсорбираат за неколку часа. Како солидни носачи се употребуваат на пр. полистирен, поликарбонат, пропилен или латекс во форма на топчиња, плочки, ѕвездички, епруветки или микроплочки. Денес, најчесто се користат микроплочките од полистирен кои овозможуваат истовремено тестирање поголем број примероци и користење автоматика.

Адсорпцијата со ковалентна врска добиена во солидна фаза со противгенот или противтелото е цврста, иреверзибилна врска и овозможува максимална прецизност во испитувањето, додека кај пасивната врска, пластиката нема секогаш ист капацитет за врзување-атсорбирање и врската не е толку цврста па има пуштање - дезатсорбирање со краен ефект - погрешни резултати. Се користат сефадекс,

целулоза, агароза, акриламид или полистирен со глутаралдехид или авидин. Денес оваа фаза фабрички е извршена и комерцијално се набавуваат готови реактиви.

11.2.2. Конјугирање

Како конјугат се користи ензим што треба да задоволи определени карактеристики за да биде погоден обележувач. Тој треба да е солубилен, да обезбеди висок степен на чистота, да има соодветна каталитичка активност, да ја задржува специфичната активност додека е врзан за реагирачкиот супстрат, да е стабилен за време на чувањето и во текот на реакцијата, да овозможува едноставна, брза и осетлива ензимска реакција, да не стапува во реакција со биолошката средина и да е отсутен во околната средина што се употребува во реакцијата.

11.2.3. Спојување ензим со противтело или противген

Во имуноензимските реакции се користат посебни хемиски агенси кои овозможуваат спојување на ензимот со противтелото или пак, со противгенот. Тие не треба да влијаат врз активноста на ензимот, ниту врз текот на имунолошката реакција. За ваква цел, најмногу се користи 1% раствор глутаралдехид по таканаречениот метод во две времиња, кој е воспоставен 1971 година. Во прво време настапува фиксирање на молекулата од глутаралдехидот (тој е диалдехид) за NH_2 групата од ензимот. За да се отстрани вишокот на реактивите агенсите се филтрираат низ гел. Потоа во второ време настапува фиксирање на втората алдехидна реакција од глутаралдехидот што останал слободен за NH_2 групата од протеинската молекула од противтелото или од противгенот. За ова спојување може да се користат и p-benzoquinone, carbodiimide, dimaleimide, cyanobromide и др.

11.2.4. Одвивање на реакцијата

Реакцијата може да се одвива во т.н. хомогена или хетерогена фаза. Во хомогена фаза реакцијата се одвива директно. Активноста на ензимскиот обележувач е модифицирана во противген-противтело реакцијата, а противтелата играат улога на специфичен реактив со изразен принцип на компетиција. Реакциите со хомогена фаза се едноставни, брзи, може да се автоматизираат, но помалку се осетливи од оние со хетерогена фаза.

Овде се користат различни ензими и супстрати како на пр. лизозим со мрежа од micrococcus luteus (се чита турбидометриски) или пак, beta D-galactosidase со 0-nitrophenil beta D galactopyrannoside- (се чита спектрофотометриски). Во хетерогената фаза во првиот дел постои реакција меѓу атсорбираниот противген за супстрат (доколку се докажуваат противтела, а при докажување противген

реакцијата се поставува спротивно) со специфично противтело и со серумот што се испитува, а потоа се додава противпротивтело обележено со ензим кое стапува во реакција со врзаните противтела за фиксираниот противген, доведува до промена на бојата и овозможува читање на тестот. И во оваа фаза се користат различни ензими и супстрати, но најчесто peroxydase со супстрати: diaminobenzidine, tetramethylbenzidine; Phosphatase alcaline со P-nitrophenylphosphate; Beta-D-galactosidase со 0-nitrophenil-B-D-galactopyrannoside и сите се читаат спектрофотометриски.

Денес имуноензимолошките реакции најмногу ја користат хетерогената фаза и како најчесто употребуваниот метода е ЕЛИСА (Enzyme Linked Immunoadsorbent Assay) тестот. Методот е опишан во 1971 година од Engvall и Permann и во основа содржи директен натпревар меѓу противтелата (имуноатсорбирани за микроплочка и оние што се споени со ензимот) за врзување со специфичниот противген кој треба да се определи.

11.2.5. Читање на резултатот

Ензимите заедно со другите супстрати треба да овозможат точно читање, што се врши со нивно мерење-определување: турбидометриски, спектрофотометриски, колориметриски, а уште попрецизно со помош на флуориметрија или луминисценција.

За определување противгени, се користат повеќе интернационално определени (еталонирани) стандарди. Потребно е да се има и сопствени внатрешни и надворешни контроли. Количината на противгенот се пресметува од добиените вредности за интензитетот на активноста интерполирана од добиената стандардна крива.

Квалитативното определување позитивен наод за противтела се добива од пресметаниот индекс според оптичката густина (ОГ):

- ОГ позитивна/ ОГ негативна> 1.5 ;

- ОГ силно позитивна/ ОГ слабо позитивна> 1.8.

Титарот на противтелата може да се добие од определена крива која е конструирана според наодите од различни оптички густини.

11.3. Одредување концентрација на цитокини

11.3.1. Општо за одредувањето цитокини

Дијагностичката проценка на цитокините се врши ин виво, екс виво и ин витро. Целокупната постапка опфаќа

одредување на нивната генска експресија, одредување на нивната концентрација и проценка на нивниот ефект.

Ин виво проценката служи за докажување присуството на цитокините во крвта, телесните течности и ткивата. Поради редундантниот и плеотропниот ефект на цитокините, нивната ин виво проценка е попогодна за проценката на активноста на процесот на заболувањето (на пр. некој вид на несакани имунолошки одговори, какви што се отфрлањето на пресадениот орган, автоимуните заболувања, инфективните заболувања и др.), одколку за диференцијално дијагностички цели.

Како рутинска дијагностичка постапка, одредувањето на цитокините на ниво на гРНК или на ниво на белковина, сеуште има ограничена употреба. Ваквата ограниченост, особено при одредувањето на цитокините во крвта и/или клетките, се должи на фактот што имунолошкиот одговор најчесто се одвива во различните компартмани, недавајќи ја при тоа вистинската слика на системско ниво. Но и покрај се, постојат извесни индикации кај кои одредувањето на коцентрацијата на цитокините може да има клиничко значење.

Ин витро одредувањето на концентрацијата на цитокините ни овозможува да ја одредиме способноста на одредени клетки да лачат цитокини по нивната стимулација со различни материи. Екс виво одредувањето на нивната концентрација ни овозможува да ја одредиме способноста на одделни клетки да лачат цитокини ин витро, откако биле изложени ин виво на одреден вид на терапија. Ваквите ин витро/екс виво одредувања, наречени и уште “тестови со полна крв”, веќе се изборија за своето место во рутинската дијагностика. За таа цел се зема крв со противкоагуланс, се разредува со медиум и се инкубира неколку часа со различни стимуланси. Потоа се мери количината на цитокинските рецептори кои ќе се појават на клетките, како и/или количеството на одредени цитокини во супернатантот. Ваквата постапка е лесна за изведување, може да се повтори, а што е најважно од се, многу е слична на она што се случува во организмот. Ваквите тестови се употребуваат во дијагностицирањето на првичните и вторичните имуни недостатоци, во проценката на имуномодулаторниот ефект во текот на терапијата, откривањето на присуство на ендотоксини во ткивните течности, како и при реакциите кон туѓите противгени.

Одредувањето концентрацијата на цитокините не преставува некој поголем проблем, со оглед на фактот дека постојат повеќе методи кои служат за директното мерење на нивната концентрација. Проблемот се јавува кога треба да се протолкуваат добиените резултати. Некогаш употребуваните биоесеји сега комплетно се заменети со ензиматиски имунотестови.

Бидејќи цитокините својата активност ја пројавуваат во пикомоларни количини, потребно е употребуваните методи да поседуваат голема сензитивност. Едно од најголемите ограничувања во можноста за дијагностичка примена на одредувањето на цитокините, произлегува од нивниот

краток биолошки полуживот во плазмата, кој најчесто е мерен во минути (со исклучок на некои, како на пр. ИЛ-12). Во останатите причини спаѓаат и: врзувањето на цитокините за нивните рецептори на површината на клетките, како и за растворените рецептори во крвта; врзувањето за белковините на плазмата; нивното протеолитички разградување; како и нивното елиминирање преку бубрезите. Дополнително ограничување преставува и фактот дека по стимулација, цитокините се лачат само неколку часа и тоа повеќе локално отколку системски.

11.3.2. Изведување на вежбата (Одредување концентрација на интерлеукин 1б)

11.3.2.1. Потребен материјал за изведување на вежбата

За одредување на концентрацијата на цитокините во серум/плазма неопходни се:

- примерок на серум/плазма
- пластичен носач за стрипови
- стрипови (секој стрип има 8 бунарчиња)
- пуфер за плакнење (pH 7.8)
- вторично противтело (противтело кон соодветниот цитокин за кое има врзано биотин)
- стандарди за ИЛ-1бета (0.31 pg/mL; 0.63 pg/mL; 1.25 pg/mL; 2.5 pg/mL; 5.0 pg/mL; 10.0 pg/mL)
- стандарден раствор за разредување
- засилувачки раствор Amdex
- пуфер за плакнење на бунарчињата
- 3,3'5,5'-тетра-метил бензидин (ТМБ) субстрат
- раствор за стопирање на реакцијата (0.18 M сулфурна киселина)
- самолепливи ленти за покривање на полочката
- пипети од 25 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL и 1000 µL
- пластични продолжетоци
- апарат за континуирано мешање
- апарат за автоматско плакнење бунарчиња
- спектрофотометар (Victor^2)

11.3.2.2. Припрема на пуфер за плакнење на бунарчињата

Се земаат 50 mL од концентратот за плакнење и се префрлаат во чиста колба од 2000 mL. Концентратот се разредува 30

пати со додавање на 1500 mL дестилирана вода. Вака припремениот пуфер за плакнење е стабилен 2 недели на температура од +2 до +8°C доколку се чува во добро затворен контејнер.

11.3.2.3. Припрема на работниот раствор на цитокинскиот стандард

Сувата супстанца во шишенцето се раствора со дестилирана или дејонизирана вода. Количината на потребната дестилираната/дејонизираната вода потребна да се раствори сувата супстанца е дадена на самото шишенце. Се меша внимателно (со превртување на шишенцето).

11.3.2.4. Припрема на засилувачкиот раствор Amdex

Се припрема веднаш (не подолго од 15 минути) пред неговото ставање во бунарчињата. На сувата супстанца се додаваат 11 мЛ дестилирана или дејонизирана вода. Вака приготвениот засилувачки раствор е стабилен 1 недела на температура од -15 до -30°C доколку се чува во добро затворен контејнер.

11.3.2.5. Стандарден раствор за разредување

Многу е важно растворот за разредување да ја отсликува природната средина на примерокот. Во случаите кога како примерок користиме серум, плазма или урина, за разредување употребуваме стандарден растворувач. Ако работиме со супернатант од култура на клетки, како разредувач ќе го користиме медиумот во кој е одржувана културата на клетки.

11.3.2.6. Примерок

Со развојот на тестови во чија основа лежат имунолошките реакции, овозможено е одредување на нивото на цитокините во различни телесни течности (на пример урина, синовијалната течност, серум, плазма и др.) Сепак како најчести примероци се користат плазмата и серумот. Кон сите овие примероци, кои се користат за одредување концентрацијата на цитокините, треба да се однесува како кон потенцијално инефективни материјали, па затоа со нив треба да се ракува според законските упатствата за работа со такви материјали.

Во зависност од комплетот за работа кој се користи, потребни се од 50-200 μЛ серум или плазма (иако најголем дел од авторите сметаат дека е подобро да се користи плазма). Доколку се користи серум крвта се зема со венепункција, се остава да сосири и се одвојува серумот со центрифугирање (5 минути на 4000 ввм). За добивање плазма се користи крв земена со натриум цитрат, хепарин или ЕДТА. Доколку е тоа можно, потребно е плазмата и клетките да се издвојат од 30 минути до 2 часа од земањето на примерокот на крв, за да се спречи ензимското распаѓање

и инактивацијата на цитокините, но и поради фактот што некои од факторите кои предизвикуваат сосирување можат да предизвикаат активација на цитокините/рецепторите. Општо земено, примероците можат да се чуваат на +4°Ц кратко време. Ако е неопходно примерокот да се чува подолго од 1 ден, тоа треба да се направи на -20°Ц, а ако треба да се чува подолго од една недела, тоагаш треба да се чува на -80°Ц. Исто се постапува и со примероците од другите телесни течности. Треба да се избегнува одмрзнување и повторно замрзнување на примерокот. Доколку се користи серум, не треба да се користат хемолизирани примероци и примероци кои стоеле несмрзнати повеќе од 24 часа.

Доколу се добијат резултати над горната граница на тестот, тогаш примерокот треба да се разреди (со стандардниор разредувач или со медиум за култура на клетки) и повторно да се изведе тестот.

11.3.2.7. Протокол за работа

11.3.2.7.1. Приготвување на стандардите

1. Се обележуваат 6 полипропиленски епрувети (0.31 pg/mL, 0.63 pg/mL, 1.25 pg/mL, 2.5 pg/mL, 5 pg/mL и 10 pg/mL).

2. Во епруветата обележена со 10 pg/mL се пипетира 990 μL од стандардниот разредувач.

3. Во сите останати епрувети се пипетира по 500 μL од стандардниот разредувач.

4. Во епруветата обележена со 10 pg/mL се пипетира 10 мЛ од работниот раствор на цитокинскиот стандард и добро се промешува.

5. Од епруветата обележена со 10 pg/mL се префрлаат 500 μЛ во епруветата обележена со 5 pg/mL и добро се промешува.

6. Ваквиот начин на двојно разредување се повторува последователно во сите преостанати епрувети.

11.3.2.7.2. Изведување на тестот

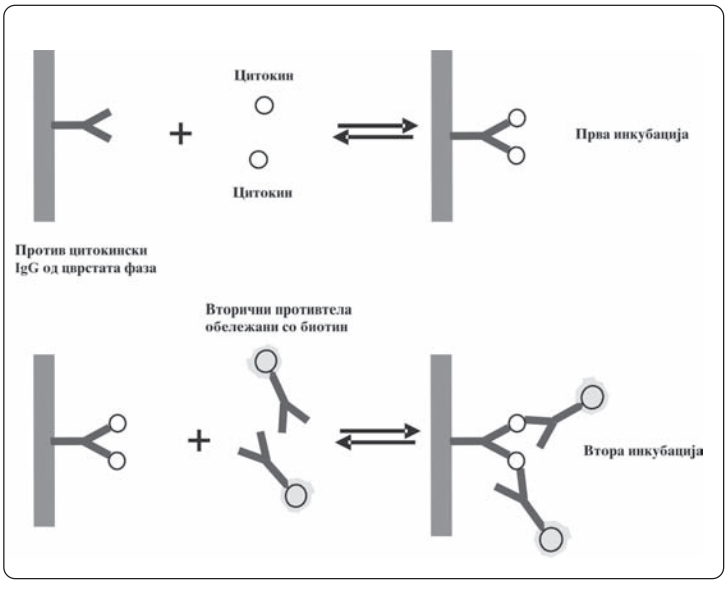
Концентрацијата на цитокините или нивните рецептори во примерокот се одредува со помош на ЕЛИСА методот или со помош на други ензимски имунотестови. Денеска постојат најразлични комерцијално достапни комплети за одредување на концентрацијата на цитокините кои не секогаш даваат приближно еднакви резултати. Некои од резултатите кои се добиваат од овие различни тестови, за жал неможат да се споредат.

Со напредокот на имунолошките техники, создадени се различни видови на имунолошки тестови кои овозможуваат брзо, точно и едноставно мерење на различни параметри во телесните течност (серум, плазма, синовијална течност, урина и др). ЕЛИСА тестовите се повеќе се користат за овие намени.

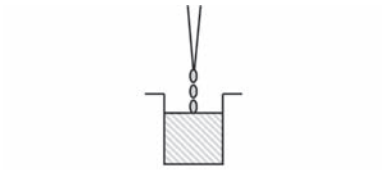
Самите имуни тестови преставуваат алтернатива за

биолошките методи и проточната цитометрија. Тие се едноставни за изведување, а резултатите се добиваат за неколку часа.

Најчесто употребуваната ЕЛИСА метода користи два вида на противтела. Едните, наречени уште и имобилизирачки противтела, се врзани за цврстата фаза на тестот, најчесто микротитрациона плоча со 96 бунарчиња. Како цврста фаза може да се јават и полистиренски топчиња и магнетни партикли, кои исто така често се користат во автоматизираните ЕЛИСА техники. Противтелата кои се наоѓаат во цврстата фаза, а кои се со висок афинитет, служат да ја врзат за себе материјата од интерес која се наоѓа во испитуваниот примерок. После првото миење на бунар-чињата, се додава второто противтело. Тоа е специфично за различен епитоп на одредуваната материја, поради што со неговото врзување за веќе врзаната испитувана материја за првичното противтело, се создава сендвич. За второто противтело, кое уште се нарекува и детектирачко против-тело, е врзан ензим биотин, HRP (horseradih peroksidase) или алкална фосфатаза (Слика11.2). Во некои методи второто противтело се обележува со една материја со мала молекулска маса, како што е на пр. ФИТЦ (флуоресцентен тиоцијанат), а потоа целиот комплекс се одредува со против-ФИТЦ за кој е врзан ензим. Ова трето противтело за кое е врзан ензим, најчесто HRP, е универзално противтело, кое може да се користи во различни тестови кај кои што специфичното противтело е насочено кон материите кои сакаме да ги одредуваме во примерокот. Со малата молекулска маса на ФИТЦ (389 Да) се отстрануваат сите проблеми кои можат да се јават поради сложените четиридимензиони структури во просторот, како кога детекти-рачкото противтело би било обележано со големи молекули, каква што е HRP (40 кДа). После второто миење на бунарчињата, се додава засилувачкиот расвор Amdex. Засилувачкиот раствор преставува специфичен мултифункционален конјугат со уникатна структура која содржи



Слика 11.2: Принципот на одредување концентрација на цитокини во примерокот.



Колона/ред	1	2	3	4	5...
A	Ср	Ср	Пр 2	Пр 2	
B	Ст 1	Ст 1	Пр 3	Пр 3	
C	Ст 2	Ст 2	Пр 4	Пр 4	
D	Ст 3	Ст 3	.....	.....	
E	Ст 4	Ст 4			
F	Ст 5	Ст 5			
G	Ст 6	Ст 6			
H	Пр 1	Пр 1			

Слика 11.3: Распоред на стандардите и примероците за определување цитокини.

молекули на HRP и стрептавидин. Овој конјугат се врзува за цитокинот за кого се врзани и првичното и вторичното противтело. Врзувањето на противтелата станува видливо кога ензимот врзан за детектирачкото противтело и засилувачкиот раствор реагира со додадениот субстрат 3,3'5,5'-тетра-метил бензидин (ТМБ). По извесно време реакцијата се стопира со додавање на 0.18 М сулфурна киселина. На крај обојувањето се чита на соодветна бранова должина со спектрофотометар или ЕЛИСА читач. Интензитетот на обојувањето е правопропорционален со концентрацијата на испитуваниот цитокин во примерокот.

Сите стандарди и примероци се работат во дупликат. За секој тест треба да се направи нова стандардна права. Сите хемикалии и примероци пред да се почне со работа треба да се загреат на собна температура (+20 - +25^{0}C).

1. Во носачот се става потребниот број на стрипови (пластични бунарчиња). Вишокот на стрипови се враќаат во пластичното кесе. Од кесето се истиснува воздухот и внимателно се затвора.

2. Се пипетира по 100 µL од стандардниот разредувач (Ср), стандардите (Ст) и непознатите примероци (Пр) во бунарчињата, според прикажаната шема (Слика 11.3, долу).

3. Носачот се покрива со самолеплива лента и се инкубира 2 часа (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша.

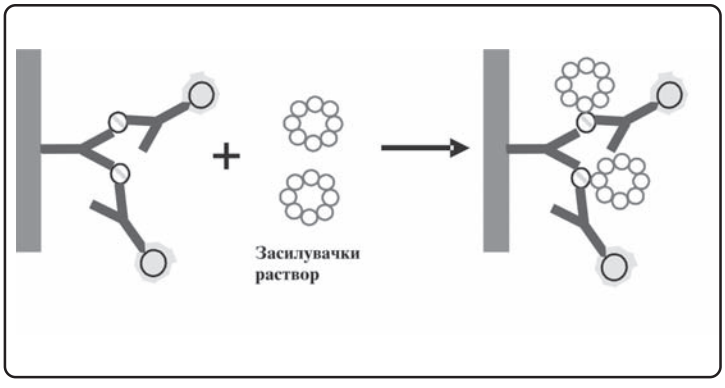
4. Сите бунарчиња се плакнат четири пати со пуфер за плакнење.

5. Во секое од бунарчињата се додава по 100 µL од вторичното противтело (противтело кон соодветниот цитокин за кое има врзано биотин). При неговото ставање треба да се внимава врвот на продолжетокот да не го допре ниту бунарчето ниту неговата содржина (Слика 11.3, горе).

4. Носачот повторно се покрива со самолеплива лента и се инкубира еден час (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша.

6. Сите бунарчиња се плакнат четири пати со пуфер за плакнење.

7. Во секое од бунарчињата се додава по 100 µL на претходно припремениот засилувачкиот (Amdex) раствор. Додавањето на засилувачкиот (Amdex) раствор се изведува на ист начин



Слика 11.4: Механизам на дејство на засилувачкиот раствор при определувањето цитокини.

како и додавањето на вторичното противтело (Слика 11.4).

8. Носачот се покрива со самолеплива лента и се инкубира 30 минути (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша.

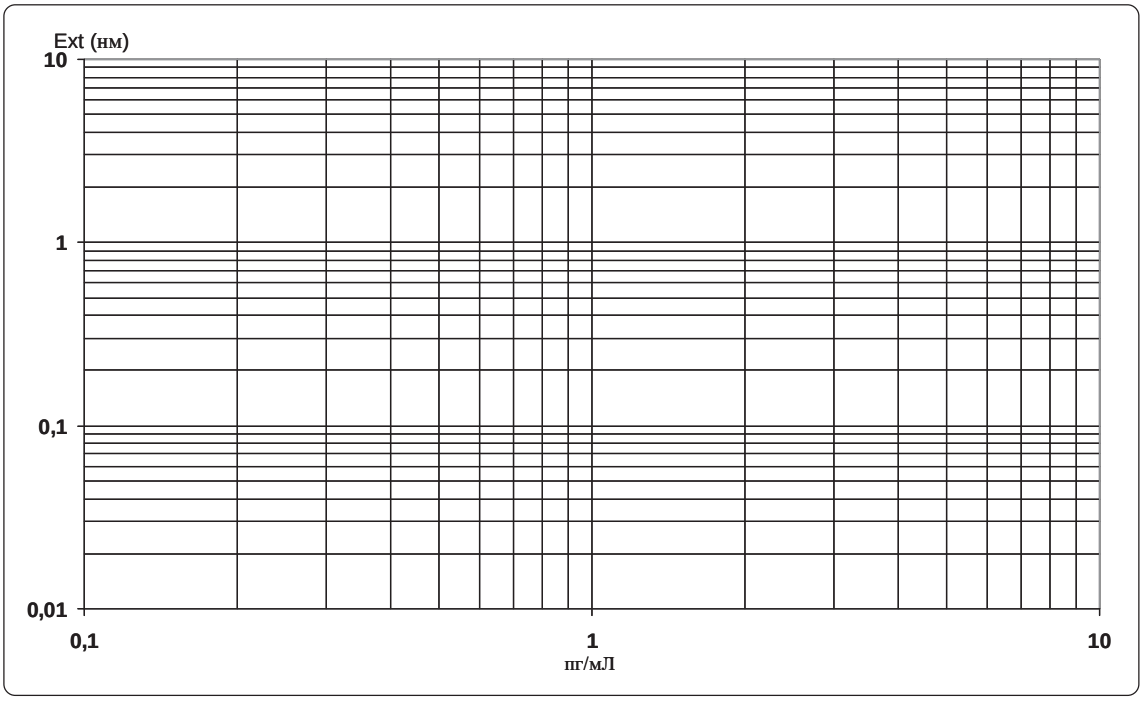
9. Сите бунарчиња се плакнат четири пати со пуфер за плакнење.

10. Директно од шишенцето се додава 100 μL од 3,3'5,5'-тетра-метил бензидин (ТМБ) субстратот.

11. Носачот се инкубира 1 час (±5 минути) на собна температура. За време на целата инкубација носачот внимателно се меша. Во текот на оваа инкубација носачот не се покрива со самолеплива лента.

12. Се проверува дали секој стрип е правилно наместен во своето лежиште и се мери абсорбанцата на 450 нм, со помош на спектрофотометар (Victor^2).

12. Пресметување на резултатите. Апаратот Victor^2 содржи програм за автоматско генерирање на стандардни прави од измерените вредности за стандардите, како и за автоматско пресметување на непознатите примероци.



Слика 11.5: Билогаритамски формулар за определување концентрација на цитокини.

11.3. Задача

Да се пресмета концентрацијата на интерлеукинот 1β според протоколот . Конструирањето на стандардната права се изведува на Слика 11.5. Отчитаните и пресметаните резултати од цитокиноте се внесуваат во дадената Табела 11.1.

Табела 11.1: Пример за пресметувањеконцентација на ИЛ-1бета.

Пример				Случај			
Станд./ примерок	**Ext (nm)**	**Средна вред.(нМ)**	**Конц. (пг/мЛ)**	**Станд./ примерок**	**Ext (nm)**	**Средна вред.(нМ)**	**Конц. (пг/мЛ)**
Ст 1	0.067/0.060	0.0635	0.31	Ст 1			0.31
Ст 2	0.212/0.221	0.2165	0.63	Ст 2			0.63
Ст 3	0.472/0.502	0.487	1.25	Ст 3			1.25
Ст 4	1.049/1.082	1.0655	2.5	Ст 4			2.5
Ст 5	1.763/2.032	1.8975	5	Ст 5			5
Ст 6	2.469/2.391	2.43	10	Ст 6			10
Поз	2.00/2.10	2.053	5.72	Поз.			
Нег	0.082/0.086	0.084	0.31	Нег.			
8109	0.066/0.066	0.066	0.25				
8139	0.403/0.384	0.3935	1.27				
8155	0.066/0.072	0.069	0.26				
8175	0.061/0.057	0.93	2.7				
8243	0.061/0.054	0.0575	0.22				
8249	1.95/1.95	1.95	5.46				
8321	0.123/0.124	0.1235	0.44				
8324	0.076/0.075	0.075	0.28				
8351	0.649/0.669	0.659	2.03				
8377	1.619/1.620	1.6195	4.61				
8379	0.105/0.103	0.104	0.38				
8418	0.079/0.064	0.0715	0.27				
8477	0.071/0.060	0.0655	0.25				
8501	0.830/0.834	0.832	2.51				

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

ВЕЖБА 12: АНАЛИЗА НА КОМПЛЕМЕНТЕН СИСТЕМ И ЦИТОКИНИ

12.1. Нормални вредности од испитување комплементен систем

Нормалните вредности од компонентите на комплементниот систем се различни за деца и за возрасни, особено за К3 и за К4 и се искажуваат во г/Л (Табела 12.1).

Возраст	К3 (г/Л)	К4 (г/Л)
новородени	0.58-1.08	0.07-0.235
до 3 месеци	0.67-1.24	0.09-0.305
до 6 месеци	0.74-1.38	0.1-0.35
до 9 месеци	0.78-1.44	0.115-0.39
до 12 месеци	0.80-1.5	0.12-0.4
2-10 години	0.8-1.5	0.125-0.425
12-18 години	0.85-1.6	0.14-0.43
до 20 години	0.82-1.6	0.15-0.43
до 30 години	0.84-1.6	0.16-0.46
40-70 години	0.9-1.7	0.18-0.49

Табела 12.1: Нормални вредности на К3 и К4 зависно од возраста на испитаникот.

Резултатите од комплементниот систем можат да се анализираат како концентрација на факторите, кога зборуваме за протеинска концентрација, или како активност (функција) на компонентите.

Ако протеинската молекула која се синтетизирала нема биолошки ефект, тогаш зборуваме за неефикасен протеински фактор (незрел фактор, недостаток на активност на факторот). Во таков случај неопходно е истовремено да се одредуваат и концентрацијата и биолошката активност на соодветниот фактор.

На Табела 12.2. дадени се концентрациите на протеините на некои фактори кај возрасни луѓе и биолошката активност на некои комплементни фактори кои најчесто се испитуваат

во имунологијата. Концентрацијата на протеините (компоненти на комплемент) се искажува во г/Л, додека биолошката активност може да се искаже во единици на литар (Е/Л), ефективни молекули на еден мЛ (еф.мол.мЛ (или како релативен однос (%) (Табела 12.2).

Табела 12.2: Нормални вредности на компонентите од комплеметниот систем и биолошката активност на некои комплементни фактори.

Компонента на комплемент	Концентрација (г/Л)
K1Kjy	0.05-0.25
K1-инхибитор	0.18-0.39
K2	0.01-0.03
K4 врзувачки протеин (K4вп)	0.3
K9	0.2
Фактор Б (ФБ) [активатор на K3 (aK03)]	0.05-0.25

Активност на	Нормална вредност
ЦХ50	48-103 Е/мЛ
K1	1.15-4.0 * 10^{13} еф.мол/мЛ
K2	1.75-9.0 * 10^{13} еф.мол/мЛ
K4	0.7-3.6 * 10^{13} еф.мол/мЛ (12-60 Е/мЛ)
Ензими кои активираат комплемент	<60 Е/мЛ
K1-инхибитор	70-100%

12.2. Толкување резултати од комплементен систем

Клинички, одредувањето на комплементот служи за:

- да се открие дали комплементниот систем се активирал, и доколку има хипокомплементемиа, да се утврди дали се активирал класичниот или алтернативниот пат на комплементот;

-да се дијагностицираат конгениталните дефекти на комплементниот систем.

Испитувањата кои се прават рутински за евалуација на комплементниот систем, вклучуваат одредување на CH50, мерење на протеинската концентрација на K3 и/или K4, фактор Б, и K1-инхибитор.

12.2.1. CH50

Кај пациенти кои прв пат одредуваат комплемент, треба да се направи испитување на CH50, K3 и/или K3ц, и K4.

Одредувањето на CH50, ни дава информација за формирањето на K3 конвертаза и формирањето на класичниот пат на активација, т. е на тој начин ќе добиеме евалуација за K1-K8. Генерално, одредувањето на CH50, е скрининг тест за дијагноза на состојби асоцирани со ниска активност на комплементот. Тестот е помалку корисен за мониторинг на болести, бидејќи му недостасува неопходниот степен на аналитичка сензитивност, која е потребна за да се забележуваат промените во концентрациите на K3 и K4.

12.2.2. K3 и K4

Иако одредувањето на K3, често се користи како рутински лабораториски тест за одредување активација на комплементот, тој е неосетлив параметар и не се намалува се додека стапката на потрошувачка не ја премине на стапката на синтеза. Но, оваа состојба доста ретко се случува, бидејќи во повеќето состојби за активација на комплемент се јавува акутен одговор кој е здружен со зголемено создавање на K3. Промени во концентрацијата на K3 можат да се видат кај активна форма на СЛЕ и мембранско пролоферативен гломерулонефритис. Во случај на автоимуна хемолитична анемија и хередитарен ангионеуротски едем, K3 обично има нормална вредност додека K4 има намалена вредност. Генетскиот недостаток на K4 е поврзан со висока преваленција на автоимуни заболувања, посебно со СЛЕ.

12.2.3. K1-инхибитор

Одредување на K1-естераза инхибитор е значајно кај пациенти со повторувачки ангиоедеми на кожа, гастроинтестинален тракт, и трахеа.

12.2.4. Хиперкомплементемија

Повеќето компоненти на комплементот, особено, K3, K4, и K1-инхибитор, се реактанти на акутната фаза. За време на воспаление, тие се создаваат не само во црниот дроб, туку и во макрофагите. Такви состојби се: системски инфективни болести, не-инфективни хронични воспалителни заболувања како ревматиден артрит и физиолошки состојби (како бременост). Откривање на зголемени вредности во вакви случаи не е од особена важност. Кај активните заболувања со имуни комплекси, со активација на комплемент, добиваме редукција на CH50 или на концентрациите на компонентите од комплементот, ако тие вредности не се намалени, туку се нормални, треба веднаш да се посомневаме на зголемена синтеза на компонентите на комплемент.

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Недостаток на Фактор И: Случајот на Момир Темелковски, неконтролирана комплементна активација доведува до подложност за инфекции и исип (јадеж).

12.2.5. Хипокомплементемија

Хипокомплементемијата е важен индикатор за присуство на болести на имуни комплекси или за анализирање на активноста на заболувањето. Кога се бара клиничка асоцијација на хипокомплементемија, мора да се има на ум дека:

-многу не-имунолошки идуцирани заболувања, можат да предизвикаат намалување на серумските концентрации на компонентите од комплементот. Овие болести можат да бидат мултисистемски заболувања со

Табела 12.3: Болести каде што хипокомплементемијата е предизвикана од создавање имуни комплекси.

ЗАБОЛУВАЊЕ	ИСПИТУВАЊА
Системски лупус еритематозус (СЛЕ)	СЛЕ се карактеризира со поликлонска стимулација на Б-Ли и појава на противтела со мултипна специфичност како и комплемент-активирачки имуни комплекси. Елеминацијата на овие комплекси е многу сиромашна, поради недостатокот (дефициенцијата) на КР1 рецепторот на црвените клетки и недостаток на К4. Пациентите со бубрежни нарушувања скоро секогаш имаат хипокомплементемија, додека ова е редок случај кај небубрежните нарушувања. CH50, К3 и К4 во серумот може да се намалени. Со соодветна терапија К3 и К4 можат да се нормализираат.
СЛЕ индуциран од лекови	Некои терапевтски лекови можат да предизвикаат симптоми слични на СЛЕ, хидралазин, исониазид и пенициламин. Во нормални дози, тие го инхибираат ковалентното врзување на К4 со неговата активна страна. К4а е повеќе афектирано од К4б. Ова резултира со релативен дефицит на К4а со соодветно смалено отстранување на имуните комплекси. Прокаинамидот, кој се метаболизира до хидроксиламин, го има истиот ефект. Одредувањето на К3 и/или К3ц, и К4 ретко даваат смалени концентрации.
Бубрежни заболувања -идиопатски мембрано-пролиферативен гломерулонефрит (МПГН)	Кај тип 1 МПГН, серумските концентрации на К3 и/или К3ц, и К4 се намалени поради активација на класичната К3 конвертаза. Овие пациенти може да имаат нефритичен фактор на мембранскиот атак комплекс. Тој фактор е противпротивтело кој го активира мембранскиот атак комплекс врзувајќи се за пропердин, додека ја стабилизира алтернативната конвертаза К3бББП и создава врзна страна за К5б. Друг нефритичен фактор или К3 фактор може да се појави во тип 1 МПГН, а почесто и во тип 2 МПГН. Овој фактор многу посилно се врзува за К3 конвертазата, ја стабилизира и доведува до трошење на К3. Како резултат на ова, формирањето на клеточно-врзана К3 конвертаза можно е да не се појави и да не се активира мембранозниот атак комплекс. Тип 3 МПГН може да е здружен со намален К3 и/или К3ц, или поретко К4, но тука преовладува мислењето дека не станува збор за болести на имуни комплекси.
Синдром на хипокомплементен уртикарен васкулит (СХУВ)	СХУВ е ретко заболување. Клиничките симптоми вклучуваат уртикарен васкулит, артрит или артралгија; гломерулонефрит, како и обструктивна белодробна болест. По дефиниција, серумскиот К1ку мора да биде намален и ИгГ противтелата кон К1ку мора да бидат присутни. Иако К3 и К4 се намалени во поголем број од случаите, оваа не е секогаш случај.
Ревматоиден артрит (РА)	Одредување на К3, К4, и CH50 немаат дијагностичко значење кај ревматоидниот артрит. Кај полиартритичниот јувенилен ревматиден артрит покачувањето на К4б и Бб е во корелација со активноста на болеста.
Криоглобулинемија	Имуните комплекси, кои се јавуваат кај тип 3 криоглобулинемија, ја активираат класичната К3 конвертаза; CH50, К3 и/или К3ц како и К4 се намалени.
Хередитарен имуноглобулински недостаток	20% од пациентите со хередитарен ИгА недостаток имаат и хомозиготен К4а недостаток. Опишан е и комбиниран недостаток на К4а, ИгГ и ИгА.
Гравесова болест, тироидит	Појава на имуни комплекси кои содржат тироглобулин, болест на имуни комплекси, и намалени концентрации на К3 и/или К3ц, К4, CH50
Црнодробни заболувања	Кај црнодробните заболувања, активацијата на комплемент е честа но ретко се открива со имунохемиски одредувања на К3, К4 и CH50. Кај декомпензирана цироза на црн дроб, К3, К4, CH50 и АП50 се намалени. Ваквите состојби се со зголемен ризик за инфекции и смртност.
Хемотерапија на малигни тумори	За време на третирање на Хочкинов лимфом и лимфобластна леукемија со хемотерапија, може да се појави создавање имуни комплекси и смалување на К3 и/или К3ц, и К4.
СИДА	СИДА го активира класичниот пат на комплементниот систем врзувајќи К1ку за трансмембранозниот протеин ГП41 од инфицираните клетки. Кај пациенти со СИДА, може да се јави хипокомплементемија. Може да биде поради ХИВ-индуцирана комплементна активација или поради некои опортунистички инфекции.
Мултипен миелом	Малигната дегенерација на Б-Ли со синтеза на моноклонски противтела може да доведе до создавање против-идиотипски противтела кои се врзуваат за моноклонските противтела и создаваат имуни комплекси. Ако се активира К1, ќе се зголеми потрошувачката на К1-инх, К4 и К2. К3 и/или к3ц нема да се смалат поради оштетување во создавањето К3 конвертаза.

придружна редукција на комплементот, со клиничка слика слична на васкулит предизвикан од имуни комплекси.

-болести на имуни комплекси можат да бидат присутни иако има нормална активност на комплемент, во присуство на одговор на белковините на акутна фаза (ЦРП).

-комплементните недостатоци (дефициенции), како резултат на наследни состојби или малнутриции, големо оштетување на хепар или нефротски синдром можат да наликуваат на состојбите кои се јавуваат при активација

Табела 12.4: Болести и состојби каде што хипокомплементемијата не е предизвикана од создавање имуни комплекси.

Заболување	Испитувања
Емболија	Спонтано појавена емболија или атероматозна емболија индуцирана со внесување на катетер, резултира најчесто со активација на алтернативната К3 конвертаза. Хипокомплементемијата се јавува кратко за време и по акутниот напад. Афектираните пациенти може да имаат симптоми слични на васкулит, осипи на кожа, бубрежна слабост, гастроинтестинални крварења, еозинофилија и тромбоцитопенија.
Хемолитично-уремичен синдром, тромботична-тромбоцитопенична пурпура	Мултиорганските болести лесно можат да се помешаат со болести на имуните комплекси. Голем дел од овие пациенти имаат смалени К3 и/или К3ц, додека намален К4 е поредок. Комплементната активација не е предизвикана од имуни комплекси туку од мноштво различни механизми.
Сепса	Додека системските инфективни болести предизвикуваат зголемување на компонентите од комплементот, тешките облици на сепса ја активираат класичната К3 конвертаза. Активацијата се должи на протеолиза на К1-естераза инхибиторот. К3 и/или К3ц, К4, CH50 се намалени.
Акутен панкреатит	Панкреатичната протеаза ги претвора (конвертира) неактивните компоненти од комплементот во нивните активни форми и со тоа ја активира К3 конвертазата. К3 и/или К3ц, К4 се смалени. Во тек на неколку дена вредностите се нормализираат.
Црнодробна слабост	Кај фулминантен хепатит, на пример, намалено е создавњето на К3 и К4, додека К1ку е со нормална концентрација.
Малнутриција	Тешка малнутриција, особено кај деца, доведува до смалување на К3 и К1ку, додека К4 е со нормална концентрација.
Нефротски синдром	К3 и/или К3ц и К4 се нормални, а фактор Б, К1ку, К2, К8 и К9 може да се смалени.
Миокарден инфаркт	Лесно смалени концентрации на К3, К4
Маларија	Кај маларија смалувањето на К3 и/или К3ц и К4 за време на хемолитична епизода е мултифакторијално.
Инфекција со Херпес симплекс	К3 и/или К3ц се смалени додека К4 е со нормална концентрација.
Порфирија	Активација на алтернативната К3 конвертаза кај пациенти со еритропоетска протопорфирија доведува до смалување концентрациите на К3 и/или К3ц после изложување на сонце.
Наследна недостаточност на компонентите на комплементот или контролните протеини	Наследната недостаточност е состојба која е ретка, но е опишана кај скоро сите компоненти од комплементот и контролните протеини. Хомозиготната недостаточност резултира со **неактивност** на CH50, додека хетерозиготната со намалена активност. Недостаток на контролните протеини може исто така да поттикне состојба на комплементна недостаточност поради неконтролираната активација на К3 конвертазата; -К1инх-недостаток; К2 и К4 се намалени, но не и К3. Пациенти кај кои активацијата на К3 конвертазата е смалена поради хередитарна недостаточност на комплемент, се предиспонирани кон болести на имуните комплекси и повторувачки инфекции.

на болестите на имуни комплекси.

Приближно 50% од лицата со хередитарен К3 недостаток или недостаток на еден од компонентите на класичниот пат на активација, имаат клинички присутен СЛЕ или симптоми слични на СЛЕ.

Табела 12.5: Лабораториски наоди кај повторувачки ангиоедем.

Ангиоедем (ХАЕ)	Лабораториски наод
Тип 1	Приближно 85% од пациентите со ХАЕ имаат недостаток на К1-инхибитор. Концентрациските рамки од 0 до 50%, а обично е на 20 % од долната референтна вредност од 0.15 г/Л. За време на акутната фаза на болеста, нивото може да биде и пониско, но за време на тивката фаза серумската концентрација не е мерило за акутниот напад. Активноста на К1-инхибитор е обично помала од 25% од нормалното. Поради недостаток на К1-инх, се јавува неконтролирана активација на К1. Заради што, К4 и К2 се смалени, додека К3 е со нормална концентрација, а поретко смален. Редукцијата на К1-инхибитор, намалувањето на протеинската концентрација и серумската активност, се мисли дека е предизвикана од зголемена потрошувачка на К1-инхибитор поради зголемената активација на К1. CH50, К2, К4 и К1-инх се смалени.
Тип 2	Приближно 15% од пациентите со ХАЕ имаат функционален дефект на К1-инхибитор, во присуство на нормална или дури и зголемена протеинска концентрација. Функционалното одредување на К1-инхибитор покажува намалена активност 0.09 К1-инх/мЛ. CH50, К2 и К4 се намалени. К1-инх е нефункционален поради противпротивтелата кон него. Синдромот се карактеризира со недостаток на К1, К4 и К3 како и нормална или смалена концентрација на К1-инх, кој е секако нефункционален. Противпротивтелата се претпоставува дека го претвораат К1-инх од инхибитор во субстрат за К1ц.
Тип 3	Тип 3 се разликува од тип 2 ХАЕ. Кај тип 3, нефункционалниот К1-инхибитор е врзан за албуминот. Тип 3 К1-инхибитор може да се разликува од тип 2 протеинот, кој е исто така нефункционален, по одвојувањето (цепењето) од албуминот со помош на редуцирачки материи уште пред да се раздвојат електрофоретски.

Иако хипокомплементемијата е чест наод кај болести на имуни комплекси со вклучено бубрежно нарушување, во некои бубрежни заболувања предизвикани од имуни комплекси, хипокомплементемијата се наоѓа многу ретко или никогаш. Вакви заболувања вклучуваат гломерулопатии кај Шенлаин-Хенох (Shonlein- Henoch) пурпура, ИгА гломерулопатија, К1кју гломерулопатија, мембранозна нефропатија (идиопатска, индуцирана со лекови, или од малигнен тумор) и Гуд-Пастеровиот (Good-Pasture's) синдром.

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Хередитарен ангионевротски едем (ХАЕ): Случајот на Ратко Славески, недостаток на комуникација и на комплементна регулација.

12.3. Нормални вредности од цитокини

Нормалните вредности на некои цитокини во телесните течности се дадени во Табела 12.6. Нивната концентрација

може да се определува во серум, во плазма, во урина или во други телесни течности. Концентрацијата на цитокините се искажува во пикограми во еден мЛ (пг/мЛ). Нормалните вредности на цитокините во телесните течности зависат од лабораторискиот метод со кој се определуваат. Вредностите дадени на Табела 12.6 се добиени со ЕЛИСА методот (Табела 12.6).

Табела 12.6: Концентрации на ИЛ-1 во серум и плазма кај здрави луѓе.

Цитокин	Нормално	Цитокин	Нормално
ИЛ-1алфа	серум 0-5.4 пг/мл плазма 0 пг/мл урина 0-4.34 пг/мл	ИЛ-8	серум 1.2-16.7 пг/мл плазма 0-8.1 пг/мл урина 0-204.0 пг/мл
ИЛ-1бета	серум 0-1.5 пг/мл плазма 0 пг/мл урина 0 пг/мл	ИЛ-10	серум 0-6.8 пг/мл плазма 1-15 пг/мл урина 0-2.7 пг/мл
ИЛ-2	серум 0-4.0 пг/мл плазма 0-6.5пг/мл урина 0 пг/мл	ИЛ-13	серум 0-6.9 пг/мл ЕДТА плазма 0-23.2 пг/мл урина 0 пг/мл
ИЛ-4	серум 0-4.6 пг/мл плазма 0 пг/мл урина 0 пг/мл	ИФН	серум 0-1.1 пг/мл плазма 0-1.5 пг/мл урина 0-23.5 пг/мл
ИЛ-5	серум 0 пг/мл плазма 0 пг/мл урина 0 пг/мл	ИФН	серум 0-1.5 пг/мл плазма 0-2.6 пг/мл урина 0.5-1.2 пг/мл
ИЛ-6	серум 0-14.9 пг/мл плазма 0-1.6 пг/мл урина 0-0.6 пг/мл	ТНФ	серум 0.9-4.9 пг/мл плазма 0-1.8 пг/мл урина 0 пг/мл

12.4. Дијагностичко значење на цитокините

И покрај тоа што до денеска се откриени голем број на цитокини, засега во рутинската дијагностичка пракса значајно е одредувањето само на некои од нив (ИЛ-6, ИЛ-8 и ТНФалфа (Табела 12.7). Нивното одредување во телесните течности се користи за проценка на интензитетот на тешките воспалителни реакции. Поради плеотропното и редундантно дејство на цитокините сеуште не е докажано дека можат да бидат специфичен маркер за некое заболување, иако во последно време е докажано дека одредени заболувања се резултат на пореметувањето во цитокинската мрежа.

Одредувањето на концентрацијата на цитокините денеска најчесто се користи кога сакаме да ја одредиме тежината на едно заболување, со оглед на фактот дека превклучувањето во цитокинската мрежа најчесто корелира со степенот на оштетувањата карактеристични за даденото заболување. Ова најчесто се однесува на системските заболувања поврзани со активирање на вродениот или здобиениот имун систем (на пр. хроничната срцева инсуфициенција), поради што и доаѓа до значително зголемување на нивото на цитокините во плазмата. Кај некои заболувања (ревматоидниот артрит, Крон-овата болест, Лајмската болест и др.), доаѓа до зголемено создавање на цитокините на "воспалението", какви што се ИЛ-1 и ТНФ, додека кај други

Табела 12.7: Индикации за одредување на концентрацијата на цитокини и цитокински рецептори.

Цитокин	Заболување	Забелешка
ИЛ-6 (плазма/серум)	Сепса, траума Срцева инсуфициенција	Добар прогностички параметар (подобар од ЦРП) Показател за степенот на системското воспаление Показател за степенот на оштетувањето на органот За рана дијагноза на неонатална сепса Показател за степенот на периферна хипооксија
ИЛ-6 (урина)	Пресадување на бубрег	Знак за отфрлање и инфекција на пресадениот бубрег
ИЛ-6 (плазма)	Ревматоиден артрит	Неспецифичен маркер за активност
рИЛ-2Р (плазама, серум)	Пресадување Саркоидоза	Неспецифичен маркер за активност (знак за аларм) Маркер за активност
ИЛ-8 (плазма, серум)	Сепса, траума Срцева инсуфициенција	Показател за степенот на системското воспаление За рана дијагноза на неонатална сепса Показател за степенот на периферна хипооксиј
ИЛ-8 (бронхоалвеоларен лават)	Повеќекратна траума, изгореници	Рана дијагноза на ARDS (adult respiratory distress syndrome
ИЛ-10 (плазма, серум)	Повеќекратна траума, операции, сепса	Показател за степенот на имуносупресија Маркер за ризик од инфекциј
ТНФ (плазма, серум)	Сепса Срцева инсуфициенција	Показател за степенот на системското воспаление Прогностички параметар за менингококна сепса Негативен прогностички параметар
ТНФ (церброспинална течност)	Мултипла склероза Менингитис	Маркер за активност , особено во случај на бактериски менинги

(СИДА и системскиот лупус еритематозус) имаме намалено создавање на ИЛ-2 и ИФН-гама, цитокини кои можат да го засилат имуниот одговор. Податоците добиени од истражувањата направени кај пациентите со неонатална сепса, покажале дека одредувањето на концентрацијата на цитокините во плазмата/серумот може да помогне во раната дијагноза. На пример, неонаталната сепса може со сигурност да се предвиди веќе првите неколку часа по раѓањето доколку постои покачување на концентрацијата на ИЛ-8 и ИЛ-6. За разлика од ова, со досега употребуваниот метод на мерење на концентрацијата на белковината на акутната фаза - ЦРП, тоа беше можно дури откако ќе изминат 24-48 часа. Одредувањето пак на концентрацијата на ИЛ-1б кој циркулира во крвта, може да има прогностичка вредност. Нивото на ИЛ-1 во крвта се зголемува 1-2 дена пред да се јави отфрлање на пресадениот бубрег. Кај септичниот шок, преживувањето е во позитивна корелација со нивото на ИЛ-1б во плазмата, додека пак тежината на заболувањето е во корелација со концентрацијата на ТНФ. Нивото на ИЛ-1б се зголемува и при влошувањето на симптомите кај ревматоидниот артрит (Табела 12.8). За разлика од ИЛ-1б, ИЛ-1а е примарно поврзан со клетките, па затоа се среќава кај одредени заболувања (на пр. кај фатални случаи на церебрална маларија.

Табела 12.8: Концентрации на ИЛ во плазмата кај здрави луѓе и кај некои заболувања.

Клиничка состојба	Концентрација (пг/мЛ)
Отфрлање на пресаден бубрег	30-300
Ревматоиден артрит (ИЛ-1бета)	20-230
Септичен шок (ИЛ-1бета)	40-1250
Тешка мозочна маларија (ИЛ-1бета)	17-131
Експериментална ендотоксемија (ИЛ-1бета)	60-200

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

БЛОК 5 - ТРАНСПЛАНТАЦИЈА

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 13. ПРИКАЖУВАЊЕ ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

◈ серолошки да определат главен ткивно совпадлив комплекс.

ВЕЖБА 14. ГЕНСКА СТРУКТУРА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

◈ да определат генска структура на главен ткивно совпадлив комплекс;

◈ да определат хаплотипови на главниот ткивно совпадлив комплекс кај една фамилија.

ВЕЖБА 15. АНАЛИЗА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

◈ толкуваат резултати од главен ткивно совпадлив комплекс;

◈ анализираат случаи од трансплантација.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 13: ПРИКАЖУВАЊЕ ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС

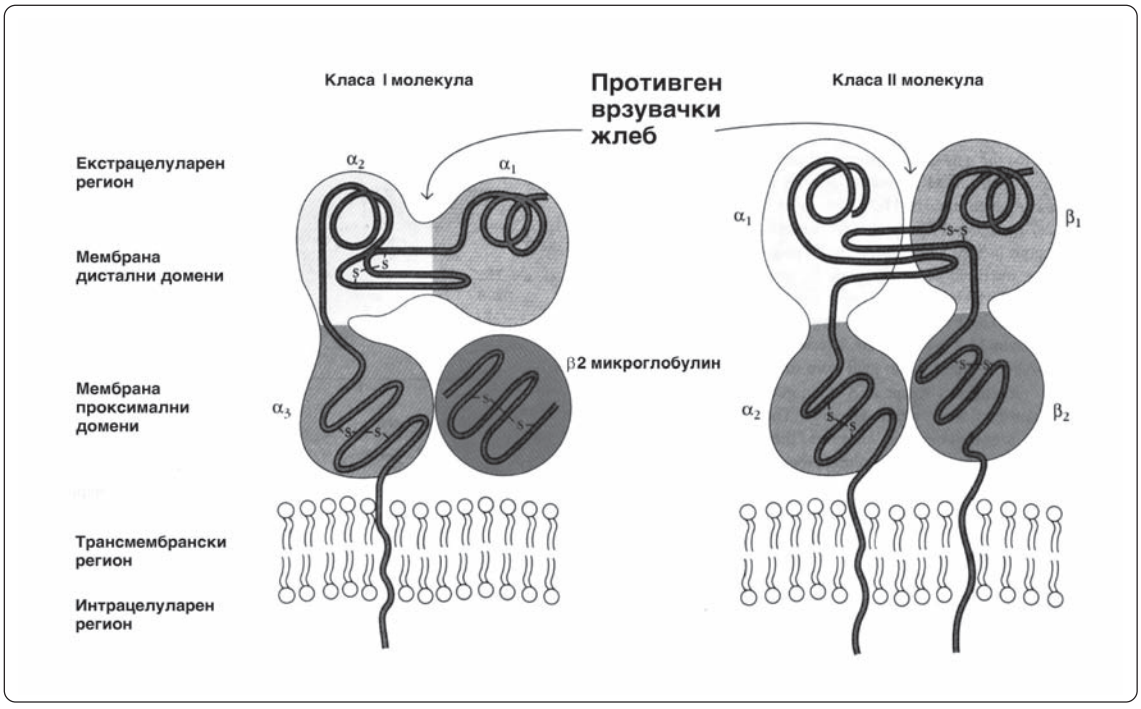
13.1. Општо за ХЛА

13.1.1. Што е ХЛА

ХЛА е кратенка од зборовите **Х**умани **Л**еукоцитни **А**нтигени кои учествуваат во имуниот одговор. Тоа се збир од молекули (гликопротеини) прикажани врз површината на скоро сите клетки кои се способни да ги прикажат противгените и да бидат препознаени од лимфоцитите. ХЛА молекулите го контролираат имуниот одговор преку препознавање свое од туѓо. Тие припаѓаат на групата молекули познати како Имуноглобулинска супергенска фамилија, во која се вклучени имуноглобулините, Т-клеточните рецептори, КД4, КД8 и други. Главна функција на ХЛА молекулите е прикажување на противгенот (протеинска верига од противгенот) кон Т- лимфоцитите и започнување специфичен имун одговор. ХЛА молекулите ги кодираат две групи гени, ХЛА класа 1 и ХЛА класа 2, а функциите на двете групи се сосема различни.

ХЛА класа 1 протеините ги кодираат гените ХЛА-А, ХЛА-Б и ХЛА-Цв (за да се разликува од комплементот, подолу само како ХЛА-Ц). Класа 1 молекулите се наоѓаат на скоро секоја клетка во човековото тело и тие им ги прикажуваат противгените на цитотоксичните Т лимфоцити (Тцт-Ли) (КД8+ Т-Ли). Класа 1 молекулите се изградени од две вериги (Слика 13.1), тешка верига (трансмембрански полипептид) кодирана од гените за ХЛА-А, ХЛА-Б и ХЛА-Ц на кусиот крак од 6 хромозом, и лесна верига, бета-2 микроглобулин (кој не е трансмембрански полипептид, а е кодиран од ген на 15 хромозом).

ХЛА класа 2 протеините ги кодираат гените ХЛА-ДР, ХЛА-ДКу и ХЛА-ДП. Класа 2 молекулите, спротивно од класа 1 молекулите, се наоѓаат само на Б-Ли, макрофагите



Слика 13.1: Приказ на класа 1 наспроти класа 2 молекулите од ХЛА.

и други противген прикажувачки клетки (ППК). Класа 2 молекулите се состојат од два трансмембрански полипептиди, алфа верига и бета верига (Слика 13.1). Бета веригата е многу повеќе полиморфна во споредба со алфа веригата. Поради тоа ХЛА типизирањето се врши на бета веригата (ХЛА-ДРБ1, ХЛА-ДРБ3, ХЛА-ДРБ4, ХЛА-ДРБ5, ХЛА-ДКуБ1 и ХЛА-ДПБ1).

Различието на главниот ткивно совпадлив комплекс (ГТСК) помеѓу индивидуите од ист вид претставува *полиморфизам* на ГТСК. Полиморфизмот значи присуство на повеќе алели во одреден генски локус кај различни единки од ист вид со поголема фреквенција од 1% во популацијата.

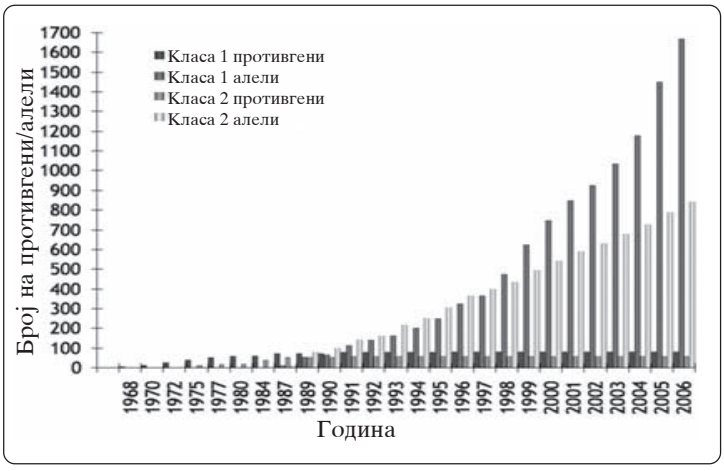
Структура на молекулите од ХЛА класа 1 и класа 2. Молекулите на ХЛА класа 1 имаат по една копија од двата полипептидни ланци: тежок ланец-алфа (α) - полиморфен; и лесен ланец - бета 2 (β2) микроглобулин-мономорфен. Генот кој го кодира (β2) микроглобулинот е надвор од ХЛА комплексот и се наоѓа на 15-от хромозом кај човекот. Полиморфизмот на ХЛА-А, -Б и -Ц молекулите е резултат на разликите во аминокиселинската секвенца на тешкиот ланец на ХЛА класа 1. Највеќе од овие разлики произлегуваат од нуклеотидна супституција во егзон 2 и 3.

Молекулите на ХЛА класа 2 се изградени од една алфа и една бета верига. За разлика од полиморфизмот кај ХЛА класа 1, кој се должи на полиморфизмот на гените за тешкиот ланец, полиморфизмот на ХЛА класа 2 потекнува од алфа и бета ланците, а најполиморфен е егзон 2.

Полиморфизам на гените од ХЛА. Класични ХЛА гени за

ХЛА класа 1 се ХЛА-А, Б и Ц, а некласични се ХЛА-Е, Ф, Г, Х, J, К, Л. Гените за ХЛА прва класа се високо полиморфни и до денес (октомври, 2006) во светот се објавени 489 алели за ХЛА-А локусот, 830 за ХЛА-Б, 226 за ХЛА-Ц, 9 за ХЛА-Е, 21 за ХЛА-Ф, 23 за ХЛА-Г, 12 за ХЛА-Х, 9 за ХЛА-J, 6 за ХЛА-К, и 5 за ХЛА-Л локусот од прата класа. За ХЛА од втората класа се објавени 3 за ХЛА-ДРА, 545 за ХЛА-ДРБ, 34 за ХЛА-ДКА1, 78 за ХЛА-ДКБ1, 23 за ХЛА-ДПА1, 125 за ХЛА-ДПБ1, 4 за ХЛА-ДМА, 7 за ХЛА-ДМБ, 12 за ХЛА-ДОА и 9 за ХЛА-ДОБ. Вкупниот број ХЛА алели (октомври 2006) изнесува 2607 од сите локуси (Слика 13.2).

Со развојот на молекуларните техники, бројот на новооткриените алели секојдневно се зголемува, а новооткриените алели се објавуваат во посебна база која е достапна во научните списанија и на Интернет.



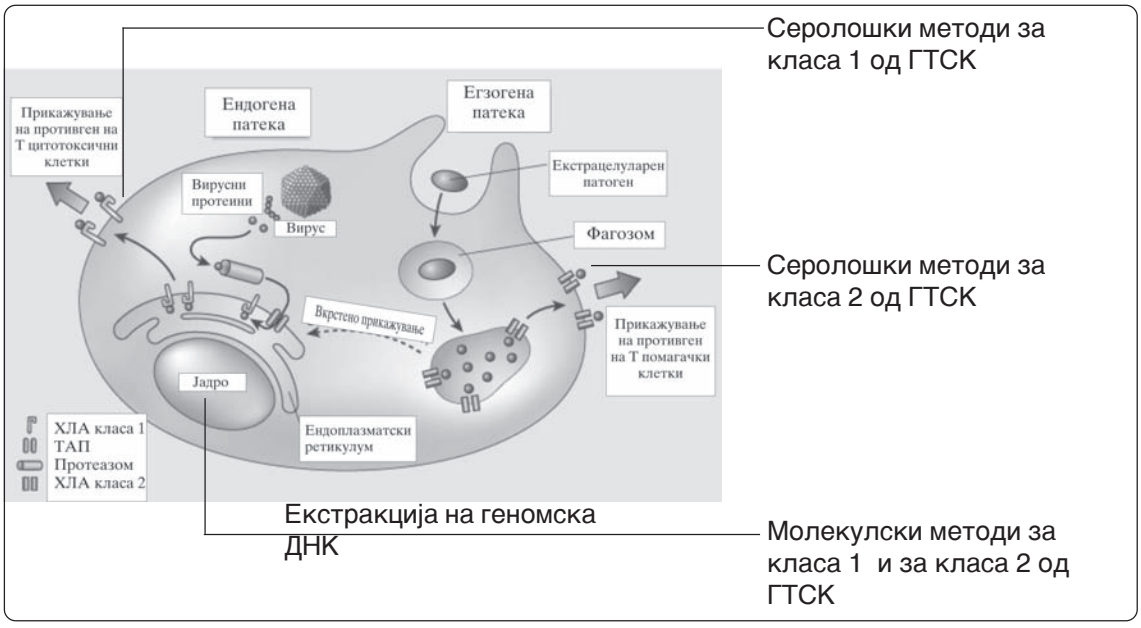
Слика 13.2: Бројот на ХЛА противгените и алелите 1968-2006.

13.1.2. Геномска структура и полиморфизам

ХЛА гените се лоцирани на хромозомот 6п21.31 (кусиот крак од 6 хромозом) и покрива подрачје од околу 3.6 Мбп (мегабазни парови) зависно од хаплотипот. Класичните ХЛА противгени се кодирани од ХЛА-А, -Б и -Ц од класата 1 и ХЛА-ДР, -ДКу и -ДП од класа 2 подрачјето. Сите класа 1 гени се со големина помеѓу 3 и 6 кб, додека класа 2 гените се долги од 4-11 кб. Една од главните особини на ХЛА е екстремно големиот полиморфизам (различие). Во прикажаните подрачја ХЛА има најголем степен на полиморфизам во човековиот геном. Бројот на познатите алели постојано се зголемува (Слика 13.2).

13.1.3. Методи за типизирање на ХЛА

Противгените се обработуваат во две патеки. Во ***внатрешната патека*** вирусните честички или малигно трансформираните клетки создаваат внатреклеточни антигени кои



Слика 13.3: Двете патеки за обработка на противгените како основа за серолошките методи и геномската ДНК како основа за молекулските методи.

се обработуваат во протеазомите и заедно со класа 1 од ГТСК се прикажуваат врз површината на клетката. Во ***надворешната патека*** голтнатите (фагоцитирани) предизвикувачи (бактерии и друго) се обработуваат и се прикажуваат врз површината на имуните клетки заедно со класа 2 од ГТСК. Поради тоа, со ***серолошки методи*** можеме да ги испитаме молекулите на ГТСК прикажани врз површината на клетката (Слика 13.3).

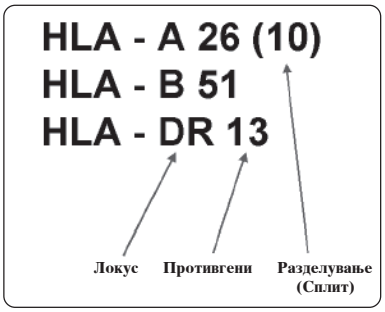
Во јадрото на клетките се наоѓаат гените за главниот ткивно совпадлив комплекс и со изолација на ***геномската ДНК*** и полимеразно верижна реакција може да се анализираат молекулите на ГТСК од класа 1 и од класа 2 со ***молекулски методи*** (Слика 13.3).

Доколку постои ген во ДНК за определен алел, но тој не се прикажува врз површината на клетките, тогаш зборуваме за ***нула алел*** (неискажан алел). Секако дека организмот не може имунолошки да реагира на нула алелите.

13.1.4. Серолошки методи

Серолошки базираните методи за ХЛА користат противген специфични серуми за да се определи ХЛА типот кај испитаниците. Серумите се човечки продукти кои реагираат специфично со ХЛА противгените прикажани на површината од белите крвни клетки. Серолошката метода определува кој ткивен тип од ХЛА во белите клетки од испитаникот со кој серум реагира, а со кој серум не реагира. После инкубацијата со која се овозможува време противтелото да се врзе со соодветните противгени во клетките, се додава комплемент за да се поттикне клеточното

распаѓање. Потоа реакцијата се гледа под микроскоп и се степенува зависно од бројот на умрените клетки. Типизирањето се означува после анализа на реакциските облици за различни серуми. Серолошката типизација е помалку специфична отколку методите за молекуларно типизирање.



Слика 13.4: Серолошка номенклатура за ХЛА.

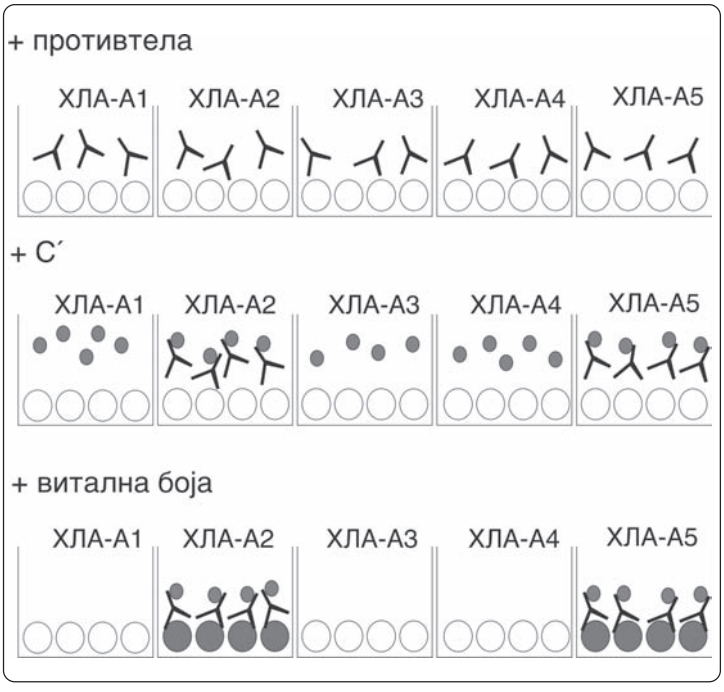
13.1.5. Номенклатура

Официјална номенклатура која се користи за серолошка дефиниција на противгените од ХЛА е таа на Светската здравствена организација (СЗО). Буквите (А, Б и слично) означуваат генетски локус, а бројот соодветниот противген што го кодира тој локус. Бројките во загради означуваат широко присутни противгени од кои се разделуваат специфичности (Слика 13.4).

13.2. Серолошки методи за типизирање на ХЛА

За серолошка типизација на ХЛА се користи тестот на микролимфоцитотоксичност кој ги користи лимфоцитите од испитаникот како целни клетки. Постојат повеќе призводители на комплети за серолошко испитување на ХЛА. Подолу ќе биде опишан еден од нив. Во текот на вежбите можно е да бидат употребени и поинакви комплети, но тие значајно не се разликуваат помеѓу себе.

Живи клетки лесно се издвојуваат од периферна крв, лимфни



Слика 13.5: Шематски приказ на серолошките методи за определување ХЛА.

јазли, слезина и друго. Во овие серолошки методи се бројат мртвите клетки со активација на комплементот (зајачки) во комбинација со присутните специфични противген-противтело комплекси. Реакцијата противтело-противген-комплемент се мери со набљудување на тестот под микроскоп со зголемување од 150 пати со фазен контраст и со витални бои како што се *Еозин итислон* или *Пропидиум јодид*. Мртвите клетки (врз кои се наоѓа противген откриен од специфичниот противсерум) ќе ја адсорбираат бојата и покажуваат соодветна промена на бојата. Негативните клетки (тие што немаат противген откриен од специфичниот противсерум) остануваат живи и ја исфрлаат бојата (остануваат необоени) (Слика 13.5).

13.2.1. Неопходни услови

- Лимфоцитна суспензија се приготвува од 10 мЛ полна крва земена со хепарин, АЦД или натриум цитрат. Концентрацијата се подесува до 2-3 x 10^6 клетки/мЛ. Лимфоцитната суспензија мора да се подготви најдоцна 48 часа од земањето крв за да се обезбедат оптимално живи клетки. Суспензијата се чува на собна температура до употреба.
- Нужно е живите клетки да бидат над 80% без значајно загадување со не-лимфоцитни клетки.
- Загадување со гранулоцити или висок број на не-лимфоцитни клетки може да даде лажно позитивни резултати.
- Загадување со тромбоцити може да доведе до нецелосно лизирање на лимфоцитите и да даде лажно негативни резултати.

13.2.2. Приготвување лимфоцитна суспензија

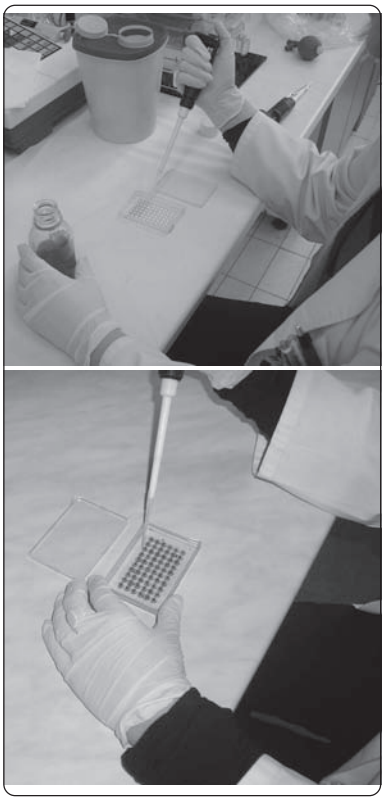
- Се земаат 10 мЛ полна крв во вакутајнер со хепарин, АЦД или натриум цитрат (најдено е дека ЕДТА не е добар противсосирувач). Се чува примерокот до употреба на собна температура.
- Крвта се центрифугира 10 мин на 700-900 г за да се добие плазма. Оваа постапка може да се забрза со агрегирачка супстанца како што е 5% Декстран (се мешаат 2 мЛ 5% Декстран со 10 мЛ полна крв и се остават црвените клетки да се исталожат на 37^0Ц за 15 мин).
- Со Пастерова пипета внимателно се вади плазмата (околу 2 мЛ) и се пренесува во чиста епруветка 17 x 100 мм која содржи 5 мЛ ХБСС раствор. Се меша епруветката.
- Се внесуваат 4 мЛ Фикол-Хипак раствор (22^0Ц) во

чиста епруветка 17 x 100 мм. Врз растворот од Фикол-Хипак внимателно се нанесува издвоената плазма.

- Епруветката се центрифугира 20 мин на 700 x г. После центрифугирањето еднојадрените клетки се наоѓаат како тесен слој помеѓу плазмата и растворот на Фикол-Хипак.
- Се аспирираат сите еднојадрени клетки од слојот и се пренесуваат во епруветки 17 x 100 мм. Се разредува со 4 мЛ ХБСС.
- Се отстранува супернатантот и клетките се ресуспендираат во 1 мЛ РПМИ-1640 со 20% ФТС (фетален телешки серум).
- Се бројат клетките од суспензијата во хемоцитометар. Се оценува чистотата, се бројат клетките и се подесува нивниот број до 2-3 x 10^6 клетки/мЛ.
- Се изведува *тестот на вијабилност* (живи и мртви клетки). Се додава една капка Трипан сино и една капка клеточна суспензија во чиста епруветка и се меша. Епруветката се инкубира на собна температура 15 мин. Се испитуваат живите клетки во хемоцитометар. Живите клетки имаат неоштетени мембрани и изгледаат мазно, додека мртвите клетки имаат нерамна мембрана. Лимфоцитната суспензија е готова за употеба за серолошкиот микролимфоцитотоксичен тест за класа 1 со употреба на исфрање на боја. Процентот на живи клетки треба да е најмалку 80%.

13.2.3. Микролимфоцитотоксичен тест

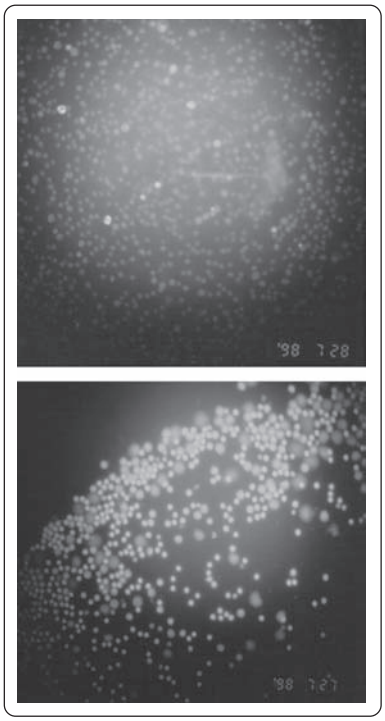
- Се приготвува лимфоцитна суспензија со најмалку 80% живи клетки без значително загадување со нелимфоцитни клетки.
- Се вади плочката за ХЛА серолошка типизација од замрзнувач и се остава да се затопли на собна температура.
- Со 50 мкЛ микропипета се додаваат 1 мкЛ од лимфоцитната суспензија (околу 3.000 лимфоцити) на врвот од секое ведренце внимавајќи да не се допре специфичниот противсерум. Внимавај да се смешаат лимфоцитите и противсрумот (Слика 13.6).
- Инкубирај ги плочките на собна температура за:
  - класа 1 (исфрлање на боја) 30 мин
  - класа 1 (флуоресценција) 30 мин
  - класа 2 (флуоресценција) 45 мин
- Со користење на 250 мкЛ пипета се додаваат по 5 мкЛ од зајачки комплемент без да се допре специфичниот противсерум.
- Плочите се инкубираат на собна температура за:
  - класа 1 (исфрлање на боја) 60 мин



Слика 13.6: Нанесување лимфоцити, комплемент и боја во плочка за серолошко типизирање на ХЛА.

- класа 1 (флуоресценција) 50 мин
- класа 2 (флуоресценција) 60 мин

- Со 100 мкЛ пипета се додаваат по 2 мкЛ филтриран 5% воден раствор од *Еозин Ипсилон* кон секое бунарче и се инкубира на собна температура 3-5 минути. Се внимава да не се допре специфичниот противсерум со пипеторот. Оваа стапка се скокнува ако се користат флуоресцентни бои.
- Со употреба на 250 мкЛ пипета се додаваат по 5 мкЛ филтриран неутрализиран формалин кон секое ведренце, внимавајќи да не се допре специфичниот противсерум. Оваа стапка се скокнува ако се користат флуоресцентни бои. Во флуоресцентните техники се додаваат по 5 мкЛ од пропидиум јодид во секое бунарче, внимавајќи да не се допре специфичниот противсерум.
- Се става капак врз плочката и се оставаат плочките на собна температура 15 мин за да се сталожат лимфоцитите. Плочките обоени со Еозин Ипсилон се читаат после еден час или следниот ден. Плочките обоени со флуоресцеински бои можат да се отчитуваат после 30 мин или следниот ден (отчитувањето на плочките обоени со флуоресцентни бои после 36 часа можат да дадат зголемени лажно позитивни резултати).
- Тестот се отчитува микроскопски на 150 х зголемување под фазен контраст.



Слика 13.7: Имунофлуоресцентно боење на лимфоцити. Горе негативен микролимфоцитотоксичен тест, долу позитивен лимфоцитотоксичен тест (мртви лимфоцити).

13.2.4. Резултати

Мртвите клетки (тие кои содржат противген) ја абсорбираат бојата, изгледаат поголеми и потемни и имаат различен облик на јадрото. Живите клетки (тие кои немаат противген), ја исфрлаат бојата, изгледаат посветли и помали во големина во споредба со мртвите клетки.

Доколку се користат флуоресцентни бои, живите клетки се зелени, а мртвите клетки се црвени (Слика 13.7).

После корекција за процентот на мртвите клетки во негативните контролни бунарчиња, тестот се степенува на следниов начин:

% Мртви клетки	Степен	Толкување
0-10	1	Негативно
11-20	2	Сомнително негативно
21-50	4	Слабо позитивно
51-80	6	Позитивно
81-100	8	Силно позитивно
-	0	Нечитливо

13.3. Задача

Определи ја серолошката типизација на ХЛА од плочки и резултатите внеси го во Табела 13.1 и Табела 13.2.

Табела 13.1: Формулар-1 за внесување резултати од серолошка типизација на ХЛА.

Име и презиме _____ Пол _____
Примерок ИД _____ Етничка припадност _____

ХЛА-АБЦ (Плочка 1)

Бунарче број	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2F	2E	2D	2C	2B	2A	3A	3B	3C	3D	3E	3
Резултат																		
Специфичност		A1	A1	A1 (36)	A1 36 (80)	A2	A2 28	A2 69	A3	A3	A23	A23	A23 24 80	A24	A24	A25	A25	A25 26 34 6
Серум ИД	Нег. кон.	PFR 1654	PFR 1800	PFR 1656	PFR 1655	PFR 1722	PFR 1725	PFR 1730	PF 1388 P	PFR 1736	PF 378 RF	PFR 1650	PF M013 C	PFR 1649	PFR 1627	PF 145 RN	PFR 1612	PFR 158
Бунарче број	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5A	5B	5C	5D	5E	5F	6F	6E	6D	6C	6B	6A
Резултат																		
Специфичност	A26	A26 25 66 (34)	A34	A34 (66)	A34 66	A11	A11	A29	A29	A30 31	A30 B18 (A31)	A31 (30)	A31 (30)	A32	A33	A74 25 31 32 33 (26) (29) (34)	A74 25 32 (31) (33)	A74 31 32 33 (29) (30)
Серум ИД	PF 964 D	PFR 1596	PF 1705	PF 684 AD	PF 1706	PF 1732	PFR 1605	PF 1636	PF 1533	PF 1699	PF 1317 P	PF 1787	PF 1534	PF 1774 A	PF 1845	PF 1185 D	PFR 1588	PFR 1595
Бунарче број	7A	7B	7C	7D	7E	7F	8F	8E	8D	8C	8B	8A	9A	9B	9C	9D	9E	9
Резултат																		
Специфичност	A28	A28 (34) (66)	A36	B51	B51 52	B51 78	B52 (49) (51)	B52 (49) (50) (63)	B7	B7 13 41 60 61 73 81 (48)	B7 27 73 81	B7 42 81	B8	B8	B44	B44	B44 45	B44 45 76
Серум ИД	PF 1666 A	PF 1477 A	PF 1708	PF 1702	PFR 1738	PFR 1747	PF 1714	PF 1669	PF 1450 A	PFR 1614	PFR 1801	PFR 1840	PF 1813	PFR 1554	PF 1322	PF 1571	PF 219 X	PF 768 AA
Бунарче број	10F	10E	10D	10C	10B	10A	11A	11B	11C	11D	11E	11F	12F	12E	12D	12C	12B	12
Резултат																		
Специфичност	B45	B45 76	B13	B13	B14	B14	B62	B62	B62 75 (57) (63)	B62 75 77 (63) (76)	(B63) 49 51 52	B63 51 52 53 77 (49) (75)	B38	B38 39	B38 39	B39	B39 64 67	
Серум ИД	PF 1483	PF 458 AC	PF 1458 P	PFR 1615	PFR 1659	PF 1387 B	PF 1667	PF 1717	PF 1303 B	PFR 1623	PFR 1664	PF 1017	PF 1677	PF 1695	PF 1330 A	PF 1536	PF 1687 A	Поз. кон.

Институт за имунобиологија и хумана генетика

Изработено од: _____ Датум: _____ ХЛА-А _____
Читано од: _____ Датум: _____ ХЛА-Б _____
Контролирано од: _____ Датум: _____ ХЛА-Ц _____

Табела 13.2: Формулар-2 за внесување резултати од серолошка типизација на ХЛА.

Име и презиме _____ Пол _____
Примерок ИД _____ Етничка припадност _____

ХЛА-АБЦ (Плочка 2)

Бунарче број	1A	1B	1C	1D	1E	1F	2F	2E	2D	2C	2B	2A	3A	3B	3C	3D	3E	3
Резултат																		
Специфичност		B57	B57 58	B58 57	B58 57 (46)	B18	B18 (14)	B49	B49 50	B49 51 52 63	B50 (56) (62) (72)	B55 56 (Cw7)	B54 55 57 (56) (58) (63)	B55	B55 (67)	B56	B56 (55)	B27
Серум ИД	Нег. кон.	PF 716 N	PF M012	PFR 1593	PFR 1753	PFR 1598	PF 1465 P	PFR 1625 A0	PF 1696	PFR 1664	PF 1352 C	PF 357 Y	PF 1527	PF 1718	PF 1715	PF 1844	PF 1470 A	PFR 1820
Бунарче број	4F	4E	4D	4C	4B	4A	5A	5B	5C	5D	5E	5F	6F	6E	6D	6C	6B	6A
Резултат																		
Специфичност	B27	B27 47	B35 50 75 (71) (78)	B35 50 75 (78)	B35 51 52 53 78	B35 51 53 78	B35 53 (62)	B35 53 (75)	B37	B37	B60	B60	B61 60 13 47	B61 60 48 81	B41	B41	B42	B42 7 27 81
Серум ИД	PF 1709	PF 1682	PF 1011 H	PF 932 E	PF 1355 C	PF 1320 C	PFR 160	PF 1402P	PF 917 C	PF 1814	PF 1771	PF 004 RNC	PF 1464 P	PFR 1601	PF 1567	PF 1710	PF 1775	PFR 1804
Бунарче број	7A	7B	7C	7D	7E	7F	8F	8E	8D	8C	8B	8A	9A	9B	9C	9D	9E	9
Резултат																		
Специфичност	B42 7 81 (73)	B46 54 56 59 (62)	B47 18 37 48 52	(B47) 60 61 (13)	B48 60 (61)	B48 60 (81)	B53 35 (78)	B53 35 (51)	B59 8	B59 8 14 (39) (73)	B70 45 50 62 75 (35) (56) (76) (78)	B71 46 59 60 (8) (55) (56) (61) (62)	B73	B73	B75 77 (62)	Cw1	Cw1	Cw2
Серум ИД	PFR 1825	PFR 1586	PF 952 D	PFR 1822	PFR 1799	PF M018 B	PF 1490	PF 1551	PF 436 BD	PFR 1610	PF 1719	PF 1688 A	PF 1678	PF 157 BB	PF 1741	PF 1834	PFR 1831	PFR 1648
Бунарче број	10F	10E	10D	10C	10B	10A	11A	11B	11C	11D	11E	11F	12F	12E	12D	12C	12B	12
Резултат																		
Специфичност	Cw2	Cw3	Cw3 B46	Cw4	Cw4 (Cw17)	Cw5	Cw5	Cw6	Cw6	Cw7 A2 (28)	Cw7 (28)	Cw8	Cw9	Bw4	Bw4 (A23) (A24)	Bw6	Bw6	
Серум ИД	PF 318 AA	PFR 1590	PF 380 P	PFR 1591	PF 1777	PF 1537	PF 1575	PF 1693	PF 1791	PF 1837	PF 1532	PF 1443 B	PF 1812	PF 1772 B	PF 1769	PF 1566	PF 1574	Поз. кон.

Институт за имунобиологија и хумана генетика

Изработено од: _____ Датум: _____ ХЛА-А _____
Читано од: _____ Датум: _____ ХЛА-Б _____
Контролирано од: _____ Датум: _____ ХЛА-Ц _____

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

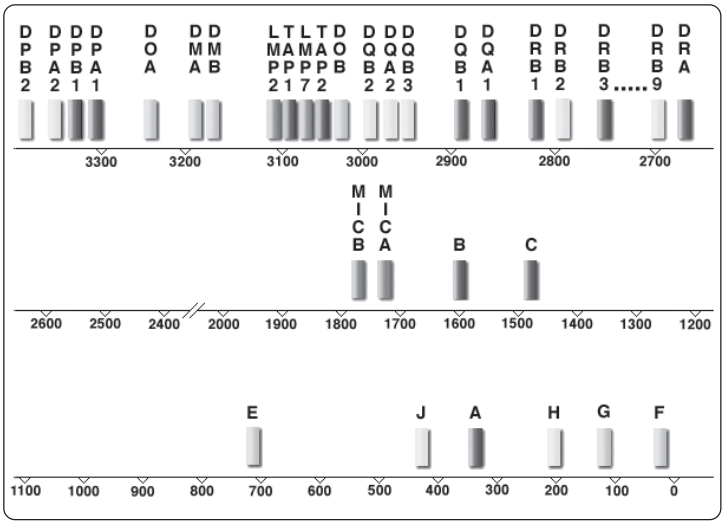
_____ _____ _____

ВЕЖБА 14: ГЕНСКА СТРУКТУРА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС

14.1. Генска структура на ГТСК и негови полиморфизми

Класа 1 молекулите се наоѓаат на скоро секоја клетка во човековото тело и тие им ги прикажуваат противгените на цитотоксичните Т лимфоцити (Тцт-Ли) (КД8+ Т-Ли). Класа 1 молекулите ги прикажуваат внатрешните (ендогени) противгени. Внатрешен противген може да биде дел од вирусен протеин или туморски протеини. Прикажувањето вакви противгени укажува на внатрешни клеточни оштетувања, кои ако не се спречат ќе се рашират низ човековото тело. Поради тоа, уништувањето на ваквите клетки е предност за телото како целина.

Класа 2 молекулите му го прикажуваат противгенот на помагачкиот Т-Ли (Тпо-Ли). Класа 2 молекулите прикажуваат надворешни противгени. Надворешните противгени можат да бидат делови од бактериски клетки или вируси кои



Слика 14.1: Карта на ХЛА подрачјето.

се голтнати и обработени и потоа прикажани на помагачките Т-Ли. За возврат Тпо-Ли можат да ги активираат Б-Ли за да создаваат противтела кои ќе овозможат уништување на патогенот.

Да се потсетиме дека ХЛА е лоциран на хромозомот 6п21.31 и покрива подрачје од околу 3.6 Мбп (мегабазни парови) зависно од хаплотипот. Класичните ХЛА противгени го кодираат секое подрачје од ХЛА-А, -Б и -Ц од класата 1 и ХЛА-ДР, -ДКу и -ДП од класа 2 подрачјето. Сите класа 1 гени се помеѓу 3 и 6 кб, додека класа 2 гените се долги од 4-11 кб (Слика 14.1). Една од главните особини на ХЛА е екстремно големиот полиморфизам (различие). Во прикажаните подрачја ХЛА има најголем степен полиморфизам во човековиот геном. Бројот на познатите алели постојано се зголемува (Слика 13.2).

14.2. Молекулски методи за ХЛА типизација

Со напредокот на молекулските техники и откривањето на полимеразно верижната реакција (ПВР), започнато е ХЛА типизирање на ниво на ДНК молекулата, со што значително се зголемува бројот на новооткриените алели.

За молекулските методи не се неопходни живи лимфоцити, било кој извор на клетки може да послужи како извор за изолација на ДНК. Поради стандардизација на пробите и прајмерите, молекуларното типизирање е поточно од серолошкото типизирање. Тоа исто така дава повеќе информации и детали на повисоко ниво поради што е можно да се идентифицираат сите алели како и противгени. Алелите определуваат кои противгени се присутни врз површината на клетките.

Заради унапредување на методите за ХЛА типизација, постојано се одржуваат меѓународни ХЛА работилници на кои се усоглсасуваат и стандардизираат методите за ХЛА типизација.

14.3. Принципи на молекуларните методи за ХЛА типизација

14.3.1. ССОП (Sequence Specific Oligonucleotide Probing)

ССОП е хибридизациска техника, каде после амплификацијата на регионот од интерес со ПВР следи хибридизација на целната секвенца со пробната секвенца.

Принципот на овој приод значи дека различни алели во локусот може да се детектираат со проби кои ги препознаваат разликите во алелите и се користат за да го детектираат комплементарниот регион на амплифицираната целна секвенца. За да се изведе тоа, потребно е една од ДНК нишките да биде имобилизирана во реакцијата. Денес постојат техники за имобилизација и на целните и на секвенците од пробите.

Доколку е имобилизиран ампплифицираниот продукт, тогаш пробата се обележува и аплицира. Тоа е традиционална дот блот техника, именувана така затоа што целната секвенца е нанесена како точки на филтер или мембрана. Материјалот може да биде нанесен и како линија, тогаш процесот е означен како слот блот. Доколку пробата е имобилизирана, а амплифицираниот продукт е обележен, методата се означува како реверзна дот блот или блот дот.

Овие методи се погодни, бидејќи голем број на примероци може да се нанесат во единечна дот-блот реакција, а примерокот може да се тестира за многу проби во единечна блот-дот реакција.

14.3.2. РЛС (Reverse Line Strip) – реверзна хибридизација

Во методата на реверзна хибридизација се користат нитроцелулозни ленти на кои комерцијално се нанесени олигонуклеотидни проби од едноверижна ДНК (Слика 14.2). Двоверижната ДНК од добиениот амплифициран продукт се денатурира со NaOH и се аплицира во кадичка каде се наоѓаат нитро-целулозните ленти за да се овозможи хибридизација со олигонуклеотидите проби, под посебни хибридизациони услови. Присуството на биотинилизиран ПВР продукт врзан за специфичната проба се детектира со користење на streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) и хромоген субстрат, со добивање на сини линии на местото на



Слика 14.2: Определување ХЛА на Институтот за имунобиологија и хумана генетика со автоматизиран систем за реверзна хибридизација со апаратот Bee Robotics.

позитивната проба.

Позитивни особини на РЛС:

Методот на РЛС вклучува егзон специфична амплификација, а алелската дискриминација се врши во тек на фазата на хибридизација.

+Одеднаш може да се типизираат повеќе примероци
+Лесно за автоматизација
+Потребно е мало количество на ДНК

Негативни особини на РЛС:

- Временски долготрајно - минимум 4 - 5 часа
- Висока стапка на амбигвитети во споредба со ССП

14.3.3. ССП (Sequence Specific Priming)

ССП е техника базирана на ПВР, дизајнирана за висока резолуција на поттипови за ХЛА класа 1 и 2. Се користат алелски или групно специфични прајмери за амплификација на геномската ДНК во термална плочка со 96 алвеоли во термосајклер. По завршениот ПВР циклус, ПВР продуктот се детектира на 2% агарозен гел со електрофореза.

Позитивни особини на ССП:

+Алелска дискриминација во фазата на амплификација
+Помалку амбигвитети во споредба со РЛС
+Висока специфичност
+Брзина - не се потребни специфични пост амплификациски процедури (времетраење - 2.5 часа од изолација на ДНК)

Негативни особености на ССП:

- Тешко може да се автоматизира
- Неизбежни се многу ПВР-ии
- Склоност кон контаминација
- Тешко е да се типизираат многу примероци

14.3.4. СБТ (Sequence Based Typing)

Најчесто користен метод за ДНК секвенционирање е дидеокси методот (од Фред Сангер во 1970 год.) кој вклучува екстензија на краток прајмер со ДНК полимераза. Двоверижната ДНК се денатурира во едноверижна со топлина. Потоа, краток олигонуклетиден прајмер се анилира за една од едно-верижните ДНК нишки. За секое секвенционирање се користат четири одделни реакции. Секоја реакција содржи едноверижна ДНК која треба да се секвенционира, прајмер што треба да се анилира за таа ДНК, ДНК полимераза, 4 нормални деоксинуклетодни прекурзори (дАТП, дЦТП, дТТП, и дГТП) и мала количина на модифицирани прекурзори, дидеоксинуклеотиди (ддНТП). Кај дидеоксинуклеотидите недостасува 3`-ОН групата која е неопходна за елонгација на ДНК. Кога

прајмерот ќе се екстендира, ДНК полимеразата на некое место ќе вклучи дидеоксинуклеотид наместо нормалниот деоксинуклеотид, што ќе ја прекине поли-меризацијата. ДНК веригите во секоја реакција се детектираат на полиакриламидна гел електрофореза.

14.4. Нивоа на ХЛА типизација

Нивото на разделување на молекуларните методи зависи од специфичноста на пробите кои се употребуваат за типизација. Некои проби можат да разликуваат противген со ниско ниво на разделување, додека други проби овозможуваат разликување на алелите со високо разделно ниво (Слика 14.3). Постапките со нискоразделно олиготипизирање SSP (Sequence Specific Primer) или SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probe) овозможуваат ниско до средно разделно ниво на типизирање.За високо разделно ниво на типизирање денес се користи методата на секвенционирање, СБТ (Sequence Based Typing) или високоразделно ССП типизирање.



Слика 14.3: Шематски приказ на серолошки и молекулски методи за ХЛА типизација.

14.5. Двојбеност (амбигвитет)

Некои проби кои се употребуваат во молекулското типизирање можат да откријат присуство на неколку различни алели од истиот ген и не определуваат прецизно кој специфичен алел е присутен. Во таков случај зборуваме за средно разделно ниво или двојбеност на резултатот. Или поинаку кажано, неможноста да се утврди единечен алел со четири децимални места, се наречува двојбеност или амбигвитет. На пример, ХЛА-А*02011/012/014/09/30/31 не го определува единечниот алел, туку дава различен (групен) резултат од *02011, или 02012, или 02014, или 0209, или 0230, или 0231.

Амбигвитетите можат да бидат:

1. Алелски - неможност за добивање на единечен (недвојбен) резултат на ниво на алели, алелите се типизираат како група на алели. Пример: ХЛА-А* 02011/ 012/014/09/30/31

2. Генотипски - неможност за раздвојување на одделните генотипови. Пример: ХЛА-А*0501/03 и А*07011/012/06 или ХЛА-А*0707/09 и А*0802/07.

14.6. Номенклатура

Означувањето ХЛА алели за секој локус се врши според следната номенклатура. Се употребуваат четири бројки за да се идентифицираат алелите:

ХЛА локусот (А, Б, Ц, ДР, ДП и ДКу) се одделуваат со симболот * од двете бројки, кои го означуваат серолошкиот еквивалент на противгенот. После тоа следат две бројки кои го означуваат специфичниот алел. Повремено се додаваат дополнителни бројки за да се определи различен подтип кој се добива со нуклеотидна супституција која не влијае врз амино-киселинската секвенца и прикажувањето противгени во протеинскиот продукт. Оттука, ХЛА-А*03012 е алел од А локусот кој кодира ХЛА-А3 серолошки противген и е 01 алелски подтип на А3. Тој алел во исто време има скриена нуклеотидна супституција која го разликува од А*03011 (Слика 14.4).

Не-кодирачките и интронските бројки се користат многу ретко. Нула (Null) и Ниско (Low) го дефинираат нивото на прикажување на алелите врз површината на клетките и исто така ретко се користи (Табела 14.1). Ниво на раздвоеност: Ниско А*02

Средно А*0201/0205/0209/0240

Високо А*0201



Слика 14.4: Номенклатура на молекулското типизирање на ХЛА.

Табела 14.1: Терминологија за молекулското типизирање на ХЛА гените.

Номенклатура	Значење
HLA	ХЛА подрачје и префикс за ХЛА гени
HLA-DRB1	Определен ХЛА локус, во случајов ДРБ1
HLA-DRB1*13	Група алели кои го кодираат ДР13 противгенот
HLA-DRB1*1301	Специфичен ХЛА алел
HLA-DRB1*1301N	Нула алел
HLA-DRB1*130102	Алел кој се разликува во синонимска мутација
HLA-DRB1*13010102	Алел кој содржи мутација надвор од кодирачкото подрачје
HLA-DRB1*13010102N	Нула алел кој содржи мутација надвор од кодирачкото подрачје
HLA-DRB1*13X	Не е направена висока разделност
HLA-DRB1*13?	Направена е висока разделност, но без дискриминација

Двојбеноста настанува поради вкрстени реакции на пробите кои се користат за типизирање и се означуваат со два симболи -(цртичка) или / (коса црта).

- -(цртичка) значи сите можности помеѓу првиот и последниот наведен број;
- / (коса црта) значи само споменатите можности.

Како пример е даден следниов генотип:

ДРБ1*0401-04 ДРБ1*0401 или 0402 или 0403 или 0404
ДРБ1*0401/04 ДРБ1*0401 или ДРБ1*0404

Генотипот ХЛА-Б*1501/02/05/15/21/45/56/70 значи дека пробата не може да открие присуство на алелите 03, 04, 06 и слично, затоа ние не знаеме дали пациентот нема или има алели 03 или 04 и не знаеме кој од наведените алели ги има. Кога означуваме двојбен резултат како што е во примерот за ХЛА-Б*1501/02/05/15/21/45/56/70 многу е важно да не се скратува резултатот затоа што може да се изгуби значајна информација која може да даде прецизен резултат. Смалување на резултатот во горниот пример само на ХЛА-Б*1501 е погрешен, затоа што всушност пациентот би можел да има резултат ХЛА-Б*1502 или некој трет.

Во означувањето на резултатите во лабораторијата можно е да се даде и друга номенклатура. Тоа е алфанумерички код воспоставен од National Marrow Donor Program (NMDP). Кога се добива комплексна номенклатура, како во горниот случај со ХЛА-Б*1501/02/05/15/21/45/56/70 различните можни алели можат да се кодираат со неколку букви според номенклатурата од NMDP:

Б*1501/02	=B*15AB
ХЛА-Б*1501/02/05/15/21/45/56/70	=B*15FGR

14.7. Изведување на вежбата

14.7.1. RLS (Reverse Line Strip)

Протокол за реверзна хибридизација (РЛС) на 13-та Интернационална работилница за хистокомпатибилност:

1. ***Изолација на геномска ДНК*** со стандарден протокол на фенол-хлороформна екстракција.

2. ***ПВР амплификација на егзон 2 и 3*** од гените на ХЛА - А, - Б, и - Ц со биотинилирани прајмери (Слика 14.5).

Протокол за ПВР на егзон 2 и 3 на ХЛА-А, Б и Ц гените

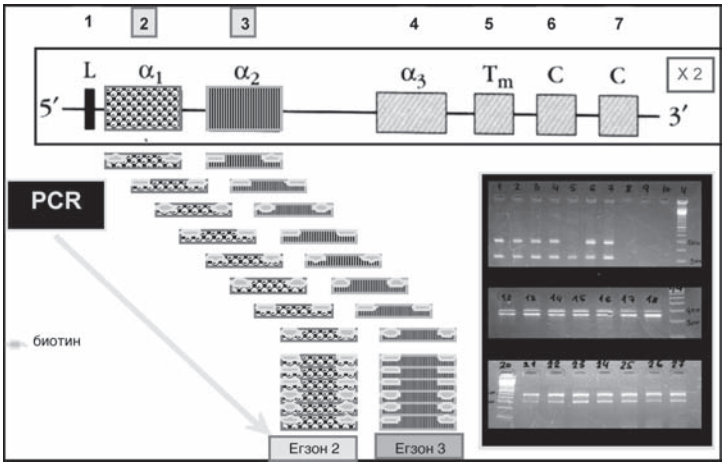
За ХЛА-А, -Б и Ц локус:

1. Мастер микс за ХЛА-А, Б и Ц (кој ги содржи прајмерите)	30 мкЛ
2. $MgCl_2$	15 мкЛ
3. H_2O	10 мкЛ
4. ДНК	5 мкЛ
Вкупен волумен	60 мкЛ

Термален циклус на амплификација:

1. 95°Ц	5 мин
2. 95°Ц	1мин
3. 62°Ц	1мин
4. 72°Ц	1мин
5. 4°Ц	до употреба

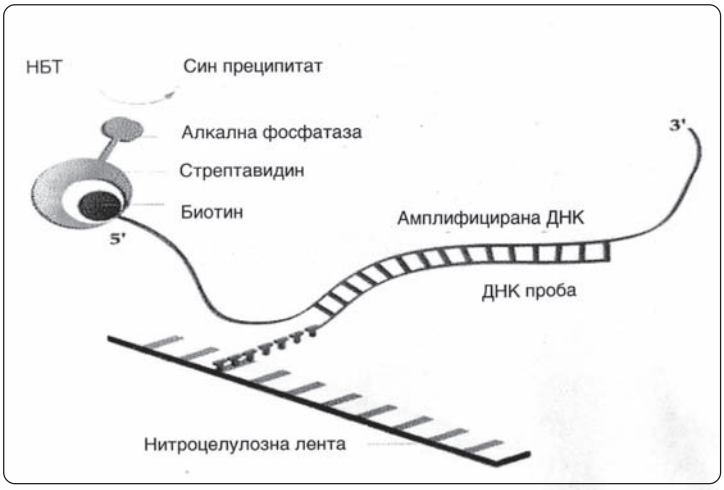
Успешноста на ПВР се проверува со електрофореза на 2% агарозен гел, обоен со етидиум бромид.



Слика 14.5: ПВР амплификација на егзон 2 и 3 од ХЛА класа 1.

3. ***Реверзна хибридизација*** – Reverse Line Strip – Roche Molecular Systems,USA (Слика 14.6).

По амплифицирање на егзон 2 и 3 од ХЛА-А, Б и Ц гените и проверка на успешноста на амплификацијата, следи реверзна хибридизација на добиениот продукт. Во методата на реверзна хибридизација се користат нитроцелулозни ленти на кои комерцијално се нанесени олигонуклетодини проби од едноверижна ДНК. Двоверижната ДНК од добиениот амплифициран продукт се денатурира со NaOH и се аплицира во кадичка каде се наоѓаат нитроцелулозните ленти за да се овозможи хибридизација со олигонуклеотидните проби, под посебни хибридизациони услови.



Слика 14.6: Прикачување едноверижна ДНК на нитроцелулозни ленти.

Успешноста на хибридизацијата се потврдува со присуството на сино обоени линии на местото на позитивната проба.

4. ***Софтверска анализа*** - Reverse Line Strip Pattern Interpretation Software.

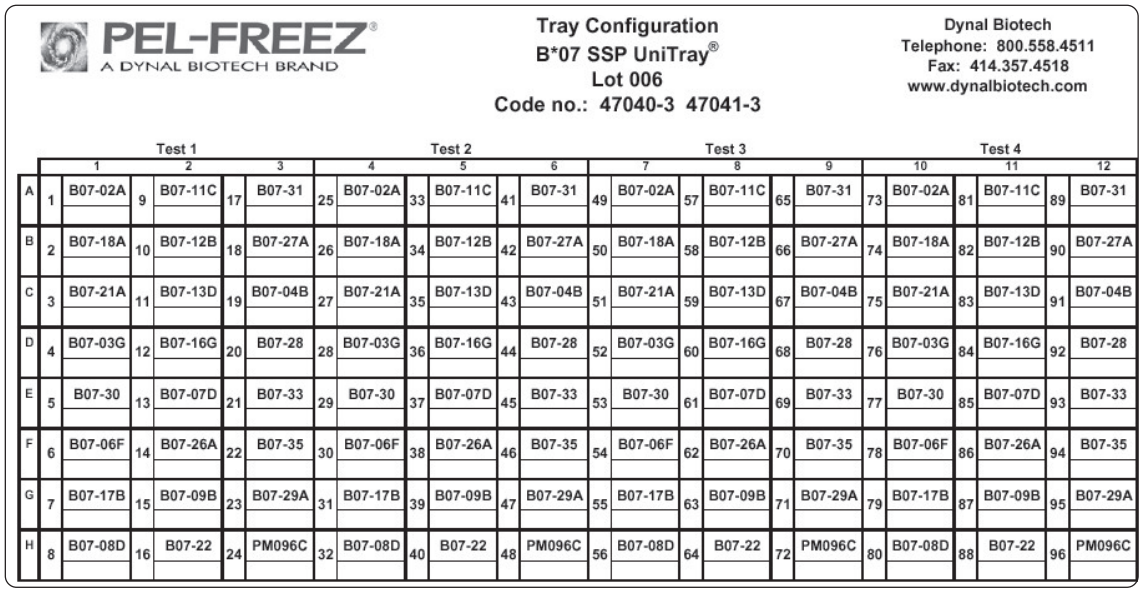
Резултатите од нитроцелулозните ленти се интерпретираат со посебен компјутерски програм, кој сино обоените позитивни ленти ги идентификува како алели.

14.7.2. ССП (SSP-Sequence Specific Priming)

Протокол за ССП од 13-та Интернационална работилница за хистокомпатибилност:

1) ***Изолација на геномска ДНК*** со стандарден протокол на фенол-хлороформна екстракција.

2) ***ПВР амплификација на геномска ДНК*** со сетови на алелски специфични прајмери во термална плочка со 96 алвеоли – High Resolution SSP UniTray, PEL-FREEZ. Во секое ведренце се наоѓа специфичен започнувач за амплификација на одредена секвенца, распореден по определен редослед,



PEL-FREEZ
A DYNAL BIOTECH BRAND

Tray Configuration
B*07 SSP UniTray®
Lot 006
Code no.: 47040-3 47041-3

Dynal Biotech
Telephone: 800.558.4511
Fax: 414.357.4518
www.dynalbiotech.com

	Test 1						Test 2						Test 3						Test 4					
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
A	1	B07-02A	9	B07-11C	17	B07-31	25	B07-02A	33	B07-11C	41	B07-31	49	B07-02A	57	B07-11C	65	B07-31	73	B07-02A	81	B07-11C	89	B07-31
B	2	B07-18A	10	B07-12B	18	B07-27A	26	B07-18A	34	B07-12B	42	B07-27A	50	B07-18A	58	B07-12B	66	B07-27A	74	B07-18A	82	B07-12B	90	B07-27A
C	3	B07-21A	11	B07-13D	19	B07-04B	27	B07-21A	35	B07-13D	43	B07-04B	51	B07-21A	59	B07-13D	67	B07-04B	75	B07-21A	83	B07-13D	91	B07-04B
D	4	B07-03G	12	B07-16G	20	B07-28	28	B07-03G	36	B07-16G	44	B07-28	52	B07-03G	60	B07-16G	68	B07-28	76	B07-03G	84	B07-16G	92	B07-28
E	5	B07-30	13	B07-07D	21	B07-33	29	B07-30	37	B07-07D	45	B07-33	53	B07-30	61	B07-07D	69	B07-33	77	B07-30	85	B07-07D	93	B07-33
F	6	B07-06F	14	B07-26A	22	B07-35	30	B07-06F	38	B07-26A	46	B07-35	54	B07-06F	62	B07-26A	70	B07-35	78	B07-06F	86	B07-26A	94	B07-35
G	7	B07-17B	15	B07-09B	23	B07-29A	31	B07-17B	39	B07-09B	47	B07-29A	55	B07-17B	63	B07-09B	71	B07-29A	79	B07-17B	87	B07-09B	95	B07-29A
H	8	B07-08D	16	B07-22	24	PM096C	32	B07-08D	40	B07-22	48	PM096C	56	B07-08D	64	B07-22	72	PM096C	80	B07-08D	88	B07-22	96	PM096C

Слика 14.7: Распоред на започнувачи во ведренцата од термалната плоча.

според производителот (Слика 14.7 и Табела 14.2).

Термален циклус на амплификација:

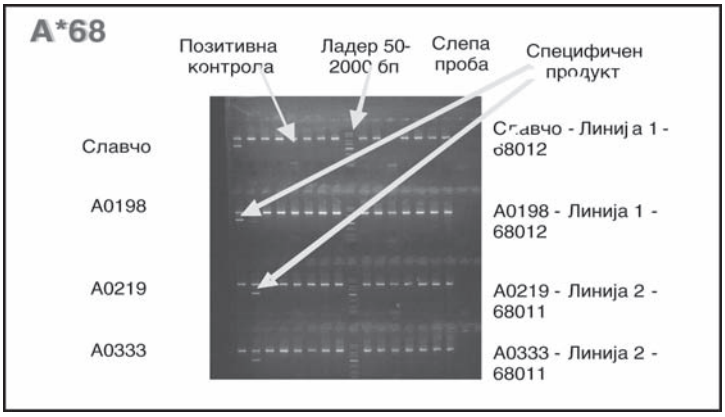
1. 96°Ц 5 мин.
2. 96 °Ц 1мин.
3. 70 °Ц 1мин. } 5 повторувања
4. 72 °Ц 1мин.
5. 96 °Ц 1мин.
6. 65 °Ц 1мин. } 21 повторување
7. 72 °Ц 1мин.
8. 96 °Ц 1мин.
9. 55 °Ц 1мин. } 4 повторувања
10. 72 °Ц 1мин.
11. 4 °Ц до употреба

3) ***Детекција на ПВР продуктот*** - електрофореза на 2% агарозен гел обоен со етидиум бромид.

При анализа на резултатите со методата на ССП, се анализираат фрагментите добиени на гел електрофореза. Во секоја алвеола на термалната плочка има *прајмери за внатрешна контрола*, кои амплифицираат фрагмент со соодветна големина, назначена од производителот. Присус-

Табела14.2: Подготовка на примерокот.

Број на реакции	ПВР пуфер (ì l)	Taq ДНК полимераза (ì l)	Вода (ì l)	Волумен на ДНК (ì l)	Конечен волумен на ДНК и вода (ì l)
2-8 алвеоли	75.0	1.2	30.0	14.0	44.0
9-12 алвеоли	85.0	1.4	34.0	15.0	49.0
13-16 алвеоли	120.0	1.9	48.0	20.0	68.0
17-24 алвеоли	150.0	2.4	60.0	25.0	85.0
25-32 алвеоли	200.0	3.2	80.0	34.0	114.0
33-40 алвеоли	250.0	4.0	100.0	42.0	142.0
41-44 алвеоли	275.0	4.4	110.0	46.0	156.0
45-48 алвеоли	300.0	4.8	120.0	50.0	170.0
96 алвеоли	580.0	9.3	268.0	80.0	348.0



Слика 14.8: ХЛА типизација со методот на ССП.

твото на тие фрагменти на гел електрофореза ја осигурува успешноста на ПВР реакцијата. Лентите за внатрешната контрола на гел електрофореза мора да бидат присутни во секоја алвеола, со исклучок на лентите каде има специфичен продукт, каде може но, не мора да ги има. *Специфичниот продукт*, односно позитивните ленти се фрагменти со соодветна големина на базни парови. Специфичниот прајмер за одделен алел се наоѓа во секоја алвеола. Доколку тој алел е присутен во примерокот за анализа, на гел електрофореза ќе се забележи специфичен продукт, а доколку во примерокот го нема тој алел нема да има специфичен продукт. Големината на фрагментите за секој специфичен продукт е назначена во упатството од производителот.

При секоја гел елекрофореза во лентата број 9 се става *маркер* со големина од 50-200 базни пара, за да се споредат големините на добиенит фрагментите со оние од маркерот (Слика 14.8).

4) ***Софтверска анализа*** – UniMatch Plus, Version 3.0, PEL-FREEZ.

Со внесување на бројот на лентите од специфичен продукт во софтверот за анализа, се добива соодветниот резултат.

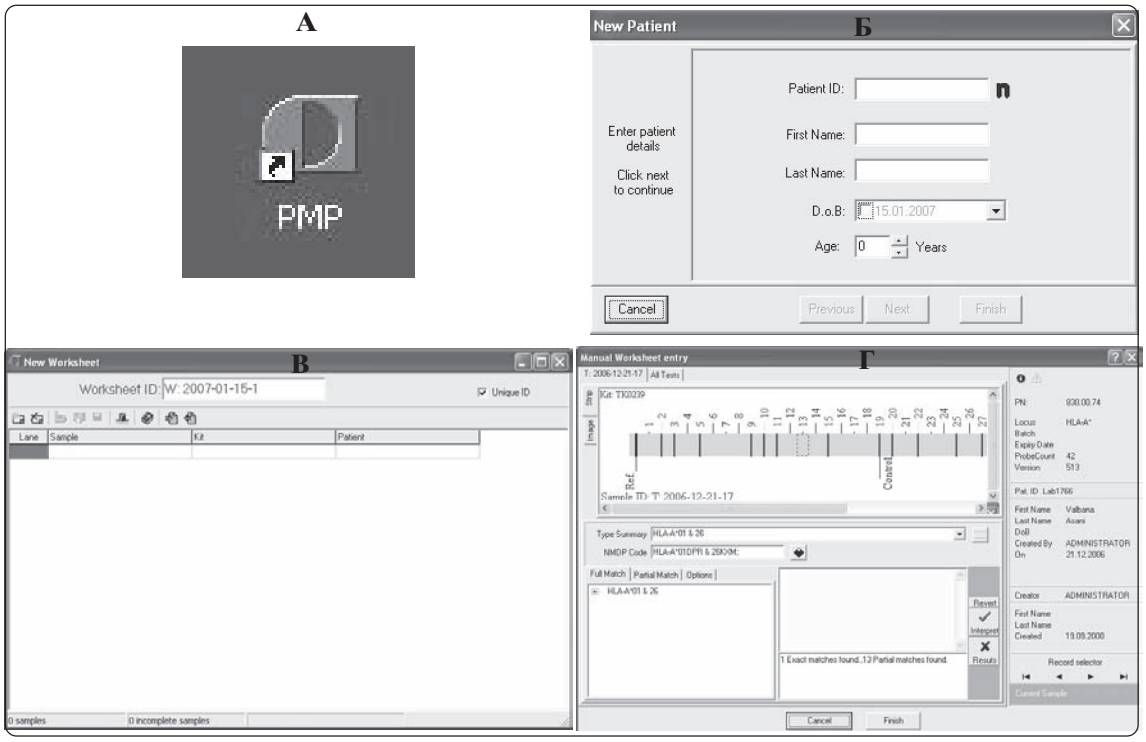
14.8. Задачи

14.8.1. Интерпретирај ги алелите за ХЛА локусот од нитроцелулозните ленти добиени со методот на реверзна хибридизација (РЛС)

Стартувај го со двоен клик софтверскиот програм Dynal Pattern Matching Program 5.30 (Слика 14.9A).

1. На почеток се внесуваат податоците од пациентот за анализа.

Одбери го копчето *Browse.* Одбери *Browse patients→ new*



*Слика 14.9: Интерпретација на резултат од ХЛА класа 1 со специјален софтвер (*Dynal Pattern Matching Program 5.30*).*

patient→ внеси податоци за пациентот→ *next*→ внеси коментари за пациентот→ *next*→ *finish* (Слика 14.9Б).

2. Понатаму се креира работен лист *(worksheet)* за секој пациент или за фамилијата на пациентот (Слика 14.9В).

Врати се на *Browse*. Одбери *Browse Worksheets*→ *Create new Worksheet*. Во прозорчето *Worksheet ID* внеси го бројот на пациентот или фамилијата за анализа→ во прозорчето *sample* одбери *add a new sample*→ во прозорчето *kit* одбери го локусот за типизација и серискиот број на китот со реагенсите (за секој ХЛА локус има соодветен број од производителот)→ во прозорчето *patient* одбери го пациентот што во претходниот чекор го внесе за анализа.

3. Следи анализа на позитивните проби и интерпретација на резултатот (Слика 14.9Г).

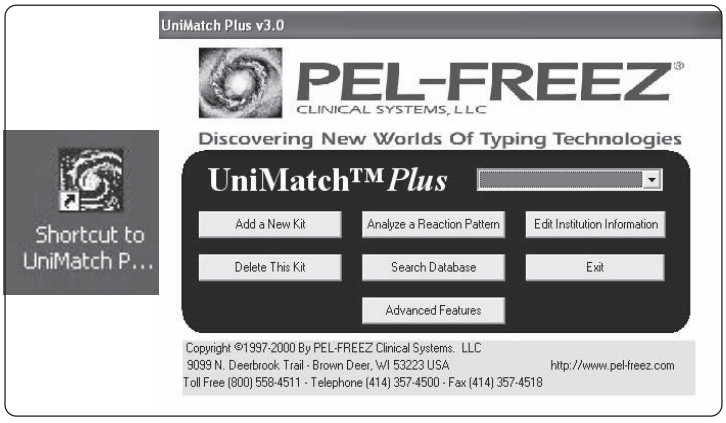
Одбери *Save and manually input data*→ внеси ги позитивните проби (сино обоените ленти)→ одбери *interpret*→ во прозорецот од левата страна ќе ги добиете алелите за испитуваниот локус→ одбери *finish*.

14.8.2. Интерпретирај ги алелите за ХЛА локусот со методот на ССП на високо разделно ниво

Стартувај го со двоен клик софтверскиот програм UniMatch Plus v3.0 (Слика 14.10лево).

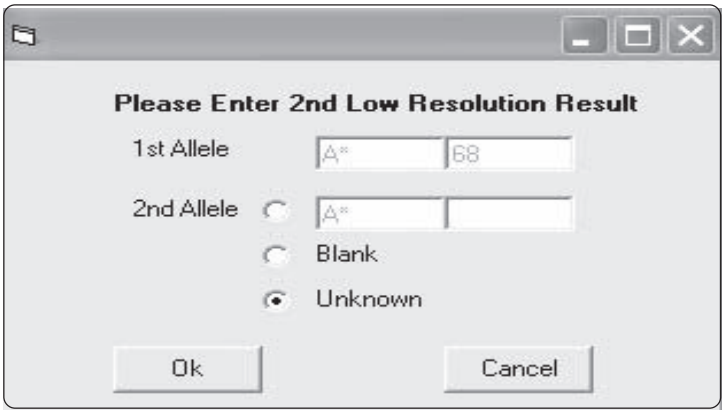
Од десното прозорче одбери го соодветниот кит за анализа→ одбери *analyze a reaction pattern.* Во прозорчето што ќе се појави внеси го вториот алел (Слика 14.11), доколку е познат со претходна анализа со ниска резолуција или одбери *unknown* доколку не е познат.

Во прозорчето *analysis form* внеси ги податоците за пациентот, неговата етничка припадност, дали се работи за примател или дарител, податоците за испитувачот, серолошките резултати од ХЛА типизација, како и податоци за китот кој го користиме за анализа (Слика 14.12горе).

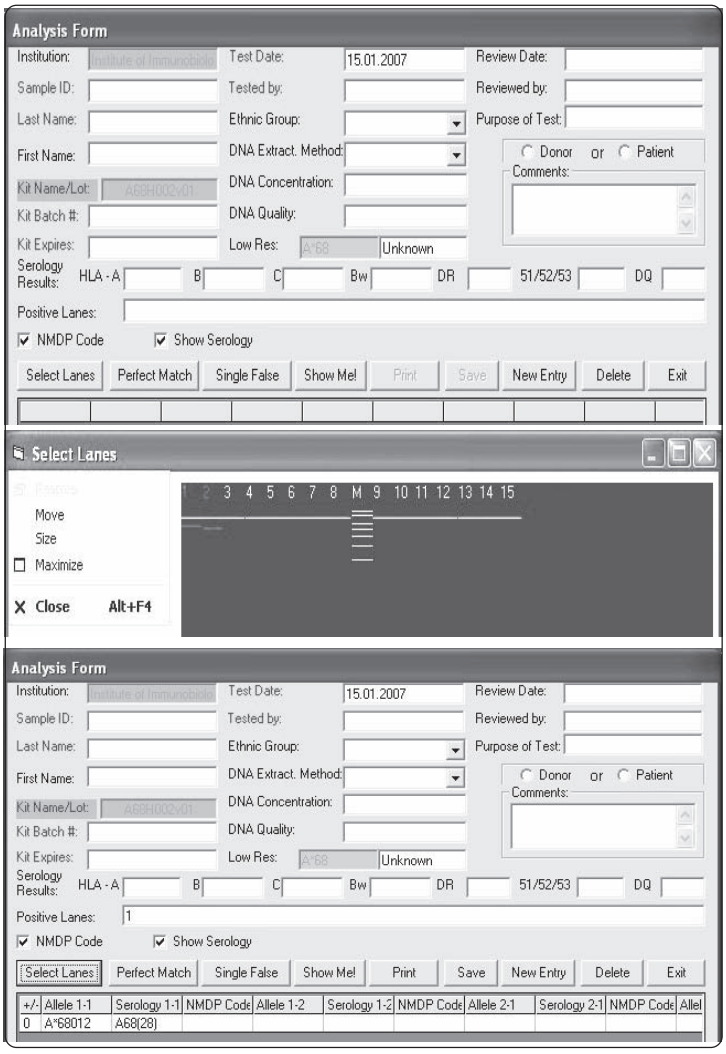


Слика 14.10: Активирање на софтверот за анализа на ХЛА класа 1 со методот ССП (UniMatch Plus v3.0).

Одбери *select lines*→ одбери ги позитивните ленти добиени од гел електрофорезата и внеси ги на соодветната предвидена линија. Линиите од скалата на електрофорезата со позната должина се означени со М (Слика 14.12средина). Потоа одбери → *perfect match.* Постои можност да се одбере и парцијална анализа на резултатот, односно со минимум на грешки во анализата. Таква анализа не се препорачува, но понекогаш е неопходна, особено ако сме наишле на нов



Слика 14.11: Внесување податок дали е познат другиот алел во софтверот за анализа на ХЛА класа 1 со меотодот ССП (UniMatch Plus v3.0).



Слика 14.12: Внесување податоци за испитаникот и за комплетот од ХЛА класа 1 (горе), внесување резултати од електрофорезата на специфичните амплификони (средина), и добиениот резултат од ХЛА класа 1 генотипизација (долу) со специјален софтвер за ССП (Uni-Match Plus v3.0).

Табела14.3: Формулар за внесување резултати од ХЛА.

алел. Во прозорецот ќе се појават алелите и можните комбинации на алели (Слика 14.12долу).

Резултатите се внесуваат на Табела 14.3

Број на пациент	ХЛА - локус	алел 1	алел 2

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 15: АНАЛИЗА НА ГЛАВЕН ТКИВНО СОВПАДЛИВ КОМПЛЕКС

Значењето на главниот ткивно совпадлив комплекс (ГТСК) може да биде за:

1. ***Антрополошки студии*** - одредување и споредување на алелски фреквенции меѓу популации и одредување на влијанието на миграциите и етничкото мешање врз потеклото на популациите.

2. ***Болести поврзани со ГТСК***- одредување на поврзаноста на одредени алели со различни болести.

3. ***Трансплантација*** - одредување на совпадливоста меѓу примателот и потенцијалниот дарител при трансплантација на солидни органи и ткива во рамките на фамилијата и кај несродни дарувања.

15.1. Нормални вредности за главниот ткивно совпадлив комплекс

Нормалните вредности за главниот ткивно совпадлив комплекс се искажуваат како фреквенција на определни алели од ХЛА во здрава популација, ако се определувани со молекулски методи. Најчесто фреквенцијата на алелите се искажува како децимален број со три децимални места. Фреквенцијата на фенотиповите, односно антигените определени со серолошки методи се искажуваат како проценти.

Поради универзалното значење, поради можностите за етнички, популациски и регионални споредби, како и поради потребата од глобални анализи (мета анализи), фреквенциите на алелите и на антигените се складираат во меѓународни бази на податоци достапни до сите истражувачи и граѓани во Светот.

Табела 15.1: Фреквенции на ХЛА-А алелите во македонската популација (216 несродни испитаници или 432 гени).

ХЛА-А алел		Алелска фереквенција (3 места)
1.	A*01	0.113
2.	A*02	0.322
3.	A*03	0.112
4.	A*11	0.049
5.	A*1101	0.049
6.	A*23	0.028
7.	A*24	0.132
8.	A*25	0.021
9.	A*26	0.039
10.	A*29	0.030
11.	A*30	0.024
12.	A*3001	0.012
13.	A*3002	0.012
14.	A*31	0.014
15.	A*32	0.049
16.	A*3201	0.049
17.	A*33	0.005
18.	A*3303	0.005
19.	A*66	0.002
20.	A*6601	0.002
21.	A*68	0.049

Табела 15.2: Фреквенции на ХЛА-Б алелите во македонската популација (216 несродни испитаници или 432 гени).

ХЛА-Б алели		Алелска фреквенција (3 места)
1.	B*07	0.045
2.	B*08	0.053
3.	B*13	0.027
4.	B*14	0.009
5.	B*1401	0.002
6.	B*1402	0.007
7.	B*15	0.032
8.	B*18	0.134
9.	B*27	0.031
10.	B*35	0.135
11.	B*38	0.048
12.	B*3801	0.046
13.	B*3802	0.002
14.	B*39	0.025
15.	B*40	0.049
16.	B*41	0.018
17.	B*4101	0.016
18.	B*4102	0.002
19.	B*44	0.072
20.	B*45	0.002
21.	B*4501	0.002
22.	B*49	0.019
23.	B*4901	0.019
24.	B*50	0.007
25.	B*5001	0.007
26.	B*51	0.153
27.	B*52	0.023
28.	B*5201	0.007
29.	B*520101	0.016
30.	B*53	0.009
31.	B*55	0.046

Постојат повеќе бази на податоци за ХЛА антигените и за алелите, но најпознати и најкористени се:

Базата за главниот ткивносовпадлив комплекс (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/mhc) и

Базата за алелски фреквенции (http:// www.allelefrequencies.net).

Податоците од алелите за ХЛА-А, -Б, -Цв и за -ДРБ1 во македонската популација се внесени во Базата за алелски фреквенции. Треба да се појасни дека податоците за ХЛА-ДРБ1 се внесени со четири децимални места, односно се прикажани алелите, додека во ХЛА-А, -Б, и -Цв се прикажани комбинирано: помалиот дел се прикажани како алели, а поголемиот дел се прикажани како групно специфични алели. Овие разлики произлегуваат од тоа што податоците за ХЛА-ДРБ1 се без двојбености (амбигвитети), додека податоците за ХЛА-А, -Б и -Цв се со двојбености и треба дополнително да се генотипизираат и прикажат како алели (со четири децимални места).

Фреквенциите од ХЛА-А алелите во македонската популација покажуваат најголеми фреквенции за ХЛА-А*02 (0.322), следуваат ХЛА-А*24 (0.132), ХЛА-А*01 (0.113), и ХЛА-А*03 (0.112). Досега се индентифицари вкупно 21 ралични алели, односно групно специфични алели (Табела 15.1). Ретки алели во македонската популација се ХЛА-А*66 (0.002).

Фреквенциите од ХЛА-Б алелите во македонската популација се прикажани на Табела 15.2. Податоците покажуваат најголеми фреквенции за ХЛА-Б*51 (0.153), следуваат ХЛА-Б*35 (0.135), и ХЛА-Б*18 (0.134). Досега се индентифицирани вкупно 31 различни алели, односно групно специфични алели. Ретки алели во македонската популација се ХЛА-Б*1401, ХЛА-Б*3802, ХЛА-Б*4102, ХЛА-Б*45, и ХЛА-Б*4501 (0.002).

Фреквенциите од ХЛА-Цв алелите во македонската популација се прикажани на Табела 15.3. Податоците покажуваат најголеми фреквенции за ХЛА-Цв*07 (0.243), следуваат ХЛА-Цв*04 (0.160), и ХЛА-Цв*12 (0.139). Досега се индентифицари вкупно 20 ралични алели, односно групно специфични алели. Ретки алели во македонската популација се ХЛА-Цв*020201, и ХЛА-Цв*1403 (0.002).

Фреквенциите од ХЛА-ДРБ1 алелите во македонската популација се прикажани на Табела 15.4. Податоците покажуваат најголеми фреквенции за ХЛА-ДРБ1*1601 (0.149), следуваат ХЛА-ДРБ1*1104 (0.139), ХЛА-ДРБ1*1101 (0.092), ХЛА-ДРБ1*0101 (0.082), ХЛА-ДРБ1*0701 (0.073), и ХЛА-ДРБ1*1301 (0.073). Досега се индентифицари вкупно 29 ралични алели, односно групно специфични алели. Ретки алели во македонската популација се ХЛА-ДРБ1*0408, ХЛА-ДРБ1*0804, ХЛА-ДРБ1*0806, ХЛА-ДРБ1*1307, и ХЛА-ДРБ1*1404 (0.003).

15.2. Болести поврзани со ГТСК

Одредени болести покажуваат асоцијација со соодветни ХЛА алели, а степенот на поврзаност се определува со одредување на релативниот ризик (РР).

РР може да се пресмета со равенката

$$РР = (Н * П+) * (Н * К-) / (Н * П-) * (Н * К+)$$

Н е бројот на пациентите (П) и на контролни примероци (К) со позитивни (+) или негативни (-) ХЛА алели.

РР исто така може да се пресмета доколку се познати соодветните фреквенции на алелите:

$$РР = хп * (1 - хц) / хц * (1 - хп)$$

Пример: околу 90% од пациентите кои боледуваат од специфично заболување имаат експресија на ХЛА антиген ХЛА-Бх, кој се наоѓа кај 9% од контролната популација. Релативниот ризик тогаш ќе биде:

$$РР = 0.9 (1-0.09) / 0.09 (1-0.9) = 91$$

Вредностите на РР> 1 значи дека лицата кои ја имаат соодветната детерминанта имаат зголемен ризик, додека оние со вредност РР < 1 имаат помал ризик за развој на болеста.

Во горниот пример, индивидуите кои имаат прикажано ХЛА-Бх имаат 91 пати поголема можност да развијат болест отколку оние кои го немаат алелот за ХЛА-Бх. Но, тоа не значи дека сите лица кои имаат ХЛА-Бх алел ќе заболат од таа болест.

Опишани се и повеќе од една асоцијација за многу ХЛА детерминанти, на пример ХЛА-ДР3, детерминанта која припаѓа на хаплотипот ХЛА-А1, Б8, ДР3. Овој хаплотип е многу чест во северна и средна Европа и воопшто кај белото население. Се смета дека овој хаплотип покажува асоцијација со развојот на автоимуните заболувања, но причината за тоа сеуште не е позната (Табела 15.1) .

Табела 15.3: Фреквенции на ХЛА-Цв алелите во македонската популација (216 несродни испитаници или 432 гени).

	ХЛА-Цв алели	Алелска фреквенција (3 места)
1.	Cw*01	0.039
2.	Cw*0102	0.039
3.	Cw*02	0.076
4.	Cw*0202	0.049
5.	Cw*020201	0.002
6.	Cw*020202	0.025
7.	Cw*0209	0.069
8.	Cw*04	0.160
9.	Cw*05	0.044
10.	Cw*06	0.069
11.	Cw*0602	0.069
12.	Cw*07	0.243
13.	Cw*08	0.011
14.	Cw*12	0.139
15.	Cw*14	0.046
16.	Cw*1402	0.044
17.	Cw*1403	0.002
18.	Cw*15	0.076
19.	Cw*16	0.009
20.	Cw*17	0.016

15.2. Анализа на ГТСК асоцијација и болести

За ХЛА системот е карактеристична врзаната нерамнотежа (linkage disequilibrium). Врзаната нерамнотежа претставува разлика помеѓу најдената фреквенција за одредена комбинација на алели и очекуваната фреквенција според фреквенцијата на индивидуалните алели. Очекуваната фреквенција за комбинациите може да се пресмета со множење на фреквенциите од двата алели. ХЛА алелите на некој локус, на пример ХЛА-А1 се често поврзани со специфични алели од други локуси, на пример ХЛА-Б8. Доколку ХЛА-А1 се јавува кај 16% во популацијата (фреквенција=0.16) и ХЛА-Б8 во 9% од таа група (фреквенција = 0.09) се очекува 1.4% од таа група да ги имаат двата алела (0.16x0.09=0.014). Сепак, податоците

Табела 15.4: Фреквенции на ХЛА-ДРБ1 алелите во македонската популација (158 несродни испитаници или 316 гени).

ХЛА-ДРБ1 алели		Алелска фреквенција (3 места)
1.	DRB1*0101	0.082
2.	DRB1*0102	0.01
3.	DRB1*0301	0.067
4.	DRB1*0401	0.013
5.	DRB1*0402	0.019
6.	DRB1*0403	0.019
7.	DRB1*0404	0.01
8.	DRB1*0405	0.01
9.	DRB1*0407	0.013
10.	DRB1*0408	0.003
11.	DRB1*0701	0.073
12.	DRB1*0801	0.019
13.	DRB1*0804	0.003
14.	DRB1*0806	0.003
15.	DRB1*0901	0.006
16.	DRB1*1001	0.019
17.	DRB1*1101	0.092
18.	DRB1*1103	0.013
19.	DRB1*1104	0.139
20.	DRB1*1201	0.013
21.	DRB1*1301	0.073
22.	DRB1*1302	0.032
23.	DRB1*1307	0.003
24.	DRB1*1401	0.029
25.	DRB1*1404	0.003
26.	DRB1*1501	0.044
27.	DRB1*1502	0.016
28.	DRB1*1601	0.149
29.	DRB1*1602	0.029

покажуваат дека ХЛА-А1 и ХЛА-Б8 се наоѓаат заедно во 8.8% од испитуваните индивидуи. Оваа разлика е мерка за врзаната нерамнотежа помеѓу овие алели од ХЛА класа 1.

Покрај тоа, фреквенцијата на ХЛА алелите се разликува од онаа на нормалните или тие кај здравата популација. На тој начин, честиот алел во групата на пациенти не секогаш значи и асоцијација со болест, особено кога тој алел е многу чест во популацијата.

Од друга страна зголемената застапеност на одреден алел може да посочува на индиректна асоцијација со болест, бидејќи тој алел може да биде во неврзана рамнотежа со други, цврсто врзани алели. На пример, кај идиопатски мембрански гломерулонефритис е најдено дека оваа болест е поврзана со ХЛА-Б8 со РР од 2.3. За ХЛА-ДР3, антиген кој се наоѓа во врзана нерамнотежа со ХЛА-Б8 РР е 12.0. Антигените кои се дефинирани со врзана нерамнотежа во популацијата исто така создаваат хаплотипови на фамилии.

15.3. Асоцијација со хаплотипови

Некои болести покажуваат поголем степен на поврзаност со специфичен хаплотип отколку со единечни антигени или алели. Таков пример е јувенилниот дијабетес мелитус тип 1. Се смета дека лицата кои имаат ХЛА-ДР3 + ХЛА-ДР4 имаат поголема можност за развој на болеста, отколку оние кои имаат само ХЛА-ДР3 или ХЛА-ДР4.

15.4. Значење на ХЛА системот во трансплантација

За трансплантација на бубрег доволно е половина од ХЛА гените помаѓу давателот и примателот да бидат идентични (полуидентични или хаплоидентични) за да се прифати калемот успешно. Поради тоа, за трансплантација на бубрег е доволна серолошка типизација за ХЛА. Бидејќи родителите и децата се секогаш полуидентични (освен во ретки случаи при рекомбинација на ХЛА гените) давањето бубрег од родител на дете е најчестата комбинација (сродни трансплантации).

За трансплантација на коскена срцевина (ТКС), степенот на ХЛА совпаѓање помеѓу дарителот и примателот се критични за успешната трансплантација, или веројатноста да се развие болеста калем против домаќин (БКпД) е голема. Таа е најчестата форма на отфрлање во клиничките трансплантати при ТКС. Во обид да се минимизираат ваквите алогени одговори се прави типизација на ХЛА класа 1 и класа 2 гените на дарителот и на примателот колку е можно попрецизно.

Меѓутоа, поради исклучителниот полиморфизам, ХЛА идентичен дарител ретко се добива. Најголем дел приматели

Болест	ХЛА алел	Релативен ризик (РР)
Анкилозирачки спондилит	Б27	90
Гудпастеров синдром (Goodpasture`s syndrom)	ДР2	16
Глутен сензитивна ентеропатија	ДР3	12
Хередитарна хемохроматоза	А3 Б14 А3/Б14	9.3 2.3 90
Инсулин зависен дијабетес мелитус	ДР4/ДР3	20
Мултипна склероза	ДР2	5
Мијастенија гравис	ДР3	10
Нарколепсија	ДР2	130
Реактивен артрит	Б27	18
Рајтеров синдром (Reiter`s syndrom)	Б27	37
Ревматоиден артрит	ДР4	10
Системску лупус еритематозус (СЛЕ)	ДР3	5

Табела 15.5: ХЛА асоцијации со болести со зголемен ризик за развој на болест.

се подложени на имуносупресивни лекови за да се спречи или да се запре алогениот одговор, но истовремено овој неспецифичен приод го нарушува имуниот одговор и тој станува осетлив кон инфекции.

15.4.1. Барање дарител

Кога се бара дарител за коскена срцевина, првата стапка е да се бара помеѓу браќата и сестрите (*сроден дарител*). Ако нема ХЛА идентичен дарител во роднините или ако пациентот нема браќа и сестри, одлуката се базира врз болеста на пациентот, медицинските услови и ХЛА типизација во поширокатa фамилија (тетки, чичковци, братучеди и слично) или директно се бара несроден дарител. *Несроден дарител* се бара низ националните и интернационалните регистри за трансплантација на коскена срцевина во кои има илјадници ХЛА типизации, а во некои случаи милиони потенцијални донатори.

15.4.2. Толкување резултати

Ниту една молекулска техника, сама по себе не е доволна за добивање на единечен, недвојбен резултат (резултат со четири децимални места). Решавањето на амбигвитетите е скапа и исцрпувачка работа, затоа секоја лабораторија развива сопствена стратегија при типизирањето на пациентите и комбинирањето на методите со цел да се добие единечен резултат на високо разделно ниво во зависност од опремата и условите за работа.

Тука ќе ја прикажеме стратегијата и алгоритамот на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, при типизирањето на пациентите за трансплантација на коскена срцевина (ТКС).

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Бубрежниот калем како компликација од автоимуна инсулин зависна шеќерна болест: Случајот на Христијан Ѓорески: сага за отфрлањето и прифаќањето орган.

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Болест калем против домаќин: Случајот на Илија Попов, лекувањето предизвика проблем.

Барањето соодветен дарител за ТКС се врши во рамките на фамилијата (сродно дарување). Првиот скрининг на потенцијалните дарители се изведува со методот на реверзна хибридизација, РЛС.

По завршената реверзна хибридизација и скрининг на пациентот и потенцијалните донори, вообичаено се добиваат резултати со висок процент на амбигвитети, односно типизирањето е од ниско до средно разделно ниво на типизација.

При *сродното дарување*, совпадливоста помеѓу пациентот и потенцијалниот донор може да се идентификува врз основа на хаплотиповите кои ги наследуваат од мајката и од таткото. Заради тоа, при секоја типизација потребни се примероци крв од сите членови на потесното семејство (мајка, татко, брат, сестра), доколку се достапни.

За попрецизни резултати, или каде не постои можност за сродно дарување, следува фазата на барање несроден дарител. За *несродното дарување* неопходно е високо разделно типизирање, кое кај нас се изведува со методата на ССП. Несродното дарување за сега се изведува во поголемите интернационални центри за трансплантација на коскена срцевина.

Пациентот и потенцијалниот донор, кој е откриен со методата на РЛС, се типизираат на високо разделно ниво со методата на ССП, со што значително се намалува процентот на амбигвитети до поптолно добивање на единечен недвојбен резултат.

Сценарио: Кај пациентот е дијагностицирана акутна миелоидна леукемија. Лекарите препорачуваат трансплантација на коскена срцевина.

Задача: Пронајдете дали пациентот има соодветен дарител од членовите на неговата фамилија (Табела 15.2).

Табела 15.6: Формулар за внесување резултати од молекулска типизација на ХЛА.

ХЛА локус	Пациент алел 1+алел 2	Брат/Сестра алел 1+алел 2	Мајка алел 1+алел 2	Татко алел 1+алел 2
ХЛА-А				
ХЛА-Б				
ХЛА-Ц				
ХЛА-ДРБ1				
Идентичност				

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

БЛОК 6 - ПРЕОСЕТЛИВОСТ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 16. ТИП 1 ПРЕОСЕТЛИВОСТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да определат вкупен и специфичен ИгЕ;
- кои анализи се потребни за испитување тип 1 преосетливост.

ВЕЖБА 17. ТИП2 И ТИП 3 ПРЕОСЕТЛИВОСТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- да определат индиректен и директен противглобулински тест;
- како се определува количината на циркулирачките имуни комплекси.

ВЕЖБА 18. АНАЛИЗА НА ПРЕОСЕТЛИВОСТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од тип 1 преосетливост;
- анализираат случаи од тип 1 преосетливост.

ПОЕНИ:

ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 16: ТИП 1 ПРЕОСЕТЛИВОСТ

16.1. Реакции на преосетливост

Внесувањето противгени по примарна имунизација доведува до вторична (секундарна) имунизација во најголем број случаи, но понекогаш може да се развие преосетливост (хиперсензитивност). Денес разликуваме пет типови преосетливост:

Тип 1. Анафилактичка преосетливост;
Тип 2. Цитотоксична преосетливост;
Тип 3. Имунокомплексна преосетливост;
Тип 4. Одложена (клеточна) преосетливост;
Тип 5. Стимулациска преосетливост.

Во сите реакции на преосетливост од типовите 1-3 вклучени се хуморални противтела, додека од типот 5 преосетливост вклучени се противрецепторски противтела. Наспроти тоа, во преосетливост од типот 4 вклучени се Т-лимфоцитите.

16.2. Одредување вкупен ИгЕ и специфични ИгЕ противтела

16.2.1. Алергени

Точната алерголошка дијагноза зависи од вистинскиот избор на алерген за тестирање. Во овој дел се објаснуваат разликите помеѓу алергените и нивната примена во дијагностичките тестови. Понекогаш кај пациентите може да се јават симптоми предизвикани од претходно неидентификувани супстанции кои може да бидат нови алергени, па пациентите треба да се испитуваат за да се идентификува новиот алерген. Сепак, за супстанции како боја за печатење текст, формалдехид, чад од цигари, смог,

памук, шеќер и човечки првут не постојат доволно податоци за да бидат користени како тест алергени.

16.2.1.1. Вдишени (инхалаторни) алергени

Аероалергените кои се добро познати како предизвикувачи на ИгЕ посредувана алергија ги вклучуваат полените, фунги, алги, животински отпадоци, инсекти, микрокрлежи, протеини од храна, додатоци на храна, антибиотици, лекови и професионални алергени. Постојат и случаи кога не се идентификувани специфични алергени адекватни за дијагностичко тестирање.

Одредувањето бројот и видот на алергени погодни за испитување зависи од нивната поврзаност со податоци од историјата на пациентот, вклучувајќи значајна изложеност, објективен доказ за алергеноста на супстанцата од интерес и од постоењето на соодветен алерген материјал за тестирање.

Некои полени покажуваат вкрстена реактивност и клиничарот мора да биде свесен за нивното клиничко значење за да се избегне непотребно удвојување. Кога вообичаени полени не предизвкуваат вкрстена реактивност, испитувањето и лечењето со повеќе локално превалентни полени може да е неопходно за да се избегне значително промашување.

Екстракти од домашна прашина содржат различни алергени. Различноста во составот и потентноста на алегените во комерцијалните екстракти од домашна прашина и достапноста на повеќе селективни алергенски екстракти за испитување на поединечни компоненти (на пр. микрокрлежи, бубашваба, епидерми) од домашната прашина го намалува значењето на комерцијалниот екстракт од домашна прашина.

Фунгите (мувлите) може да доведат до симптоми на респираторна алергија. Техничките потешкотии во изолирањето на специфични фунгални противгени од спорите или хифите го отежнуваат и карактеризирањето на клинички значајните алергени за некои од овие видови. За клинички цели, фунгите може да се класифицираат како надворешни (на пр. Alternaria sp. и Cladosporium sp.) и/или внатрешни (на пр. Aspergillus sp. Penicillium sp.)

16.2.1.2. Храни

Моментна преосетливост посредувана од ИгЕ кон различни видови на храна е практично важна за мали деца и адолесценти, но треба да се земе во предвид во било која возраст ако податоците од анамнезата сугерираат на тоа.

Скоро секоја храна може да биде алергена. Бидејќи алергеноста е високо специфична за одредена храна, нереактивност кон некоја храна претставник на група на

слични храни не може да се земе како доказ за отсуство на реактивност кон други храни од таа група. Иако многу алергени од храна се добро карактеризирани, сеуште не постојат стандардизирани екстракти од храна. Понатаму, релевантните алергени присутни во нативната храна може да не бидат присутни во екстрактот за тестирање. Многу храни содржат противгени кои брзо се губат веројатно поради протеолитичката дигестија за време на чувањето, па затоа корисно е тестирање со свежи природни сокови, посебно ако постои сомневање за алергиски реакции кон овошје.

Историјата (анамнезата) на пациентот е најважна во изборот на храни за тестирање, а некогаш треба анамнезата на пациентот да се дополни со податоци за симптомите после јадење според диета која прецизно му е одредена. Ваков приод е потребен првенствено за пациенти со потенцијал за анафилакса предизвикана од храна.

Кај деца помлади од 3 години, најважни алергени од храна се млеко, белка од јајце, кикирики, соја, пченка и овошја од групата на цитрони.

16.2.1.3. Антибиотици, други лекови и хемикалии

Механизми посредувани од ИгЕ може да се одговорни за несакани дејства на многу антибиотици, други фармацевтски и биолошки протеини. За многу од овие супстанции сеуште не се идентифицирани релевантните алергени или не постојат како комерцијални екстракти за тестирање.

Пеницилоил полилизин е реагенсот кој се користи за откривање на ИгЕ противтела кон главната алергенска детерминанта на пеницилинот (пеницилоил) и е позитивен во 80% од пациентите осетливи на пеницилин.

Иако повеќето реакции на пеницилин се должат на сензибилизација со метаболички продукти што потекнуваат од бета-лактамскиот прстен, специфични детерминанти од страничниот ланец на различни пеницилини може да се одговорни за некои реакции на преосетливост кон бета-лактамските антибиотици.

Кожни и *ин витро* тестови може да се користат за откривање на осетливост кон биолошки препарати (инсулин, ензими, протамин, хепарин, интравенски имуноглобулински препарати и други крвни продукти) и одредени вакцини кои содржат супстанции со голема молекулска маса во траги. Не е е добро познато каква е клиничката вредност на овие тестови.

Многу хемикалии (сулфонхлорамиди, азотни бои, ароми) кои се користат во храните како адитиви, лекови, козметички препарати може да предизвикаат или ИгЕ посредувани реакции или контактен дерматитис или и двете.

16.2.1.4. Професионални алергени

Покажано е дека повеќе од 200 супстанции со голема и мала молекулска маса кои се користат во индустријата предизвикуваат алергиски симптоми со класични имунолошки механизми.

Кога внесувањето на овие супстанции е преку респираторниот пат, најчести манифестации на сензибилизација се ринитис, астма и/или хиперсензитивен пнеумонитис. Многу ниско молекуларни хемикалии од работните места се познати како предизвикувачи на најчестата имунолошка професионална болест, алергиски контактен дерматитис.

16.2.1.5. Различни растителни продукти

Многу растителни продукти како химопапаин, пиретрум, семе од памук, псилиум и растителни гуми се поврзани со алергиски симптоми.

Преваленцијата на осетливост и анафилакса кон латекс протеинот кој се содржи во медицинските ракавици, воздух и други медицински препарати многу е зголемена и кај пациенти и кај медицинскиот персонал. Осетливите индивидуи може да реагираат на латекс во катетерите, ендотрахеални туби, делови кои се инсталираат интравенски или други болнички материјали кои содржат латекс.

Тестирање со латекс протеин и/или други растителни продукти може да е индицирано кај одредени пациенти, но треба да се потенцира дека стандардизирани и добро карактеризирани екстракти за овие алергени сеуште нема.

16.2.1.6. Контактни алергени

Хемикалии, растителни смоли и масти се главна причина за алергиски контактен дерматитис.

Со печ тест со 20 до 30 алергени од скрининг панел се откриваат до 70% од сите алергиски контактни дерматитиси.

Откривање на причината за алергиски контактен дерматитис во индивидуални случаи вклучува скрининг печ тестови, по што следат тестови за специфични компоненти ако постои можност за нивно одредување.

16.2.1.7. Основни принципи за вкрстена реактивност меѓу растителни алергени

Постои значителна алергенска различност помеѓу полените од дрва. Исклучоци постојат кај некои иглолисни дрва и членови на фамилиите брези и буки (даб, негундо и леска).

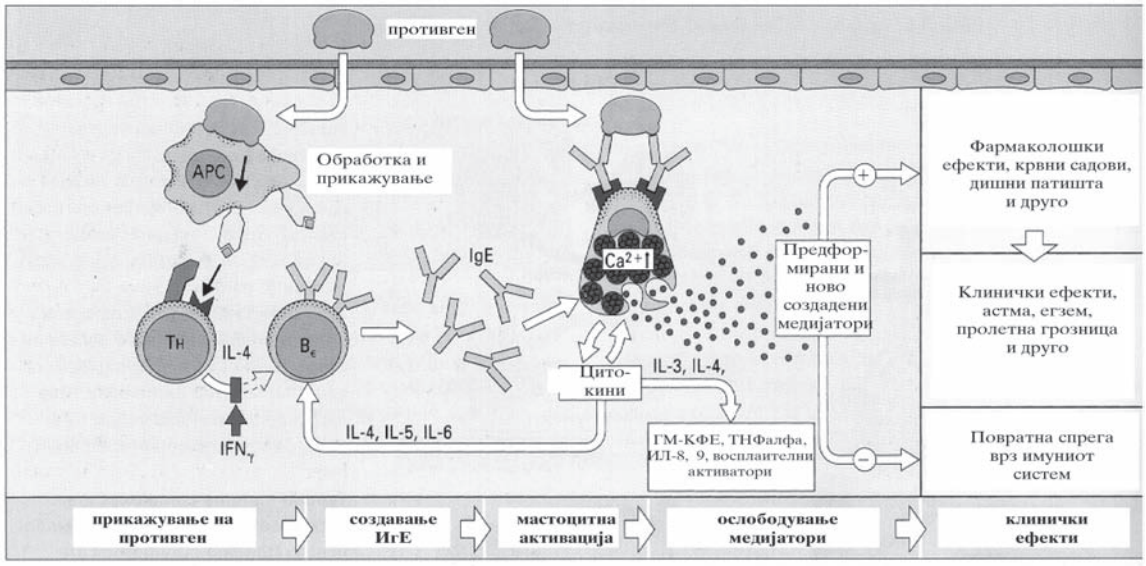
Постоењето на заеднички противгени е правило за голема подфамилија на треви “северни пастирски треви”; сепак

комплетна вкрстена реактивност ретко се јавува. Тревите мачкина опашка и метла имаат додатни единствени противгени кои може да се од клиничко значење. Обичниот троскот не реагира вкрстено со северните треви, но покажува мала вкрстена реактивност со западните прериски треви.

Коровите од сложената фамилија која го вклучува родот амброзија, се потентни сензибилизатори и екстензивно вкрстено реагираат. Пелините (род Артемисиа) силно вкрстено реагираат помеѓу себе. Вкрстена реактивност постои и кај коровите дива лобода, штир и лобода. Кај некои корови постои само парцијална вкрстена реактивност.

16.2.2. ИгЕ посредувана алергија

ИгЕ противтелата создадени по првиот контакт со одреден алерген се фиксираат на површината на мастоцитите во кожа и слузници. Доколку алергенот кој го предизвикал создавањето на ИгЕ противтелата повторно се најде во



Слика 16.1: Шематски приказ на механизмите вклучени во созда-вањето алергиска реакција кај луѓе (тип 1 преосетливост).

циркулацијата (по повторно внесување на инкриминираната храна) тој е врзан од ИгЕ противтелата фиксирани на мембраната на мастоцитите. Резултат на реакцијата противген-прtоивтело која се одвива на површината на мастоцитите е нивна дегранулација при што се ослободуваат биолошки активни супстанции (хистамин, леукотриени и простагландини). Овие пак предизвикуваат вазодилатација и зголемена пропустливост на крвните садови и се одговорни за симптомите карактеристични за алергиската реакција (воспаление, уртикарија, секреција на слуз, чешање или кивање) (Слика 16.1).

Најсериозната, опасна по живот алергиска реакција е

анафилактичкиот шок. Во оваа состојба моментното ослободување на различни биолошки медијатори доведува до отекување на грлото, бронхоконстрикција, намалување на крвниот притисок, губење на свеста, а некогаш дури и до смрт. Храни кои обично се поврзани со оваа инаку ретка состојба се кикирики, морска храна, јајца и млеко.

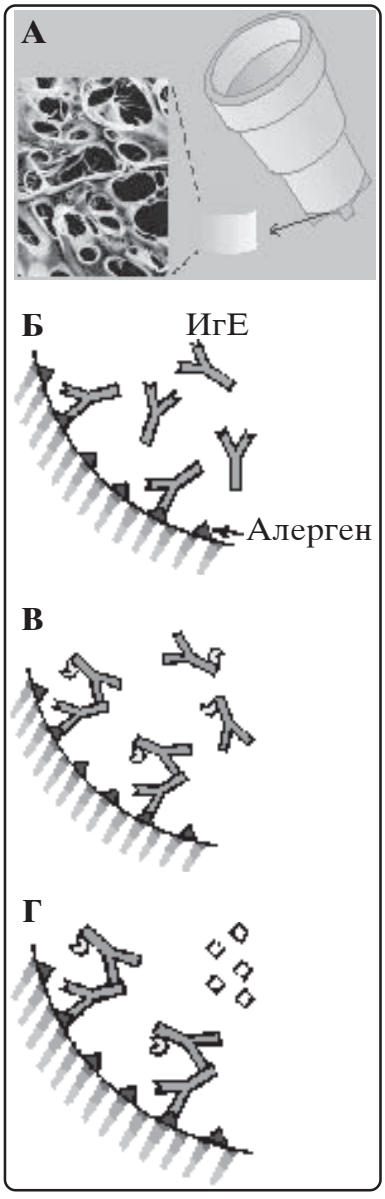
16.2.3. Дијагностицирање на ИгЕ посредувана алергија

ИгЕ посредуваната алергија е несакана реакција кон некој алерген која најчесто е лесна за идентификување, најмногу затоа што постојат доверливи дијагностички тестови.

Во рутинска примена се два начини за дијагностицирање на ИгЕ посредувана алергија. Првиот е инјектирање (поткожно) на сомнителниот алерген во подлактицата на пациентот и следење на последователната реакција. Вториот, понов метод подразбира откривање на циркулирачки ИгЕ противтела кон различни алергени во серумот на испитаникот во ин витро услови. Помеѓу резултатите добиени со примена на двата методи постои висока корелација и таа е над 90%. Добрите особини на квантитативното одредување на специфичните ИгЕ противтела се:

1. резултатот не зависи од евентуално користената терапија;
2. може да се примени и кај болни со силно изразени кожни промени;
3. може да се изведува без никаков ризик по испитаникот (од анафилактички шок на пр.);
4. серумот за испитување може да се замрзнува па да се прават и споредби на концентрацијата на противтелата кај истиот испитаник во текот на времето;
5. посебно е препорачлив за испитување на деца помали од 3 години бидејќи со едно боцкање (земање крв) може да се испита присуство на ИгЕ противтела кон многу алергени).

Релативни недостатоци на ин витро одредувањето на ИгЕ противтела се ограничувањето само на циркулирачки противтела, а не и на тие фиксирани на мастоцитите и во ткивата, како и неговата висока цена.



Слика 16.2: Принцип за определување специфичен ИгЕ.

16.2.4. Принцип за определување специфичен ИгЕ

Специфичниот ИгЕ се определува со сендвич имунолошко определување. Алергените се врзуваат за цврста фаза и реагираат со специфичните ИгЕ противтелата во приме-

рокот. Со ИгЕ противтелата се откриваат флуорес-центно обележени против ИгЕ противела (Слика 16.2).

А. Алергенот ковалентно се врзува за топченце (имунокап) кое што реагира со специфичниот ИгЕ во серумот од пациентот;

Б. После исплакнување (исфрлање) на неспецифичниот ИгЕ, се додаваат противтела кон ИгЕ кои создаваат комплекси;

В. После инкубација, се исфрла неврзаниот обележен против ИгЕ со плакнење, а врзаните комплекси се инкубираат со соединение за развивање;

Г. После стопирање на реакцијата се мери флуоресценцијата на елуатот (испирокот). Колку повеќе специфичен ИгЕ се врзал за кугличките толку повисока флуоресценција се добива. За да се определи количеството на специфичен ИгЕ, серумот од пациентот се споредува со калибрациските примероци.

16.3. Разликување атописки од не-атописки болести

Поимот атопија означува локална реакција на преосетливост тип 1. Најновата дефиниција за атопија е дека атопијата е лична или фамилна тенденција:

- да се создаваат ИгЕ противтела во одговор на ниски дози алергени, обично протеини и како резултат на тоа
- да се развијат типични симптоми како што се астма, риноконјунктивит или егзем/дерматит.

За разликување атописки од неатописки болести се користат три алерголошки испитувања: UniCap Phaditop, UniCap fx5 и UniCap вкупен ИгЕ.

16.3.1. UniCap Phadiatop

Што мери UniCap Phadiatop? Phadiatop е тест со кој се разликуваат атописките од неатописки болести. Тој е првиот чекор што се презема во испитувањето на атописка алергија. Тестот се состои од балансирана мешавина на релевантни алергени кои реагираат со специфични ИгЕ противтела во серумот на пациентот. UniCap Phadiatop укажува на атописка алергија на вообичени дишни алергени.

Која е клиничката корист од овој тест? Phadiatop овозможува диференцијално испитување на атопијата. Кај деца, тинејџери и возрасни, дава одговор на прашањето:

дали симптомите на пациентот се должат на алергија? UniCap Phadiatop дава објективен одговор да или не:

- позитивен резултат укажува на атописка алергија. Лекарот може да продолжи со поспецифични тестови за да го потврди алергенот причинител;
- негативен резултат укажува дека симптомите не се предизвикани од вообичаени алергени и лекарот може да испитува други можности.

Колку се доверливи резултатите? Комбинациите на алергени што се користат, како и начинот на кој се комбинирани резултираат со веројатност од 90% во точно класирање на атопични и не-атопични пациенти постари од 6 години.

Клиничката осетливост и специфичност е следна:

- осетливост: 93%;
- специфичност 89%.

16.3.2. UniCap fx5

Што мери UniCap fx5? UniCap fx5 е мулти-алергенски тест кој укажува на присуство на ИгЕ противтела во серум или плазма кон алергени од соја, кикирики, млеко, јајца, пченица или риба. Алергенскиот панел претставува вообичаени нутритивни алергени.

Која е клиничката корист од овој тест? UniCap fx5 е тест за испитување осетливост кон вообичаени нутритивни алергени:

- кај возрасни и кај деца, позитивен одговор потврдува алергија на храна и треба да биде следен од тестирања со посебни нутритивни алергени;
- кај многу мали деца (под 3 години), овозможува потврдување на атописки статус.

Позитивен резултат кај многу мали деца потврдува осетливост кон нутритивни алергени вклучени во тестот. Појавувањето на ИгЕ противтела толку рано во животот е често поврзано со покасно развивање на алергиска болест.

Затоа, индивидуите треба да бидат следени за да се види дали развиле симптоми и станале осетливи и на други алергени.

Колку доверливи се резултатите? Осетливоста и специфичноста на fx5 е пресметана и се добиени следните резултати:

- осетливост: 89%;
- специфичност 96%.

16.3.3. UniCap вкупен ИгЕ

Што мери UniCap вкупен ИгЕ? UniCap вкупен ИгЕ квантитативно мери количина на вкупен ИгЕ во серум или плазма. ИгЕ се создаваат во организмот како резултат на повторувана стимулација со алергени.

Која е клиничката корист од тестот? Високи нивоа на циркулирачки вкупни ИгЕ противтела се обично поврзани со алергии.

Мерење на вкупен ИгЕ:

- обезбедува вредни информации за вкупната оптеретеност со алергии;
- обезбедува увид во атопискиот статус на пациентот;
- во професионална алергија, тестот укажува на атописки статус и може да не постои поврзаност со вообичаени алергени, па е потребно поспецификно испитување.

Какви вредности треба да се очекуваат? Концентрацијата на ИгЕ во серум е поврзана со возраста. На околу 10 години, вкупниот ИгЕ достигнува вредности кои се одржуваат понатаму. Како нормални вредности за вкупниот ИгЕ се дефинираат горните граници бидејќи постои асиметрична дистрибуција на добиените вредности. Препорака е секоја лабораторија да има сопствени очекувани вредности.

16.4. Дијагностички помагала за специфични алергии

Противтелата што се мерат со методот на УниКап (UniCap) можеме да ги поделиме во четири групи. Првите три групи опфаќаат противтела од трите имуноглобулински класи ИгЕ, ИгА и ИгГ, а четвртата група се клеточни обележувачи (Табела 16.1). Глобално, ИгЕ противтелата укажуваат на алергиски процеси, ИгА противтелата укажуваат на промени во мукозно асоцираното лимфоидно ткиво (МАЛТ), додека ИгГ противтелата укажуваат на цитотоксични реакции во организмот. Клеточните обележувачи укажуваат на степенот (или интензитетот) на реактивноста на некои клетки вклучени во тип 1 преосетливост (еозинофили, базофили и други).

16.4.1. UniCap специфичен ИгЕ

Што мери UniCap специфичен ИгЕ? UniCap специфичен ИгЕ мери ИгЕ противтела кон специфични алергени во човечки серум или плазма. Специфичните ИгЕ се појавуваат во човечкиот серум или плазма како резултат на сензиби-

Табела 16.1: UniCap тестови по клинички области.

UNICAP ТЕСТ	КЛИНИЧКА ОБЛАСТ
Инуноглобулин Е	
UniCap Phadiatop	алергии, атопија/не-атопија диференцијална дијагноза
UniCap fx5	алергии, дијагноза на алергија на храна
UniCap вкупен ИгЕ	дијагноза на алергии
UniCap специфичен ИгЕ	алергии, дијагноза на специфични алергени
Имуноглобулин А	
UniCap специфичен ИгА	алергии, ентеропатии осетливи на храна, целијакија
UniCap глијадин ИгА	целијакија
Имуноглобулин Г	
UniCap специфичен ИгГ	алергии, целијакија, имунотерапија, болест на бели дробови, автоимунитет
UniCap глијадин ИгГ	целијакија
UniCap ТПО	тироиден автоимунитет
UniCap ТГ	тироиден автоимунитет
Клеточни обележувачи	
UniCap ЕКП	астма, водење на лечење со кортикостероиди
UniCap триптаза	алергија, анафилакса

лизирање со алерген и може да се откријат после повторно изложување.

Која е клиничката корист од тестот? Мерењето на циркулирачки ИгЕ противтела кон специфичен алерген обезбедува објективно мерење на сензибилизацијата со алергенот. Денес за испитувања постојат повеќе од 450 алергени.

Мерење на специфични ИгЕ помага во идентификувањето на предизвикувачките алергени, предвидува ризик за алергиско заболување и ги насочува клиничките одлуки:

- *Идентификување на предизвикувачки алергени.*

  Одредување на реактивност кон некој алерген обезбедува информации за можните причинители на алергиски симптоми и воспаление. Мерењето на ИгЕ заедно со информациите за возраста, симптомите, клиничките услови и времето кога симптомите се видливи може да придонесат за лекување на пациенти со атопичен екзем, алергиски бронхитис, ринитис, конјуктивитис и астма.

- *Предвидување на иден развој на алергија.*

Посебно кај мали деца, раниот ИгЕ одговор може да ги направи индивидуите подложни на идна осетливост кон алергени. Мерењето ИгЕ кај мали деца овозможува следење на развојот на атопијата.

- Насочување на клиничките одлуки кај млади со атопичен дерматит.

За некои алергии на храна вредноста кЕА/Л (кило единици специфичен алерген на еден литар) на специфичните ИгЕ може да биде од корист.

Какви вредности треба да се очекуваат? Здравите индивидуи имаат многу ниски нивоа на специфични ИгЕ во крвта, нормално под 0.35 кЕА/Л (кило единици специфичен алерген во еден литар). Сензибилизираните пациенти покажуваат зголемени нивоа, над 0.35 кЕА/Л. UniCap специфичните ИгЕ откриваат ИгЕ противтела во интервал 0.35-100 кЕА/Л. Резултатот се изразува квантитативно, како ниво или како класа специфичен ИгЕ (Табела 18.2) .

Клиничката осетливост и специфичност е следна:

- осетливост: 89%;
- специфичност 91%.

16.4.2. UniCap специфичен ИгА

Што мери UniCap специфичен ИгА? UniCap специфичниот ИгА мери ИгА противтела специфични за противгени во серум и плазма. Специфичните ИгА противтела се дел од нормалната имунолошка одбрана на организмот. Присутни се во секрети како плунка, во слузници, како и во крвта. Нивото на специфични ИгА се зголемува кога имуниот систем одговара, на пример, на нутритивен алерген. Следните противгени се откриваат во ИгА системот: глијадин (AGf98), α-лакталбумин (AGf76), β-лакталбумин (AGf77) и казеин (AGf78).

Која е клиничката корист од тестот? Во серум, високи нивоа на специфични ИгА кон алергени од храната може да укажуваат на зголемена изложеност на вакви алергени поради оштетување на цревната слузница. Кај целијакија, на пример, нивоата на специфични ИгА противтела кон глијадин се значајни за дијагноза на болеста.

Какви вредности треба да се очекуваат? Кај здрави индивидуи, нивоата на специфични ИгА противтела кон различни противгени вариираат значајно во зависност од изложувањето. За да се одреди дали нивоата се зголемени, референтното ниво на специфично ИгА противтело мора да се мери на повеќе примероци од здрави индивидуи и, ако е можно, да се спореди со нивоата на ИгА кај болни индивидуи. Не постојат препорачани гранични вредности за специфични ИгА противтела бидејќи тие се обележувачи за изложеноста на противгени и не се директно поврзани со

болест. Резултатите варираат во однос на еден противген, како и помеѓу различни противгени. Географските варијации се исто така важни.

16.4.3. UniCap глијадин ИгА

Што мери UniCap глијадин ИгА? UniCap глијадин ИгА мери специфични ИгА противтела против глијадин во човечки серум и плазма. Глијадин е фракција на глутенот растворлива во алкохол, а која се сретнува во пченица, јачмен, рж и овес.

Која е клиничката корист од овој тест? Неподнесување на глијадин може да доведе до целијакија, која е ентеропатија со осетливост на храна што трае цел живот, а се карактеризира со оштетувања на слузницата на тенкото црево по земање на храна. Мерењето на ИгА и ИгГ кон глијадин е првиот чекор во испитувањето на пациентите суспектни за целијакија и во подобрувањето на лечењето на овие пациенти. Мерењето на ИгА против-глијадински противтела со UniCap глијадин ИгА е важно во неколку состојби.

- Во дијагноза:

  - како прв чекор во испитување на пациенти со симптоми на целијакија;

  - во откривање на асимптоматски болни од целијакија и болни со ризик за развивање на придружни болести на целијакија;

  - како додаток за биопсија за дијагноза на целијакија.

- Во следење на лечењето:

А. Диета без глутен:

  - да се процени времето за кое ќе се постигне ремисија по диетата (тоа е различно кај различни луѓе);

  - како повторен резултат за следење на болеста.

  Ниска концентрација на ИгА противтела по елиминирање на глутенот укажува на можна ремисија и често добро корелира со симптомите.

Б. Изложување на глутен:

  - да се покаже релапс на болеста, нормално за неколку недели до неколку месеци по изложувањето (различно кај различни луѓе).

  Нивото на против-глијадински противтела брзо се зголемува како одговор на примање на глутен и се користи за следење на пациентот за време на изложувањето.

Какви вредности треба да се очекуваат? Кај 192 здрави субјекти, на возраст од 2-74 години се покажаа 95-ти перцентил од 3.5 мг/Л.

16.4.4. UniCap специфичен ИгГ

Што мери UniCap специфичен ИгГ? UniCap специфичен ИгГ мери противген-специфични ИгГ противтела во човечки серум или плазма. Овие противтела се дел од природната одбрана на организмот и се создаваат во крвта како одговор на допир со туѓи супстанции. Кај автоимуни болести противтелата се насочени кон сопствени противгени (автопротивгени).

Која е клиничката корист од тестот? Создавањето на ИгГ противтелата е дел од комплексни настани со кои организмот се обидува да го инактивира и уништи или да го отстрани противгенот. Така присуството на ИгГ противтела специфични за некој противген е сигурен показател за изложеност на тој противген. Нивото на ИгГ противтела обично укажува на интензитетот на изложувањето.

Со мерење на специфичните ИгГ противтела се обезбедуваат вредни клинички информации во повеќе полиња.

Алергиски болести

Кај алергиски болести, специфичните ИгГ се користат:

- во клинички студии на астма, ринитис, уртикарија, екзем и гастроинтестинални пореметувања;

- како обележувач за изложеност кај различни болести на белите дробови; на пр. алергиски алвеолитис, аспергилом и аспергилоза.

Алергија на храна

Противген специфични ИгГ противтела се мерени кај пациенти сомнителни за алергија на храна:

- присуството на ИгГ противтела е знак за изложеност;

- нивото на специфични ИгГ противтела е од дијагностичка важност за одредени нутритивни противгени, како глијадин.

Имунотерапија

Во следење на имунотерапија со инхалирачки алергени и отров од тврдокрилци, зголемените нивоа на специфични ИгГ:

- покажуваат генерална (но не дефинитивна) поврзаност со клиничкиот исход;

- покажуваат дека имуниот систем одговара на терапијата.

Автоимунитет

Зголемени нивоа на специфични ИгГ противтела кон противгени како тироидна пероксидаза и тироглобулин може:

- да укажат дека пациентот страда од автоимуна болест;

- помогнат во дијагнозата на болеста.

Какви вредности треба да се очекуваат? Нивото на специфични ИгГ противтела кај здрави лица кон различни противгени може да варира значително, зависно од изложеноста. За да се одреди дали нивоата се зголемени мора да се измерат референтни вредности за ИгГ на повеќе примероци на серум од здрави лица и тие да се споредат со нивоата на ИгГ на болните.

Не постои гранична вредност за специфични ИгГ противтела, бидејќи тие се обележувачи за изложеност на протиген и не се директно поврзани со болест. Резултатите варираат за еден противген и помеѓу различни противгени. Географските разлики се исто така важни.

16.4.5. UniCap глијадин ИгГ

Што мери UniCap глијадин ИгГ? UniCap глијадин ИгГ мери специфични ИгГ противтела против глијадин во човечки серум и плазма. Глијадин е фракција на глутенот растворлива во алкохол, а која се сретнува во пченица, јачмен, рж и овес.

Која е клиничката корист од овој тест? Неподнесување на глијадин може да доведе до целијакија, која е ентеропатија со осетливост на храна што трае цел живот, а се карактеризира со оштетувања на слузницата на тенкото црево по земање на храна. Мерењето на ИгА и ИгГ кон глијадин е првиот чекор во испитувањето на пациентите суспектни за целијакија и во подобрувањето на лечењето на овие пациенти. Овој тест овозможува селективен скрининг на сомнителните и ризичните групи за целијакија.

Какви вредности треба да се очекуваат? Кај 192 здрави субјекта, на возраст од 2-74 години се покажаа 95-ти перцентил од 3.5 мг/Л.

16.4.6. UniCap еозинофилен катјонски протеин (ЕКП)

Што мери UniCap ЕКП? UniCap ЕКП го мери нивото на еозинофилни катјонски протеини (ЕКП) во серум. ЕКП е силно цитотоксичен протеин кој го има во еозинофилните гранули. Еозинофилите се клетки, главно одговорни за предизвикувањето воспаление карактеристично за астма. Кога еозинофилите во дишните патишта се активираат , тие се обеззрнуваат (дегранулираат) и предизвикуваат оштетување и одлупување на дишниот епител. Ова може да ја зголеми преосетливоста и да доведе до хронична воспалителна болест на дишните патишта. ЕКП се ослободува од активираните еозинофили за време на воспалителниот процес.

Која е клиничката корист од овој тест? Астматичните пациенти со еозинофилско воспаление имаат зголемени

нивоа на ЕКП во серум и други телесни течности како бронхијален и алвеоларен секрет и плунка. Количината на ЕКП во серумот е објективна мерка за еозинофилскиот воспалителен статус кај астмата. Високо ниво на ЕКП укажува на воспаление, што е ризик фактор за астма.

Мерењето на ЕКП во серум може да се користи:

- за следење на воспалението кај астма;

- за водење на лечењето со кортикостероиди кај астма;

Какви вредности треба да се очекуваат? Кај нормални возрасни се измерени вредности со геометриска средина од 4.4 мкг/Л и 95-ти перцентил од 11.3мкг/Л. Вредности над 15 мкг/Л треба да се сметаат за зголемени. Сепак, пациентите треба да бидат своја контрола во следењето на лекувањето.

16.4.7. UniCap триптаза

Што мери UniCap триптаза? UniCap триптаза мери ниво на триптаза ослободена од мастоцитите во серум. Мастоцитите имаат клучна улога во алергиските реакции и нивниот број се зголемува во услови на воспаление. Кога се активирани, тие ослободуваат различни медијатори кои водат до симптоми на алергиски реакции, како анафилакса. Овие медијатори вклучуваат триптаза и хистамин.

Која е клиничката корист од тестот? Триптазата се ослободува во циркулацијата откако кај пациентот се случи анафилактичка реакција предизвикана од лекови, отрови од инсекти и храна. Ова зголемување на количината на триптаза може да помогне во испитувањето степенот на реакцијата.

UniCap триптаза мерењето на примероци од серум од здрави индивидуи и примероци од серум од пациенти со анафилакса, покажа јасно разделување на две групи. Зголемени нивоа на триптаза укажуваат на:

- анафилакса што се должи на лекови, убод од инсекти или храна;

- мастоцитоза.

Нивото (или концентрацијата) на триптаза се зголемува и во назалните течности кај:

- активен алергиски ринитис;

- изложување на алерген кај пациенти со алергиски ринитис.

Какви вредности треба да се очекуваат? Кај нормални лица на возраст од 2-74 години се измерени вредности со геометриска средина од 5.6 мкг/Л и 95-ти перцентил од 13.5 мкг/Л. Зголемено ниво на триптаза обично може да се измери во време 3-6 часа по анафилактичка реакција. Тоа се враќа на нормала 12-14 часа по ослободувањето.

Примероците е најдобро да се собираат помеѓу 15 минути и 3 часа по настанот за кој се мисли дека ќе предизвика активација на мастоцитите.

16.5. Задачи

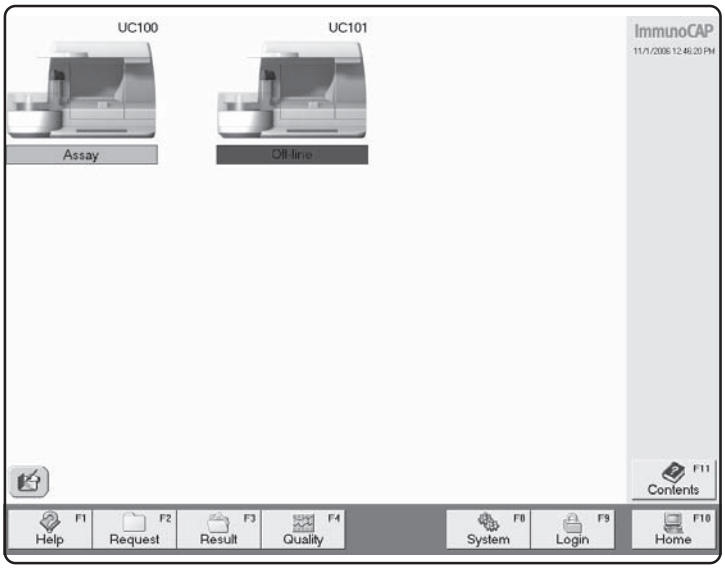
16.5.1. Одреди вкупен и специфичен ИгЕ во серум

УниКап (UniCap) е автоматизиран лабораториски систем кој од примерок на крв обезбедува квантитативни резултати за концентрацијата на специфични и вкупни ИгЕ



Слика 16.2: УниКап-100 (UniCap-100) автоматизиран лабораториски систем на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје.

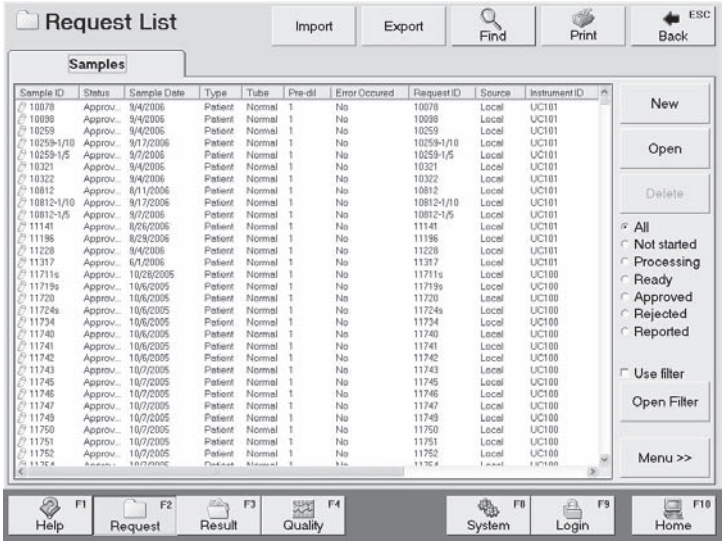
противтела. Квалитетната информација добиена на овој начин помага во дијагностицирањето и донесувањето на одлуки во лекувањето на алергиските болести (Слика 16.2).



Слика 16.3: Почетниот екран за вклучување на апаратот УниКап-100 (UniCap-100).

Прво се вклучува компјутерот, а веднаш потоа апаратот. Со двојно кликнување на иконата ImmnunoCAP Information Data Manager се влегува во програмата (софтвер) преку која се поврзани апаратот и компјутерот.

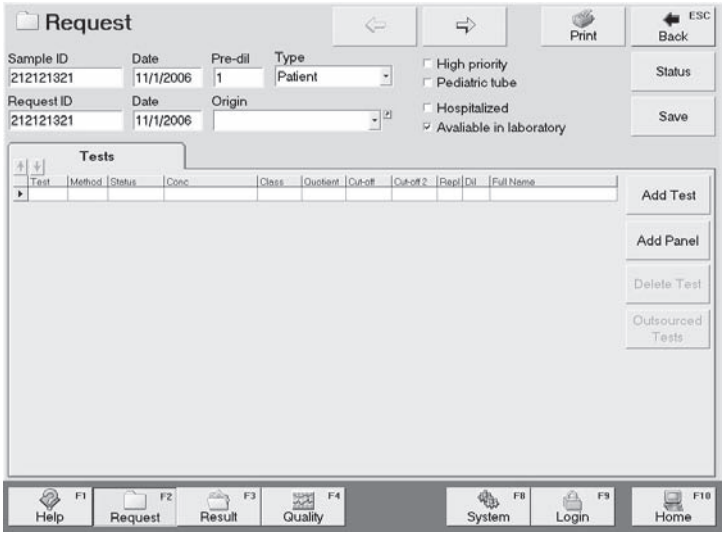
Откога ќе се вклучи прогармата на екранот со слика се прикажани двата апарата (UniCap 100 и UniCap 101), а под нив на долниот дел се гледаат икони преку кои се контролира работата. Веднаш под сликата на апаратот може да се види дали апаратот е вклучен (во тој случај има жолто светло и пишува “free”-слободно), исклучен (црвено светло и пишува “off-line”) или ако работи имаме зелено светло и пишува “assay” (Слика 16.3). Кога ќе видиме дека апаратот ја постигнал потребната температура и се поврзал со компјутерот (тоа се гледа со жолта боја на екранот или на екранот од самиот апарат пишува: prepare run? (подготви се за работа)), кликнуваме еднаш на иконата на долниот дел од екранот на која пишува “reqest” (барање) или притискаме



Слика 16.4: Екранот за внесување примероци на апаратот УниКап-100 (UniCap-100).

Ф2. Тогаш, ни се прикажуваат сите пациенти кои дотогаш се изработени. Од десната страна на екранот има 3 икони преку кои се внесуваат нови пациенти (иконата со ознака “new”), се отвараат веќе изработените (икона – “open“) или се бришат некои податоци (икона – “delete”) (Слика 16.4).

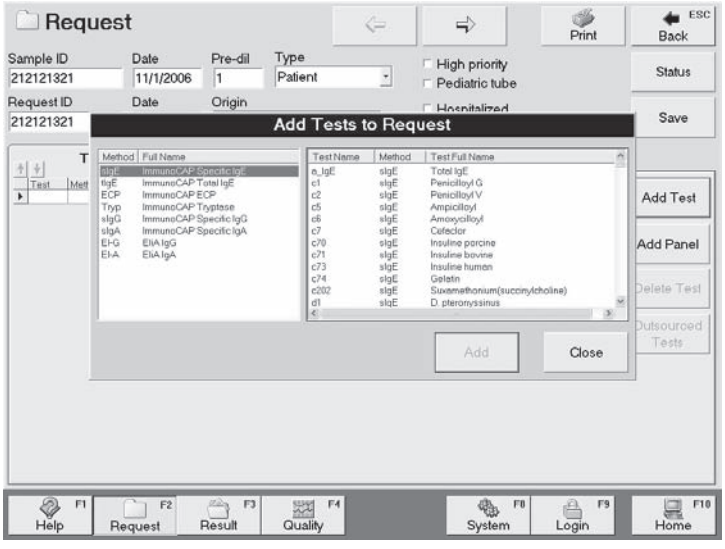
Под нив има наредби со чие селектирање може да се видат сите изработени пациенти, оние кои не се почнати да се работат, оние кои во моментот се работат и податоците или резултатите кои сме го одобриле или одбиле. Со клик на првата икона (“new”) влегуваме во програмата кадешто се внесува лабораторискиот број на пациентот и кадешто се бираат анализите кои треба да се изработат. Во квадратчето со ознака “Sample Id” се внесува лаборато-рискиот број на пациентот и се притиска “enter”. Сега од страната ни се активираат две икони од кои во првата ги има сите тестови кои се работат со овој апарат,а во втората се тестови кои се работат според дијагнозата на пациентот и тие се нарекуваат *панели*. Со клик на првата икона "add test" се покажува табела која е поделена на два дела и од левата страна се



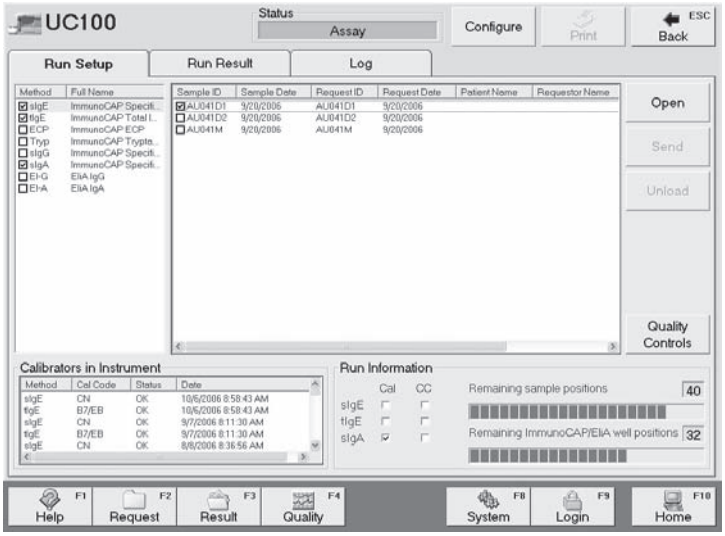
Слика 16.5: Екранот за внесување алергени (панели) на апаратот УниКап-100 (UniCap-100).

методите кои се работат на овој апарат. Методот се бира со негово означување и притискање на "enter". На десната страна се наоѓаат специфичните алергени кои се бираат на ист начин. Потоа се затвора табелата и се кликнува на иконата "save" за да се запаметат бараните податоци. На овој начин се внесуваат сите пациенти (Слика 16.5).

По внесувањето на пациентите и нивните анализи се враќаме со притискање на икона на која што пишува "back" на почетната страна (страната на која што има слика од апаратите). Потоа кликнуваме два пати на апаратот кој што сакаме да го пуштиме. Ни се отвараат две табели. На левата страна ги гледаме сите методи кои се работат со овој апарат и со кликнување на празните квадратчиња се бираат методите кои планираме да ги работиме (Слика 16.6). Со самото бирање на методот на десната страна ни се прикажуваат сите лабораториски броеви на внесените неизработени пациенти кои ги содржат бараните анализи. Откога ќе го одбереме методот и ќе ни се покажат на екранот пациентите кои треба да се работат почнуваме со



Слика 16.6: Екранот за избор на методите кои сакаме да ги работиме на апаратот УниКап-100 (UniCap-100).

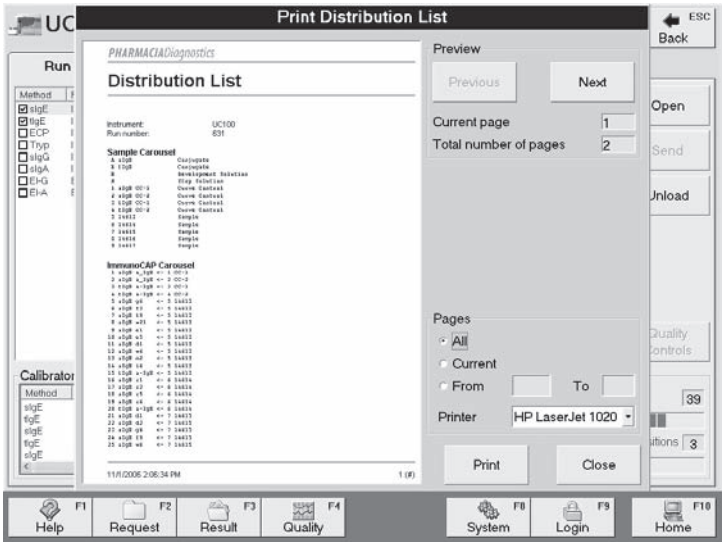


Слика 16.7: Екранот за избор на пациентите кои сакаме да ги работиме на апаратот Уни-Кап-100 (UniCap-100).

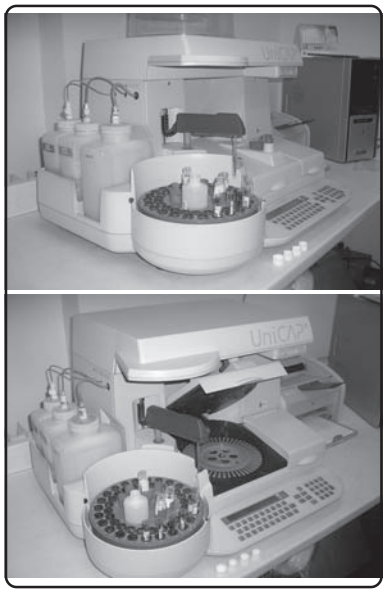
нивно селектирање на ист начин односно со кликнување на коцките пред лабораторискиот број.

На долниот дел од страната од лево се гледаат податоците за калибрациите, а од десната страна се гледа колку празни места има останато во апаратот. Вкупниот број на алергени кои може да се изработат со едно вклучување на апаратот е 44 (Слика 16.7). Откога ќе се наполни апаратот, односно ќе се внесат сите пациенти и бројот на анализи ќе достигне 44 се кликнува на иконата означена со "send" сошто започнува префрлувањето на податоците од компјутерот во апаратот. Апаратот штом ќе ги добие податоците ни дава листа на распределба (distribution list) од која може да се види позицијата на секој серум, реагенс и алерген (Слика 16.8). Откога ќе се префрлат податоците за анализите кои ќе се работат треба да се подготви апаратот за работа.

Апаратот е составен од два носача. Првиот надворешниот се вика носач на примероци, а вториот или внатрешниот е носачот на кој се редат алергените. Од страната на апаратот има три кантички кои се означени со различна боја (плава,



Слика 16.8: Листа на распределба (Distribution list) е на апаратот Уни-Кап100 (Uni-Cap-100).



Слика 16.9: Страничен поглед (горе) и местата за внесување примероци од серум, хемикалии и топченца (долу) на апаратот Уни-Кап100 (Uni-Cap-100).

Табела 16.3: Внесување резултати од UniCap-100.

Алергени	Резултати	Нормално
Полени, габи и мувли		
Храна		
Вкупни алергиски имуноглобулини		
Антибиотици		

зелена и жолта). Во плавата кантичка стои "wash solution" (раствор за перење). Овој раствор се приготвува од специфичен концентрат кој се раствара во 1000 мЛ дестилирана вода. Оваа кантичка мора да биде наполнета до врвот пред да се започне со работа. Во зелената кантичка има "rinse solution" (раствор за плакнење), а тоа е дестилирана вода која мора да ја наполниме пред да започнеме. На жолтата кантичка има ознака "waste" (отпадок) и оваа кантичка останува празна за да може апаратот во текот на работата да ги исфрла течностите во неа (Слика 16.9горе).

Сите стапки од понатамошниот процес се автоматизирани и од екранот на самиот апарат читаме што треба да се направи. Прво не прашува дали горе опишаните кантички се полни и правилно распоредени. Одговорот се врши со притискање на копчињата "yes" и "no" на тастатурата од самиот апарат. Потоа се внесуваат серумите на пациентите (има точно определена позиција за секој серум, а таа може да се види и од листата на распределба). Откога ќе се внесат серумите се стават веднаш до нив контролите на калибрационите криви (по две контроли за секоја крива) и тие се со ознака sKK-1 и sKK-2 за специфичните ИгЕ противтела и vKK-1 и vKK-2 за вкупните ИгЕ противтела.

Потоа се внесуваат реагенси кои ни се потребни: Коњугат за специфичен ИгЕ, кој стои секогаш на позиција А на надворешниот носач, а коњугатот за вкупен ИгЕ стои на позиција Б. При ставањето на коњугатите апаратот бара да се внесе специфичниот код од калибрацијата за тој месец.

Се внесува развоен раствор (development solution) на позиција Е и запирачки раствор (stop solution) на позиција Х. Откога ќе ги внесеме серумите и реагенсите апаратот започнува со една слепа проба којашто трае 2 мин, пришто тој ги проверува кантичките и дали се е ставено на правилното место. Потоа од екранот може да видиме кој алерген треба да се внесе. Алергените се редат на внатрешниот носач (Слика 16.9 долу). Во овој систем алергените се фиксирани на куглици кои се наредени во пенкала. Од надвор се поставува пенкалото, а апаратот сам ги зема и ги реди на точно определената позиција.

Добиените резултати се внуваат во формулар погоден за таа намена (Табела 16.3).

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

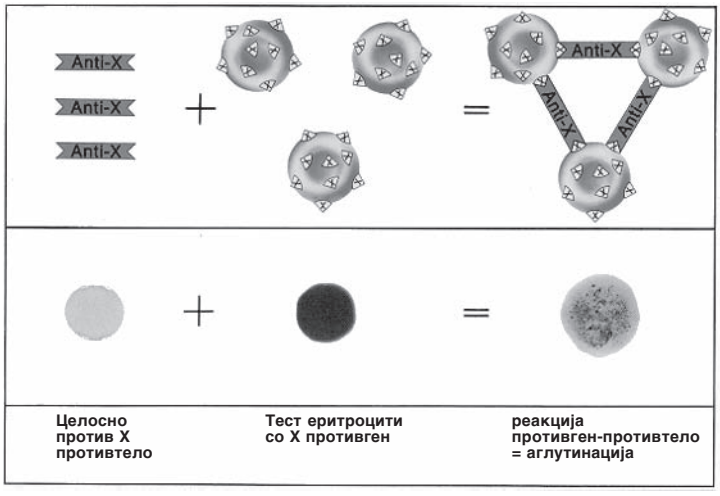
Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

ВЕЖБА 17: ТИП 2 И ТИП 3 ПРЕОСЕТЛИВОСТ

17.1. Аглутинација

Аглутинацијата претставува специфично фиксирање на специфични противтела за определени противгенски епитопи кои се наоѓаат на површината на некои хумани клетки, бактерии или вируси, при што доаѓа до нивно меѓусебно слепување и групирање. Овие групи на клетки се нарекуваат аглутинати, противтелата (антителата) кои учествуваат во овој процес се нарекуваат аглутинини; противгените се именувани како аглутиногени, а реакцијата како аглутинација. Оваа реакција најмногу се користи во крвногрупната имунохематологија, каде претставува основен тест, па како таква, низ реагирањето на еритроцитните противгени и противтела, ќе биде претставена. Учесници во реакцијата се противгени и противтела. Противгените се наоѓаат на клеточната мембрана и се основен фактор во реакцијата, предизвикуваат создавање противтела и претставуваат специфични рецептори во процесот на фиксација на противтелата (слика 17.1).



Слика 17.1: Шематски приказ на аглутинација на еритроцитите.

Притоа, важна е нивната густина на клеточната мембрана (квантитативно присуство), како и положбата во мембраната. Така на пр., противгенот А од крвногрупниот систем АВО, има 1.000.000 места на еритроцитната мембрана и за добивање реакција потребна е 2% еритроцитна суспензија, а за Д противгенот од Rh системот потребна е 40%, бидејќи тој е присутен со 10-30.000 места на мембраната. Или пак, противгенот А проминира над мембраната и противтелата лесно се фиксираат за него, додека Д противгенот е поставен подлабоко во мембраната и неопходно е нејзино ензимско третирање за да се овозможи контакт со противтелата.

Противтелата главно се од ИгМ класа, но може да бидат и од ИгГ класа. Според начинот на постанување може да бидат природни и имуни, при што природните се од ИгМ, а имуните пред сè, се од ИгГ класа. Природните противтела ги добиваме по раѓање во тек на првите 6 месеци, а имуните како одговор на ало или друга имунизација (иако во принцип сите противтела се имуни).

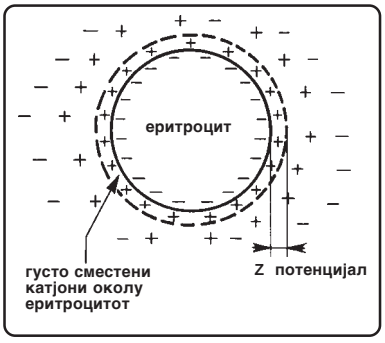
За да се добие аглутинација, неопходно е адекватно квантитативно присуство на противтелата. Така на пр., доволни се 25 молекули против А аглутинини од ИгМ класа, додека за против Д аглутининте, кои се од ИгГ класата, се потребни 20.000 молекули.

За да се одвива реакцијата, потребно е да се исполнат и други услови какви што се: температура, pH, јонски сили, инкубација, промешување и центрифугирање.

- постојат оптимални температурни граници во кои најдобро се фиксираат противтелата за противгените и одвивањето на аглутинацијата е погодно. Некои реакции се одвиваат најдобро на 4°Ц или на собна температура од 18°Ц до 22°Ц, тоа се студени противтела (како на пр. од АВО системот); односно на 37°Ц т.н. топли противтела (како што се на пр. од Rh системот).
- За аглутинација погоден pH е од 6.9 до 7.2. Доколку pH е над 8 или под 6, неопходно е да се пуферира зашто евидентно ја намалува сензибилноста на реакцијата.
- Намалувањето на јонските сили доведува до зголемување на фиксацијата на противтелата за епитопите и до лажни реакции, односно до автоаглутинација. Затоа, неопходно е реакцијата да се извршува во солена средина и со прецизно определена концентрација на еритроцитите како противгенски супстрат.
- Кај природните аглутинини реакцијата е брза и често нема потреба од инкубационен период. Но, кај иреgуларните инкомплетни противтела, таа е потребна и се одвива во временски интервал од 15 до 60 мин зависно од условите што ги бараат соодветните епитопи и нивните специфични противтела.
- Честопати е потребно промешување и центрифугирање 1 до 2 мин на 500 г за да се подобри фиксацијата на противтелата.

17.1.1. Објаснување механизмот на аглутинација

Повеќе теории го објаснуваат овој механизам. Теоријата на Marrak објаснува дека противтелата поврзувајќи ги меѓусебно еритроцитите формираат мостови и тридимензионална слика на аглутинирање на овие клетки. Теоријата на Bordet зборува дека меѓу клетките постојат сили на кохезија и репулзија кои ги одржуваат раздвоени, но кога под дејство на противтелата тие ќе се нарушат, тогаш настапува аглутинација. Меѓутоа, најприфатливо е објаснувањето на Pollack кој говори за постоењето на зета потенцијал околу еритроцитите. Всушност, зета потенцијалот претставува разлика меѓу потенцијалот на катјонскиот прстен околу еритроцитот и јонскиот набој на околината (Слика 17.2). Нормална вредност за зета потенцијалот е -16 мВ, а ако падне под-7 мВ ќе се јави лажна аглутинација. Аглутинацијата не е можна над -23 мВ . Аглутинините од ИгМ класа најдобро реагираат на -18 до -23 мВ, а ИгГ од -8 до -10 мВ.



Слика 17.2: Еритроцит во неутрална средина обиколен со катјонски прстен.

Аглутинацијата може да биде директна кога аглутинините од серумот делуваат директно врз епитопите од еритроцитната мембрана или артефициелна кога се потребни додатни реагенси за промена на зета потенцијалот (протеолитички ензими-трипсин, папин, бромелин; макромолекуларни супстанции - албумин, плазмагел, декстран, фикол; противглобулински серум) за да се овозможи фиксирање на противтелата за противгените. Инаку, треба да се истакне дека аглутинацијата е реверзибилен процес. При промена на условите, на пр. температурата (со 10 мин загревање на 56°Ц се раздвојуваат аглутинатите, се дефиксираат противтелата од противгените,односно се елуираат - процес на елуција) се добива состојба иста како пред почетокот на реакцијата.

17.2. Директен противглобулински тест (ДПТ)

Директниот противглобулински тест ни служи за откривање противтела кои се врзани за клетките, но кои не можат да извршат нивна аглутинација (некомплетни противтела).

Противхуманиот глобулин (противглобулински серум) ги аглутинира еритроцитите кои се обложени со соодветните глобулини. Во зависност од специфичноста на противглобулинскиот серум, може понатаму да се докажува и специфичноста на овие глобулини (на пр. дали се против ИгГ, против ИгМ, против ИгА, против Ц3д или против Ц3ц противтела). Активацијата на комплементот ин витро, од страна на присутните ладни автоантитела, се спречува со употребата на ЕДТА или натриум цитрат. Со повеќекратно

миење на еритроцитите се отстрануваат расворливите или неспецифично врзаните глобулини за нив. На тој начин се овозможува откривање на имуноглобулините или факторите на комплементот кои се специфично врзани за еритроцитите ин виво.

17.2.1. Земање примерок

Крвта за директниот противглобулински тест најдобро е да се земе со противкоагуланс ЕДТА (0.01М) за да може да се инактивира комплементот, со што би се спречила ин витро сензибилизацијата на еритроцитите со клинички незначајни ладни противтела (на пр. некомплетни ладни противтела кои нормално ги има во крвта). На тој начин би се спречило добивање на лажно-позитивни резултати. Еритроцитите од примерокот крв земен со ЕДТА или цитрат, најпрвин се мијат 6 пати со физиолошки раствор или со фосфатен пуфер. Откога ќе се исплакнат 6 пати, од нив се приготвува 2-3% суспензија.

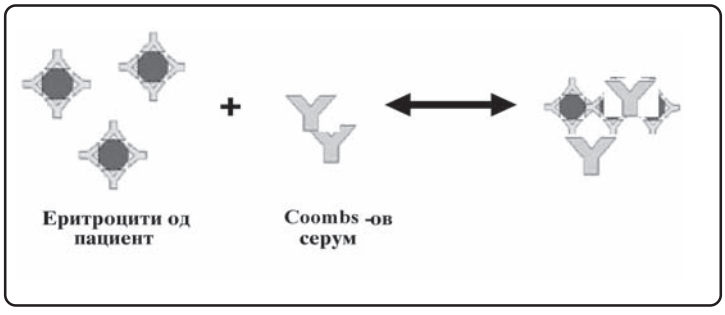
Доколку се добие позитивен резултат со употребата на еритроцити кои се издвоени од коагулиран или од примерок земен со некој друг противкоагуланс, а кој што примерок стоел на собна температура или во фрижидер, тогаш ДПТ треба да се повтори со примерок земен со ЕДТА.

17.2.2. Материјал

Суспензија на еритроцити од примерок на крв (2-3%), најмалку два полиспецифични противглобулински серуми (кои содржат најмалку против-ИгГ и против-Ц3д), моноспецифични противглобулински серуми (најмалку два, против ИгГ и против Ц3д), АБ серум, епруветки или предметни стакла, центрифуга, микроскоп и јак извор на светло.

17.2.3. Метод

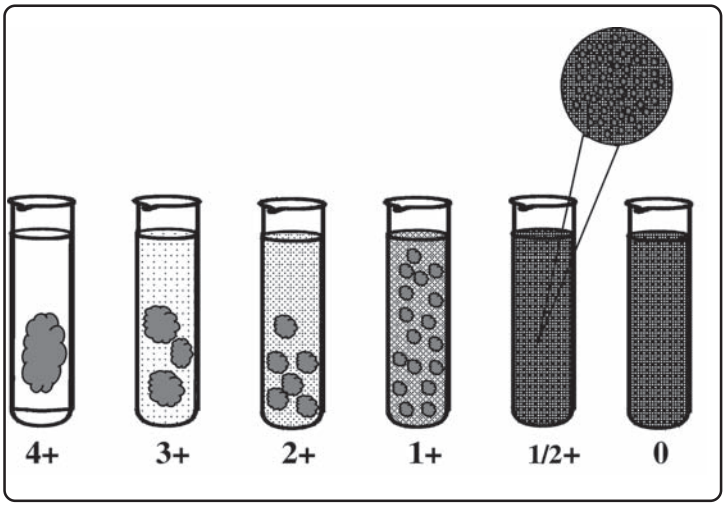
Тест за просејување (скрининг тест). Директниот противглобулински тест се изведува со употреба на најмалку два полиспецифични противглобулински серуми. Во



Слика 17.3: Директен противглобулински тест.

обележаните епруветиедна капка (1 капка одговара на приближно 50 μЛ) од полиспецифичниот противглобулински серум се меша со една капка од еритроцитната суспензија. Потоа епруветката се инкубира 15 минути на собна температура. По инкубацијата, епруветката се центрифугира 15-30 секунди на 1000 ввм (120g). Резултатот се чита, со лесно протресување на епруветата, наспроти извор на светлина. Начинот на кој талогот од еритроцити ќе се ресуспендира е пресуден за резултатот на тестот. Епруветата се накосува и внимателно се меша. Потоа со лесни движења напред-назад се набљудува содржината на епруветата наспроти извор на светлина (дали има аглутинати) (Слика 17.3). Доколку резултатот е негативен се зема една капка од епруветата и се набљудува под микроскоп.

Второто читање се изведува после повторно инкубирање во времетраење од 1 час на собна температура и повторно центрифугирање на 1000 ввм (120g) 15-30 секунди. Ова е неопходно бидејќи сензитивноста на противглобулинскиот тест, особено за откривање на Ц3, значително се зголемува со инкубацијата.



Слика 17.4: Јачина на аглутинација искажана во вид на поени.

Јачината на аглутинацијата се искажува во вид на поени (Слика 17.4):

4+ присуство на еден солиден аглутинат, без прису-тни слободни клетки
3+ неколку големи аглутинати и присуство на мал број слободни клетки
2+ присуство на средно големи агрегати со слободни клетки во заднината
1+ присуство на мали агрегати на матно црвена заднина
$\frac{1}{2}$+ нежни аггрегати на матно црвена задина или агре-гати видливи под микроскоп
0 нема аглутинација

Диференцирање. Најдобро е ДПТ првин да се изведе со

полиспецифичен серум кој содржи противтела со најмалнку две специфичности (против-ИгГ и против-Ц3). Доколку се добие позитивен противглобулински тест, понатаму треба да се одреди типот (специфичноста) на противтелото или противтелата со употребата на моноспецифични против-глобулински серуми.

Контроли. Во принцип, секогаш кога се работи против-глобулинскиот тест, истовремено треба да се направат и позитивна, негативна и авто-контрола.

Како ***позитивна контрола*** се користат тест клетки на кои има врзно противтела (на пр. Coombs-ови контролни клетки). Овие клетки или се мешаат со полиспецифичниот против-глобулински серум и/или против-ИгГ серумот со кој се изведува противглобулинскиот тест или се додаваат во епруветите во кои е добиен негативен ДПТ. Доколку дојде до појава на аглутинација тоа значи дека ДПТ е навистина негативен. Ако и по додавањето на сензиби-лизирани клетки не дојде до појава на аглутинација, значи дека или има гршка во процесот на работа или против-глобулинскиот серум е со лош квалитет. Најдобро е како позитивна контрола да се користат клетки обложени со Ц3. Тие би се додавале во епруветите во кои е добиен негативен ДПТ со употреба на моноспецифичен противглобулински серум (кој содржи само против-Ц3 противтела). Појавата на аглутинација при повторното центрифугирање ни укажува на фактот дека не дошло до инхибиција на против-глобулинскиот серум со ИгГ и/или Ц3 како резултат на несоодветното миење на еритроцитите на пациентот.

Како ***негативна контрола*** најчесто се користат тест клетки кои не се обложени со противтела. Во случај да не располагаме со вакви тест клетки, негативната контрола може да се изведе и со додавање на 1% говедски серумски албумин или растворувач за противглобулинскиот серум на измиените еритроцити од пациентот. Во негативната контрола не смее да дојде до појава на аглутинација.

Авто-контролата се изведува со мешање на еритроцитите од пациентот со АБ контролен серум.

17.2.4. Забелешки

- Со продолжената инкубација може значително да се зголеми откривањето на компонентите на комплементот кои се врзани за еритроцитите.
- Едно миење на еритроцитите со нормален физиолошки раствор (вклучувајќи и центрифугирање на 2000 ввм за време од 2 минути) после второто читање може да ја засили реакцијата, со што би се спречила појавата на прозон феноменот.
- Употребата на фосфатен пуфер за плакнење (pH 7.0), ЕДТА и говедски серумски албумин ја спречуваат

елуцијата на лабаво врзаните противтела, како и неспецифичното активирање на комплементот.

- Подобро е тестот да се извршува во епрувети отколку на предметни стакла, бидејќи предметните стакла неможат да се центрифугираат.
- Несоодветното плакнење, како и високата концентрација на имуноглобулини во серумот на пациентот, може неповолно да влијаат на тестот.

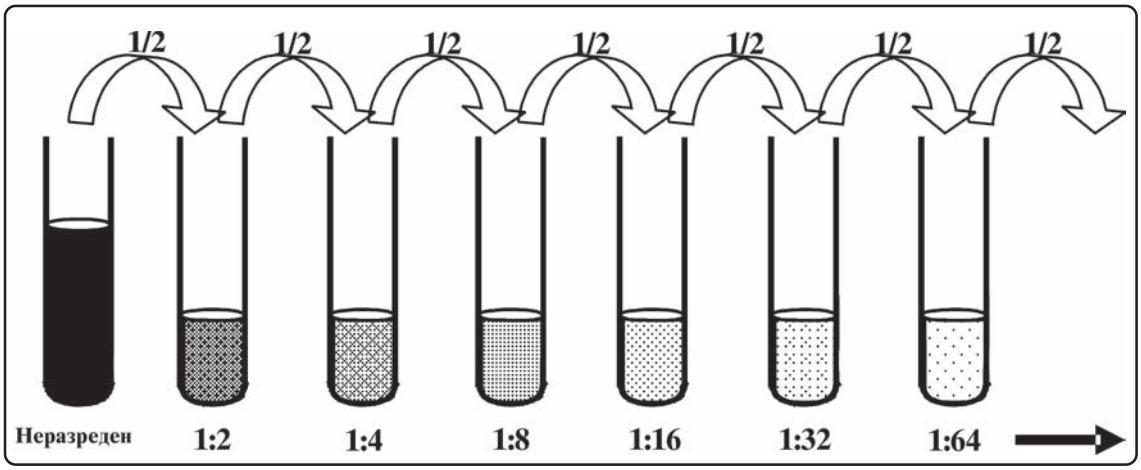
17.2.5. Титар кај антиглобулинските тестови

За да може да се суди за јачината на аглутинацијата настаната помеѓу обложените еритроцити и моноспецифичниот противглобулинскиот серум, корисно е најпрвин да се одреди неговиот титар. Одредувањето на титарот пожелно е да се направи и на комерцијално достапните против-ИгГ и против-Ц3 моноспецифични противглобулински серуми. Откога ќе се одреди титарот, секоја од аглутинациите кои ќе се добијат од различните разредувања на моноспецифичниот против-глобулински серум ќе ни послужи за создавање скала на поени, преку која понатаму ќе се изразува јачината на аглутинацијата. Со ваков начин на изразување е овозможена многу попрецизна проценка на јачината на аглутинацијата, одколку кога би проценувале само врз основа на едно разредување на противглобулинскиот серум. Но, со оглед на фактот дека изработката на една ваква скала е произволна и зависи од противглобулинскиот серум кој го употребуваме, нејзината важност е ограничена само на лабораторијата која и ја изработила.

Потребни материјали: 2-5% суспензија на еритроцити приготвени од крв земена од пациент, моноспецифичен Coombs-ов серум (против-ИгГ, против-Ц3ц, против-Ц3д, противтела кон лесната верига), епрувети, центрифуга, раствор за миење еритроцити (физиолошки раствор, фосфатен пуфер), извор на светло, микроскоп.

Метод:

1. Се приготвува серија на двојно разредување на противглобулинскиот серум во физиолошки раствор. Се земаат 12 епрувети и се обележуваат на следниот начин: НР (неразреден), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, К (контрола). Количината на противглобулински серум која ќе ја ставиме во првата епрувета зависи од тоа колку често се изведува противглобулинскиот тест. Доколку тој се изведува многу често, тогаш таа количина може да биде и 10 мЛ. Во останатите епрувети, освен во епруветата обележана со К, се стават по 5 мЛ физиолошки раствор. Потоа половина од содржината од првата епрувета се префрла во втората епрувета, од втората епрувета половина од содржината се префрла во третата епрувета, од третата



Слика 17.5: Припрема на епруветите за одредување титарот на противглобулинскиот серум

.

во четвртата, се до епруветата обележана со 1:1024. Половина од содржината на епруветата обележана со 1:1024 се фрла. Вака припремените епрувети се чуваат на $+4^0$Ц (Слика 17.5).

2. Се земаат 11 нови епрувети и се обележуваат од НР до 1:512. Во секоја од нив се става по една капка 2-5% еритроцитна суспензија приготвена од примерок земен од пациент. Позитивен резултат ретко се добива во разредувањата поголеми од 1:512, но доколку е тоа потребно можат да се приготват и разредувања поголеми од 1:1024.

3. Епруветите се мијат 4 пати со изотоничен физиолошки раствор. По последното миење епруветите комплетно се декантираат за да на дното остане само талог од еритроцити.

4. Во секоја од епруветите се додава по 2 капки од соодветните разредувања на противглобулинскиот серум.

5. Епруветите се мешаат и се центрифугираат 1.000 до 1.500 ввв 15-20 секунди.

6. Се набљудува аглутинацијата на ист начин како и кај директниот противглобулински тест.

7. Различните јачини на аглутинации кои се јавуваат во епруветите се обележуваат со поени. Така аглутинацијата 4+ одговара на 10, 3+ одговара на 8, 2+ одговара на 6, 1+ на 4, $\frac{1}{2}$+ на 2, а 0 значи дека нема аглутинација (Табела 17.1).

Табела 17.1: Пример за титар на ДАТ.

Разредување	**Степен на аглутинација за**	
	против-ИгГ	против-Ц3
неразреден	4+	4+
1:2	4+	3+
1:4	4+	3+
1:8	3+	2+
1:16	2+	1+
1:32	1+	0
1:64	0	0
Контрола	0	0

17.3. Индиректен противглобулински тест

Додека со директниот противглобулински тест можат да се откријат ин виво врзаните глобулини за еритроцитите со помош на аглутинацијата со противглобулинскиот серум, индиректниот противглобулински тест ни служи за откривање на противтела кои слободно циркулираат во серумот и кои можат специфично да се врзат за еритроцитите ин витро. Општо кажано, полиспецифичниот противглобулински серум се употребува за да се откријат ин витро врзаните противтела (ИгГ, ИгМ), било да се врзани директно за клетките било преку нивното активирање на комплементот. Со употребата на регенси кои содржат противтела со точно определена специфичност, на пример тест серуми, индиректниот противглобулински тест ни овозможува и специфично и сензитивно тестирање на противгените.

17.3.1. Потребни материјали

Испитуван серум, полиспецифичен Coombs-ов серум (против-ИгГ, против-Ц3ц, протиц-Ц3д, противтела кон лесната верига), центрифуга, раствор за миење еритроцити (физиолошки раствор, фосфатен пуфер), Coombs-ови контролни клетки, О тест еритроцити, епрувети.

17.3.2. Метод

Во обележена епрувета се капнуваат 2-4 капки од серумот на пациентот (во кој се испитува дали постојат слободни противтела) и 1-2 капки од претходно припремените тест О еритроцити (3-5% суспензија направена со мешање 7 О Rh+ и 3 О Rh- примероци на крв од здрави крводарители, перени 6 пати со физиолошки раствор или фосфатен пуфер). По инкубацијата од 45 минути на 37°Ц еритроцитите се перат 3 пати со физиолошки раствор или фосфатен пуфер. Се мијат на тој начин што најпрвин се додава 3 мЛ од физиолошкиот раствор или фосфатниот пуфер, потоа внимателно се ресуспендираат и на крајот се центрифугираат на 1500-2000 ввм во тек на 1 минута. По секое центрифугирање супернатанот комплетно се отстранува со аспирација или со декантирање. По третото плакнење во епруветката се додаваат 1-2 капки од противглобулинскиот серум и се центрифугира 15-30 секунди на 1000 ввм. Резултатот внимателно се чита наспроти извор на светлина (Слика 13).

Доколку тестот е негативен се зема една капка и се

набљудува под микроскоп. Потоа се изведува позитивна контрола со употреба на Coombs-ови тест клетки. Доколку се додаде 1 капка на силно обложени еритроцити (на нивната површина има врзано огромен број на ИгГ и Ц3д) тогаш тестот треба да стане позитивен (да се појави видлива аглутинација) во рок од 5 минути без центрифугирање. Доколку се употребат слабо обложени клетки (за својата површина имаат врзано не толку голем број на ИгГ и Ц3д) тогаш е потребно епруветата да се центрифугира 15 секунди на 1000 ввм.

И кај индиректниот противглобулински тест, како и кај директниот, паралелно се изведуваат и негативна и авто-контрола.

17.3.3. Забелешки

Фактори кои можат позитивно да влијаат на тестот: оптимална температура на средината, оптимална pH (главно помеѓу 6.50-7.0), голем број на противгени на една клетка (висока густина на противгенот), помал број на клетки, поголема количина на серум и/или поголема концентрација на противтела, внимателно и потполно мешање на епруветките во кои се изведува тестот.

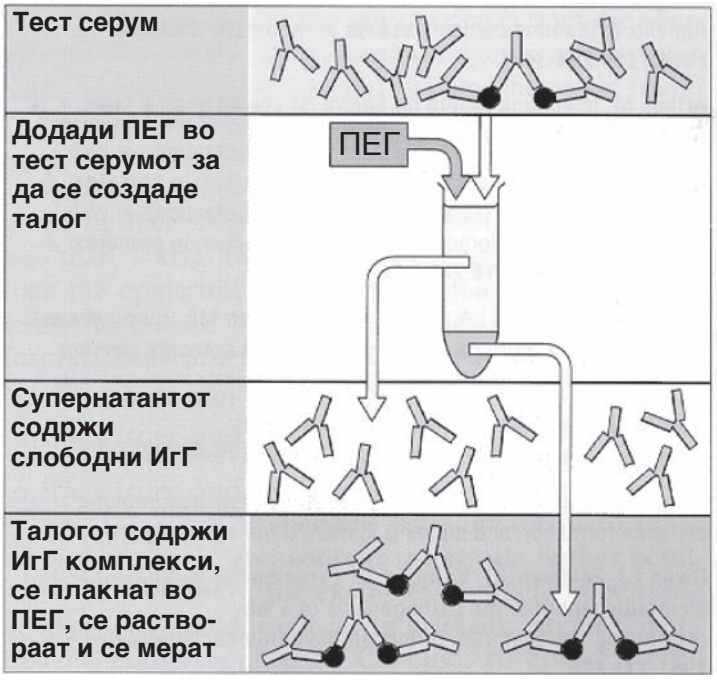
Фактори кои можат негативно да влијаат на тестот: распаднат противген, стари тест клетки, прекратко или предолго време на инкубација (оптимално помеѓу 30-60 минути),

Тестирање на противтела: Вообичаено сообносот помеѓу суспензијата на еритроцити и серумот треба да биде 1:2-3 (вишок на противтела) а времето на инкубација треба да е подолго и да се движи помеѓу 30 и 120 минути.

ИгМ и слабо врзаните комплемент активирачки противтела со индиректниот противглобулински тест се откриваат главно преку откривање на комплементот (ИгМ и преку против-телата кон лесната верига). Поради тоа попрепорачливо е, барем кога се бара присуство на противтела кај пациенти, да се употребува серум наместо плазма.

17.4. Определување циркулирачки имуни комплекси со преципитација со полиетиленгликол

Ова е наједноставен и лесно применлив метод кој во суштина претставува додавање 4.166% раствор на полиетилен гликол (ПЕГ) во серумската проба која содржи имуни комплекси и доведува до зголемување на оптичката густина над некоја гранична вредност (Слика 17.6). Потребен е след-



Слика 17.6: Во серумот што содржи комплекси од ИгГ и ИгГ мономер се додава ПЕГ за да се добие крајна концентрација од 2% ПЕГ. При оваа концентрација комплексите селективно се таложат, а супернатантот содржи слободни противтела. Епруветката се центрифугира и комплексите паѓаат на дното. Слободните противтела се отстрануваат со плакнење, а талогот се раствора и комплексните ИгГ се мерат квантитативно со нефелометрија.

ниов материјал и опрема: H_3BO_4, $Na_2B_4O_7$ * 10 H_2O, ПЕГ со молекулска маса 6.000, $(NH_4)SO_4$, $BaCl_2$, спектрофотометар, латекс за определување ревматоиден фактор, 0.1 мол/Л боратен пуфер pH 8.4 (раствор А 1.24% H_3BO_4 во дестилирана вода, раствор Б 1.9% $Na_2B_4O_7$ * 10 H_2O во дестилирана вода. Се мешаат 55 мЛ од раствор А, 45 мЛ раствор Б и 100 мЛ дестилирана вода, pH 8.4), раствор на ПЕГ (се раствораат 10 г ПЕГ во 240 мЛ боратен пуфер), разредувања од латекс (од основното разредување 1:40 во боратен пуфер, се прават разредувања 1:640 и 1:1280), раствори за стандардно отчитување апсорбција на 450 нм (1. се мешаат 2 мЛ 0.025 мол/Л $(NH_4)SO_4$ и 0.01 мЛ 0.025 mol/L $BaCl_2$ - отчитаната екстинција * 1.000 = 12.4 = 1.8; 2. се мешаат 2 мЛ 0.025 мол/Л $(NH_4)_2SO_4$ со 0.02 мЛ 0.025 мол/Л $BaCl_2$ - отчитаната екстинција * 1.000 = 23.8 = 4.7; 3. се мешаат 2 мЛ 0.025 мол/Л $(NH_4)_2SO_4$ со 0.03 мЛ 0.025 мол/Л $BaCl_2$ - отчитаната екстинција * 1.000 = 35.4 = 5.5).

Изведување на тестот: Се земаат 0.3 мЛ од испитуваниот серум и се мешаат со 0.6 мЛ боратен пуфер. Во две епруветки се смешуваат по 2 мЛ раствор на ПЕГ и по 0.22 мЛ од разредувањето на испитаниот серум. Се приготвува "слепа проба" со мешање 2 мЛ боратен пуфер и 0.22 од разредениот серум. Епруветките добро се мешаат и се остават на собна температура еден час. Се мери апсорпцијата на двете епруветки на 450 нм на-спроти "слепата проба".

Прикажување и толкување на резултатите: Се пресметува средната аритметичка големина од апсорбанцијата на двете епруветки и се множи со 1.000 за да се добие резултат изразен во меѓународни единици (МЕ). Нормална вредност за луѓе изнесува 12.1 - 7.4 МЕ. Спектрофотометарот се проверува со помош на приготвените стандардни раствори.

Треба да се добијат веќе прикажаните вредности. Погруба проверка може да се направи со латексни проби (со разредувањето 1:640 треба да се добијат позитивни вредности, а со разредувањето 1:1280 да се добијат негативни). Недостаток на методот е што не се таложат имуните комплекси со мала големина.

Погоден е методот кој користи консумација на C1q компонентата на комплементот. Со помош на ензим или изотоп, се маркира C1q кој потоа од имуните комплекси е искористен. Количината на консумираниот C1q (се мери во серумот пред и по реакцијата) претставува вредност за имуните комплекси.

17.5. Задача

1. Да се направи директен и индиректен противглобулински тест.

2. Да се пресмета титарот на дадените противглобулински серуми и да се внесе во дадената Табела 17.2.

Табела 17.2: Формулар за внесување резултати од титар на противглобулински серум.

Разредување	Пример				Случај			
	Степен на аглутинација за				Степен на аглутинација за			
	против-ИгГ		против-ЦЗ		против-ИгГ		против-ЦЗ	
	Јачина	Поени	Јачина	Поени	Јачина	Поени	Јачина	Поени
неразреден	4+	10	4+	10				
1:2	4+	10	3+	8				
1:4	4+	10	3+	8				
1:8	3+	8	2+	6				
1:16	2+	6	1+	4				
1:32	1+	4	0	0				
1:64	0	0	0	0				
Контрола	0	0	0	0				
Вкупно		68		36				

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 18: АНАЛИЗА НА ПРЕОСЕТЛИВОСТ

18.1. Нормални вредности за вкупен и за специфичен ИгЕ

Концентрацијата на вкупниот ИгЕ во серум е поврзана со возраста. На околу 10 години, вкупниот ИгЕ достигнува вредности кои се одржуваат понатаму. Како нормални вредности за вкупниот ИгЕ се дефинираат горните граници бидејќи постои асиметрична дистрибуција на добиените вредности. Горната граница се пресметува како геометриска средна големина + 1.96 стандардни девијации (СД). Препорака е секоја лабораторија да има сопствени очекувани вредности (Табела 18.1).

Здравите индивидуи имаат многу ниски нивоа на специфични ИгЕ во крвта, нормално под 0.35 кЕА/Л (кило единици специфичен алерген во еден литар). Сензибилизираните пациенти покажуваат зголемени нивоа, над 0.35 кЕА/Л. UniCap специфичните ИгЕ откриваат ИгЕ противтела во интервал 0.35-100 кЕА/Л. Резултатот се изразува квантитативно, како ниво или како класа специфичен ИгЕ (Табела 18.2) .

Табела 18.1: Нормални вредности на вкупен ИгЕ определен со UniCap.

Возраст	Геометриска средна вредност (кЕ ИгЕ/Л)	Горна граница + 1.96 СД (кЕ ИгЕ/Л)
Недели		
6	0.6	4.5
Месеци		
3	1.0	8.0
6	1.8	14.3
9	2.6	19.6
12	3.2	25.5
Години		
2	5.7	45.1
3	8.0	62.7
4	10.0	78.4
5	12.0	94.1
6	14.0	109.8
7	16.0	123.5
8	18.0	139.2
9	20.0	152.9
10 и повеќе	22.0	166.7

18.2. Клинички симптоми за алергија и нивно дијагностицирање

Алергенот кај атопично лице може да предизвика моментна реакција со егзем, ринит, конјуктивит, бронхокострикција, повраќање и проливи, а во ретки случаи и анафилакса. Симптомите можат да бидат едноставни, како што се зацрвенети очи или комплицирани, како што е астма, ринит

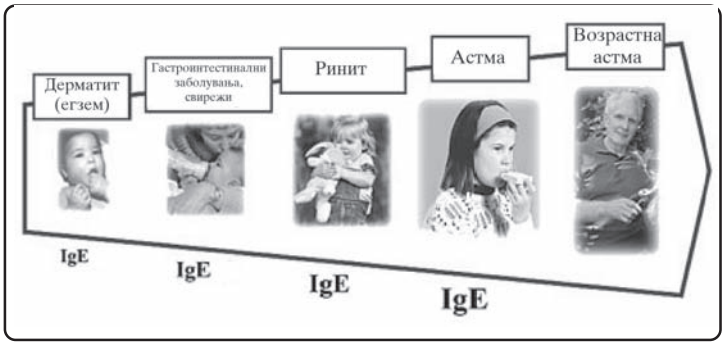
Табела 18.2: Толкување на резул-татите од специфичен ИгЕ според количина (во кЕА/Л), ниво и класи на специфичен ИгЕ.

Квантитативни резултати (кЕА/Л)	Ниво на алерген специфични противтела	Полуквантитативни резултати (Класи на специфичен ИгЕ)
под 0.35	Отсутно или немерливо	0
0.35 до 0.7	Ниско	1
0.7 до 3.5	Средно	2
3.5 до 17.5	Високо	3
17.5 до 50.0	Многу високо	4
50.0 до 100.0	Многу високо	5
над 100.0	Многу високо	6

и уртикарија. Тие можат да бидат лесни или тешки. Хроничните реакции можат да се видат како кожни реакции (егзем), а во бронхијалната астма присутното воспаление на белодробното ткиво може да доведе до астматични напади после допир со алергенот. Манифестациите на атописките заболувања значајно варираат со возраста и вклучените алергени. Во детството најчести се алергии кон храна, особено јајца и млеко. После третата година доминантни алергени се дишните алергени.

Развојот на алергиите во различна возраст може да се опише како ***алергиски марш***. Тоа значи дека, најчесто постои насока на развој на атопиите од новороденото па се до староста (Слика 18.1).

Алергиските реакции на различни органи се јавуваат со различни симптоми (Табела 18.3). Тие можат да бидат локални на кожата, очите, носот, устата, дишниот систем или гастроинтестиналниот систем (атопии) или системски (анафилаксија)



Слика 18.1: Алергиски марш од раѓање до старост.

Кожа	*Атописки дерматит, уртикариа*
Очи/нос	*Риноконјуктивит*
Уста	*Орален алергиски синдром (OAC)*
Дишен систем	*Свирежи во детството, астма*
Гастроинтестинално	*Проливи, повраќање,колики*
Системски	*Анафилаксија*

Табела 18.3: Клинички симптоми за алергиски реакции според различни локализации.

Испитувањата на специфичниот ИгЕ можат да се изведуваат

- одделно за секој сомнителен алерген;
- со комплет алергени за определено заболување; или
- според дијагноза.

18.2.1. Одделно испитување алергени

Во природата постои огромен број алергени. За поголемиот број од нив луѓето развиваат алергии, но за само мал дел од алергените постојат лабораториски методи за нивно испитување. Денес постои технологија за испитување околу 1000 алергени, но во медицинските институции (па и на ИИБХГ) се испитуваат само најчестите алергени (Табели 18.4 и 18.5). За секоја група алергени постои меѓународно дефинирана мала латинична буква која се користи за нивно означување, а после неа следи број. На пример, млекото се означува со f2, полен од амброзија w1 и слично.

Покрај алергените кои се наоѓаат во природата, изготвени се и специјални и рекомбинантни алергени за одделни епитопи со кои се вршат продлабочени и истражувачки анализи на болните со алергии. Тие се означуваа со големата букв R (Research) и до неа се стават другите ознаки (пример Rf261 е ознака за специјален алерген од аспарагус)

Одделното испитување на секој сомнителен алерген е најевтино, но поради комбинациите од различни алергии кои може да ги има пациентот, тие даваат само поединечна информација поради што не се целосни и ефикасни.

Табела 18.4: Различни видови поединечни алергени.

АЛЕРГЕНИ ОД ХРАНА
Белка од јајце (f1)
Жолчка од јајце (f75)
Млеко (f2)
Млеко варено (f231)
Риба (f3)
Пченица (f4)
Кикирики (f13)
Соја (f14)
Јагода (f44)
Saccharomyces Cerevisiae (f45)
Месо свинско (f26)
Месо телешко (f27)
Месо пилешко (f83)
α-лакталбумин (f76)
β-лактоглобулин(f77)
Казеин (f78)
Глутен(f79)
Сирење чадено (f81)
Сирење мувлосано(f82)
Какао (f93)

ПРАШИНИ И ЖИВОТИНСКИ БЕЛКОВИНИ
Влакна од мače (e1)
Влакна од куче (e5)
Дом.прашина (h2)
D. pteronissinus (d1)
D.farinae (d2)

ИНСЕКТИ И НИВНИ ОТРОВИ
Отров од пчела (i1)
Отров од оса (i3)
Отров од стршлен(i5)
Blatella germanica (i6)
Aedes communis (i71)

ПРОФЕСИОНАЛНИ АЛЕРГЕНИ
Памук (o1)

АНТИБИОТИЦИ
Пеницилин Г (c1)
Пеницилин В (c2)
Ампицилин (c5)
Амоксицилин (c6)
Цефахлор (c7)

ГАБИ И МУВЛИ
Asperg. fumigatus (m3)
Candida albicans (m5)
Cladosp.herbarum(m2)
Penicill. notatum (m1)
Alternaria alternata(m6)

18.2.2. Испитување комплет алергени

Комплетите алергени се испитуваат како смеши од различни алергени, обично по пет алергени заедно, и се групирани според сличност. Смешите алергени се означуваат со латиничната буква Икс (x) после првата латинична буква која ја означува групата алергени. Зад нив следи бројот на смешата и евентуално подгрупата. Така, смешата од храна се означува како: fx5E (f1-белка, f2-млеко, f3-риба, f4-пченица, f13-кикирики, f14-соја) (Табела 18.6). Треба да се напомене дека постојат огромен број смеши во секоја од

Табела 18.5: Полени.

ПОЛЕНИ ОД ТРЕВА
Anthoxanthum odora. (g1) - обична миризлива трева
Cynodon dactylon (g2) – обичен троскот
Dactylis glomerata (g3) – обична евовка
Festuca elatior (g4) – ливадска трева
Lolium perene (g5) – повеќегодишен рајграс-љуљ
Phleum pretense (g6) – мачкина опашка-трева
Lolium perenne (g7)- обична трска
Poa pratensis (g8)- ливадарка
Agrostis stolonifera (g9) – плевица
Sorghum halepense (g10) - метла
Bromus inermis (g11) - класица
Secale cereale (g12) – ‘рж култивиран
Holcus lanatus (g13) – волнеста медовица
Avena sativa (g14) – овес
Triticum sativum (g15) – пченица
Alopecurus pratensis (g16) – лисичја опашка
Paspalum notatum (g17) – троскот
Elymus triticoides (g70) – див рајграс
Phalaris arundinacea (g71) – тросковидна светливка
Hordeum vulgare (g201) – јачмен
Zea mays (g202) -пченка

ПОЛЕНИ ОД КОРОВ
Ambrosia elatior (w1) - амброзија
Ambrosia psilostachya (w2) – западна амброзија
Ambrosia trifida (w3) – џиновска амброзија
Franseria acanthicarpa (w4) – ладна амброзија
Artemisia absinthium (w5) - пелин
Artemisia vulgaris (w6) - црн пелин
Chrysanthemum leucanthemum (w7) - маргарита
Taraxacum vulgare (w8) – глуварче
Plantago lanceolata (w9) - тегавец
Chenopodium album (w10) – дива лобода
Salsola kali (pestifer) (w11) - соленка
Solidago virgaurea (w12) - златица
Xanthium commune(w13) – бутрак
Amaranthus retroflexus (w14) – штир
Atriplex lentiformis Scale, (w15) – лобода
Iva ciliate (w16) – метла
Kochia scoparia (w17) – овчешка
Rumex acetosella (w18) - киселец
Parietaria officinalis (w19) – рушителка
Urtica dioica (w20) - коприва
Parietaria judaica (w21) – рушителка

ПОЛЕНИ ОД ДРВА
Acer negundo (t1) - јавор
Alnus incana (t2) – евла, бела
Betula verrucosa (t3) - бреза
Corylus avellana (t4) - леска
Fagus grandifolia (t5) - бука
Juniperus sabinoides (t6) - смрека
Quercus alba (t7) - даб
Ulmus amerikana (t8) - брест
Olea europaea (t9) - маслинка
Juglans californica (t10) - орев
Platanus acerifolia (t11) – платан, чинар
Salix caprea (t12) – врба, ива
Pop.deltoides-topo. (t14) – црна топола
Fraxinus americana (t15) - јасен
Pinus strobes (t16) - бор
Cryptomeria japonica (t17) – Јапонски кедар
Eucalyptus spp. (t18) - еукалиптус
Acacia longifolia (t19) - акација
Carya pecan (t22) - карија
Cupressus sempervirens (t23) - кипарис
Morus alba (t70) – црница, дудинка
Arecastrum romanzoffianum (t72) – кралска палма
Casuarina equisetifolia (t73) - бор
Tilia cordata (t208) - липа
Ligustrum vulgare (t210) - дива ограда

наведените групи, но тука се дадени само најчестите.

Резултатот кој се добива со испитувањето смеши се искажува квалитативно како има (позитивен наод) или нема (негативен наод) алергија кон таа смеша алергени. Доколку има позитивен наод, тогаш се испитуваат одделно сите алергени кои ги има во соодветната смеша алергени, за да се открие на кој од нив и со каков интензитет реагира пациентот.

Вториот начин на групно испитување се врши според дијагнозата на пациентот, сметајќи дека предложените алергени за испитување на соодветната болест се најчестите предизвикувачи:

Астма
g6 - Phleum pretense (трева-мачкина опашка)
t3 – Bettula verucosa (бреза)
t9 – Olea europaea (маслинка)
w21 – Parietaria judaica (бршлен)
e1 – влакна од маче
e5 – влакна од куче
d1 – Dermatophagoides pteronissinus
w6 – Artemisia vulgaris (црн пелин)
m2 – cladosporium herbarum (мувла)
i6 – Blatella germanica (бубашваба)

Ринитис кај возрасни
g6 - Phleum pretense (трева-мачкина опашка)
t3 – Bettula verucosa (бреза)
t9 – Olea europaea (маслинка)
w21 – Parietaria judaica (бршлен)
e1 – влакна од маче
e5 – влакна од куче
d1 – Dermatophagoides pteronissinus
w6 – Artemisia vulgaris (црн пелин)
m2 – cladosporium herbarum (мувла)
i6 – Blatella germanica (бубашваба)

Ринитис кај деца
g6 - Phleum pretense (трева-мачкина опашка)
t3 – Bettula verucosa (бреза)
t9 – Olea europaea (маслинка)
w21 – Parietaria judaica (бршлен)
e1 – влакна од маче
e5 – влакна од куче
d1 – Dermatophagoides pteronissinus
f1 – Белка од јајце
f2 – Млеко
f13 – Кикирики

Екцем
f1 – Белка од јајце
f2 – Млеко
f3 – Риба
f4 – Пченица
f13 – Кикирики

f17 – Лешник
f14– Соја
d1 – Dermatophagoides pteronissinus
e1 – влакна од мače
e5 – влакна од куче

Наштинка со свирежи
g6 - Phleum pretense (трева-мачкина опашка)
t3 – Bettula verucosa (бреза)
t9 – Olea europaea (маслинка)

Табела 18.5: Смеши од алергени.

Смеша полени од треви (gx1) (Cocksfoot-g3, Meadow fescue-g4, Rye- grass-g5, Timothy-g6, Meadow grass, Kentucky blue-g8) (обична ежовка ,ливадска трева, љуљ, мачкина опашка, ливадарка)

Смеша полени од дрва (tx6) (Acer negundo-t1, Betula verrucosa-t3, Fagus grandifolia-t5, Quercus alba-t7, Juglans californica-t10) (јавор, бреза, бука, даб, орев)

Смеша полени од корови (wx5) (Ambrosia elatior-w1, Artemisia vulgaris-w6, Chrysanthemum leucanthemum-w7, Taraxacum vulgare-w8, Solidago virgaurea-w12) (амброзија, црн пелин, маргарита, глуварче, златица)

Смеша од храна (fx5E) (f1-белка, f2-млеко, f3-риба, f4-пченица, f13-кикирики, f14-соја)

Смеша од прашини (hx2) (Hollister-Stier Labs.-h2, Dermatophagoides pteronissinus-d1, Dermatophagoides farinae-d2, Blatella germanica -i6)

Смеша пердуви (ex73) (e70-пердуви од гуска, e85-пердуви од кокошка, e86-пердуви од патка, e213-пердуви од папагал)

Смеша од месо (fx10) (f26-свинско месо, f27-телешко месо, f83-пилешко месо, f75-жолчка од јајце, f284-мисиркино месо)

Смеша од мувли (mx2) (Penicillium notatum-m1, Cladosporium herbarum-m2, Aspergillus fumigatus-m3, Candida albicans-m5, Alternaria alternata-m6, Helminthosporium halodes-m8)

Смеша од овошје (fx15) (f33-портокал, f49-јаболко, f92-банана, f95-праска)

Смеша од апетисани (fx1) (кикирики-f13, лешник-f17, бразилски орев-f18, бадем-f20, кокос-f36)

Смеша животински влакна (ex1) (e1-влакна од мače, e3-влакна од коњ, e4-влакна од крава, e5-влакна од куче)

Смеша полени од дрва (tx5)(Alnus incana-t2, Corylus avellana-t4, Ulmus americana-t8, Salix caprea-t12, Populus deltoids-t14)

Смеша од зеленчук (fx14) (f25-домат, f214-спанаќ, f216-зелка, f218-пиперка)

Смеша од житарици (fx20) (f4-пченица, f5- рт, f6-јачмен, f9-ориз)

Смеша од морски плодови (fx2) (f3-риба, f24- рак, f37-школка, f40-туна, f41-лосос)

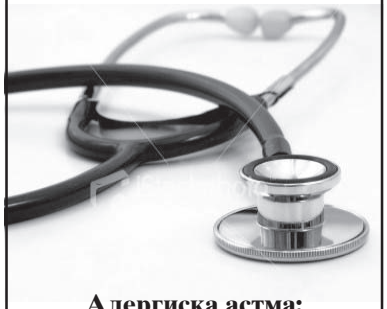
w21 – Parietaria judaica (бршлен)
e1 – влакна од мače
e5 – влакна од куче
d1 – Dermatophagoides pteronissinus
f1 – Белка од јајце
f2 – Млеко
f13 – Кикирики

18.2.3. Испитување алергени според дијагноза

Атописки дерматит. Атопискиот дерматит е првата манифестација во алергискиот марш со врв на појавување пред третиот месец од животот. Преваленцијата на атопискиот дерматит е околу 20%, додека 60% од пациентите првото појавување го имаат во тек на првата година од животот и 85% пред петтата година од животот.

Атопискиот дерматит е доцна реакција (клеточна реакција),

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Алергиска астма:
Случајот на Филип Давидовски, 12 годишно дете со хронична астма и ринит.

наспроти уртикаријата која е рана реакција (васкуларна реакција). Пациентите со атописки дерматит имаат хиперреактивност на кожата кон холинергиски супстанци аналогно на бронхијалната хиперреактивност кај астма.

Опишан е висок процент преваленција на астма, од 30 до 76%, кај деца со атописки дерматит и соодветствува на тежината на атописките дерматит. Кај некои пациенти може да се види и бронхијална хиперреактивност, без симптоми на астма.

Уртикарија. Уртикаријата може да се јави кај деца или кај возрасни. Кај деца постои голема веројатност дека е поврзана со зголемено ниво специфичен ИгЕ.

Алергиски ринит. Најважни симптоми на алергискиот ринит се: кивање, течење виденеста слуз од носот, чешање во носот и очите, затнат нос.

Орален алергиски синдром. Оралниот алергиски синдром (ОАС) е вид контактна уртикариа која се јавува неколку минути после внесување определни храни кон коишто бил пациентот сензиби-лизиран. Симптомите се јавуваат на усните и на усната празнина и по дефиниција не вклучуваат други органи.

Оралниот алергиски синдром (ОАС) е втор симптом по фрекфенција од групата ИгЕ овозможени преосетливости на храна кај возрасните лица. Редоследот е следниов: уртикарија/ангиоедем (70%), орален алергиски синдром (54%), астма (37%), и анафилаксија 27.5%).

Свирежи во детството. Кај деца до три години свирежите во градите се јавуваат до 30%, додека кај деца до 6 годишна возраст тие се зголемуваат до 50%. Околу 60% од децата со свирежи во градите ги губат симптомите после третата година и не развиваат астма.

Астма. Астма е хронично воспалително нарушување на дишните патишта во кое што учествуваа многу клетки, а особено мастоцитите и еозинофилите. Во предиспонирачки лица, ова воспаление може да доведе до развој на астма со различен степен, најчесто повратлив, и со стеснување на дишните патишта.

18.3. Толкување резултати од противглобулински тест

18.3.1. Директен противглобулински тест

Резултатот на титарот за против-ИгГ е 48, а за против-Ц3 е 36. Ова се добива кога ќе се соберат вредностите кои одговараат за соодветните степени на аглутинација добиени

од епруветите со различно разредување на противглобулинскиот серум. Така аглутинацијата 4+ одговара на 10, 3+ одговара на 8, 2+ одговара на 6, 1+ на 4, $\frac{1}{2}$+ на 2, а 0 значи дека нема аглутинација. Ваков случај може да се добие кога би помешале јак моноспецифичен серум и еритроцити силно сензибилизирани со ИгГ и умерено-силно сензибилизирани со Ц3, состојба слична како кај заболените од АИХА предизвикана од топли противтела.

Во клиниката директниот противглобулински тест е корисен при дијагнозата на:

- акутна и доцна хемолитичка посттрансфузиска реакција, иследување на пострансфузиските реакции воопшто;
- автоимуните хемолитички ракции;
- хемолитичката болест на новородено;
- имунолошките хемолитички реакции предизвикани од лекови;
- како позитивна авто-контрола при крвногрупното типизирање, при просејувањето (скринингот) за противтела и при вкрстената проба.

Иако скалата за проценка на јачината на аглутинацијата е од големо значење при толкување на резултатите добиени од болните од автоимуна хемолитичка анемија (АИХА), сепак нејзината важност не треба да се презголемува. Иако може да се каже дека степенот на деструкција на еритроцитите е правопропорционален со количината на противтела врзани на нив, сепак постојат бројни исклучоци. Како и да е, хемолиза во примерокот е обично присутна кога имаме обложување на еритроцитите со голема количина на ИгГ и Ц3.

ДАТ титарот и скалата за проценка на јачината на аглутинацијата можат да ни позлужат и при следењето на терапијата кај пациентите. Иако не ретко се случува противглобулинскиот тест да остане позитивен и кај оние пациенти кај кои АИХА е во фаза на ремисија, сепак и кај нив титарот на ДАТ е намален.

Во случај на позитивен противглобулински тест треба да се мисли на следниве можности:

- профилакса со имуни глобулини на Rh негативна мајка;
- постоење на топли автопротивтела без хемолитичка активност;
- промени во мембраната на црвените клетки, предизвикана најчесто при користењето на некои лекови (на пр. цефалоспорини) и последо-вателна неспецифична апсорпција на глобулини на нив;
- неспецифична адсорпција на глобулини при хипергамаглобулинемија, парапротеинемија;
- ин витро активација на комплементот поради постоење

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Хемолитичка болест на новородено:
Случајот на Магда Србиновска, плод во имунолошки дистрес.

на ладни автопротивтела, на пр. кај коагулирана крв после ладење;

- полиаглутинација, доколку дојде до изложување на скриените противгени (криптопротивгени) или доколку противглобулинскиот серум е загаден со против-Т (општ противген нормално присутен во мембраната на еритроцитите, да не се меша со противТ-Ли серум).

18.3.2. Индиректен противглобулински тест

Докажување на противгени: Голем број на противгени сеуште се откриваат и докажуваат со помош на индиректниот противглобулински тест (на пр. Fy^a, Fy^b, K, k, S, s, Jk^a, Jk^b). Индиректниот противглобулински тест, доколку како средство за миење се користи фосфатниот пуфер, е метод на избор при докажување на ретки противгени (Lu^a, Wr^a, Kp^a), чести противгени (Co^a, Js^b, Kp^b) како и на слаби противгенски варијанти ($D^{слабо}$, D^{VI}, C^w).

Докажување на противтела: Индиректниот противглобулински тест е неопходен дел од тестовите за просејување (скрининг) на противтела и вкрстената проба. При тоа понекогаш е потребно и да се направат некои модификации во самиот тест. На пример, противтелата кои се важни при употребата на трансфузија на крв најдобро се откриваат доколку се употреби албуминската техника (30 мин на 37^0Ц). Исто така, изведувањето на тестот во епрувети со употребата на ЛИСС (физиолошки раствор со ниска концентрација на јони), ја зголемува сензитивноста во откривањето на противтелата кон Rh противгенот, иако понекогаш неуспева да го открие присуството на против-K. Особен проблем може да преставуваат и ладните противтела со широк температурен оптимум на делување.

Во денешно време методот со епруветки, кои се употребуваат за изведување на индиректниот противглобулински тест, се повеќе се заменуваат со употреба на посензитивни методи, (какви што се гел тестовите или техниките со цврста фаза), особено при просејувањето (скринингот) и идентификацијата на противтела.

Индиректниот противглобулински тест, со употреба на албуминската техника, сеуште е методот на избор при проценката на клиничкото значење на противтелата кои се откриваат на овој начин. Тој, исто така, претставува стандарден тест и при титрацијата на противтелата.

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата Студент (име и презиме) Асистент (потпис и печат)

_____ _____ _____

БЛОК 7- АВТОИМУНИТЕТ

УЧЕБНИ ЦЕЛИ:

ВЕЖБА 19. СИТЕМСКИ АВТОИМУНИТЕТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- го дефинираат местото на системскиот автоимунитет;
- определат антикардиолипински фосфолипидни противтела.

ВЕЖБА 20. ОРГАН СПЕЦИФИЧЕН ИМУНИТЕТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат:

- го дефинираат местото на орган специфичниот автоимунитет;
- определат количина на противтироглобулински противтела.

ВЕЖБА 21. ТОЛКУВАЊЕ АВТОИМУНИТЕТ (1 час)

По завршување на вежбата, студентите ќе знаат да:

- толкуваат резултати од системскиот и орган специфичниот автоимунитет;
- анализираат случаи од автоимунитетните заболувања.

ПОЕНИ:

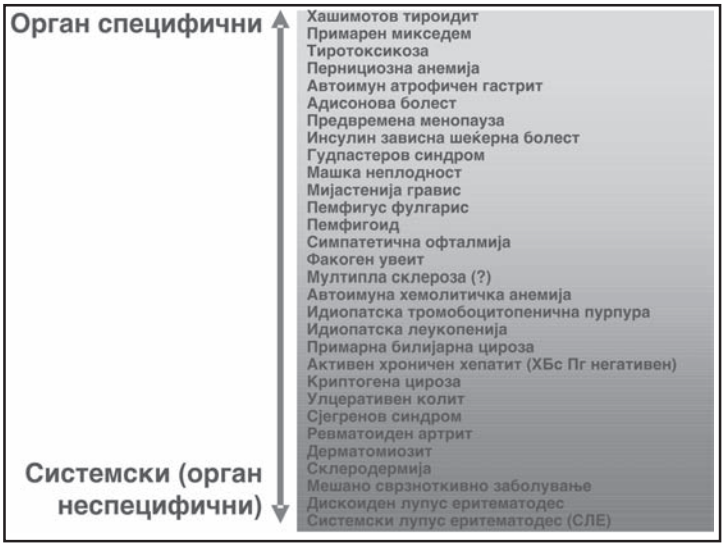
ПРИСУСТВО	1.5 поени
ЗНАЕЊЕ	3.0 поени
ВКУПНО:	4.5 поени

ВЕЖБА 19: СИСТЕМСКИ АВТОИМУНИТЕТ

19.1. Вовед за автоимуност

Поимот автоимуност се однесува на одредени патолошки состојби во кои се јавува оштетување на сопственото ткиво поради активација на имунолошкиот систем насочена кон компоненти на нормалните ткива или органи. Ткивните оштетувања може да се ограничени на одделни органи (кога се работи за орган-специфична автоимуност) или да се манифестираат со засегање на повеќе системи, како на пр. кај ревматска болест (кога се работи за ситемска автоимуност или орган-неспецифична автоимуност). Преминот од орган специфични во системски автоимуни заболувања не е остер (јасен) туку тие се препокриваат во облик на скала на автоимуни заболувања (Слика 19.1).

Од посебен научен интерес е големата разлика во застапеност на автоимуните болести помеѓу половите, со многу поголема застапеност (повеќе од 75%) на овие болести меѓу пациенти од женски пол. Хуморални, клеточни



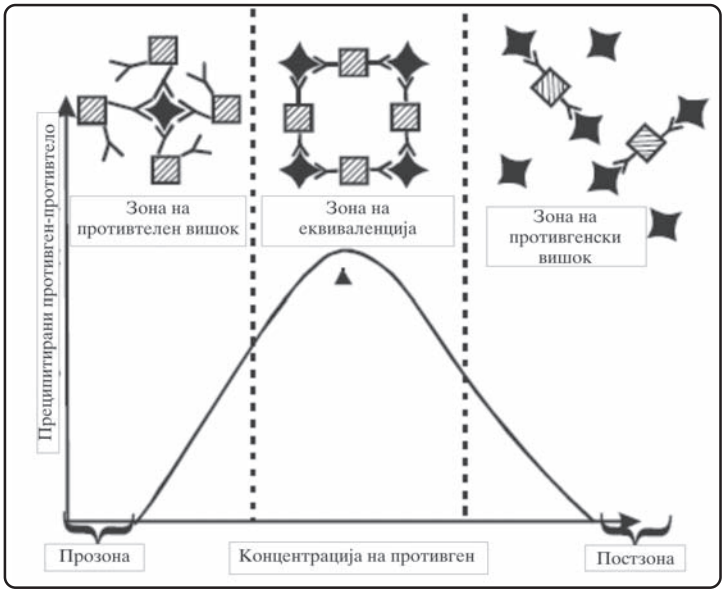
Слика 19.1: Скала на автоимуните заболувања.

механизми или и двата можат да се одговорни за патолошките процеси кај автоимуните болести, а малку подобро карактеризирани се противтела со различна ткивна специфичност. Сепак останува да се разјаснат голем број на прашања во поглед на започнувачкиот импулс во автоимуноста. Постојат докази дека некои противтела се патогени, на пр. трансферот на мајчини ИгГ противтела кај тиреотоксикоза резултираат со минлива неонатална тиреотоксикоза. За многу други противтела не може да се докаже дека директно се патогени, но тие пак може да служат како дијагностички показател за автоимуна болест.

Традиционално, автопротивтелата се идентификуваа најчесто субјективно, со користење на индиректна имунофлуоресценција. Напредокот во молекулските и биохемиските техники овозможија попрецизно идентификување на противгените и развивање на повеќе имунолошки методи како на пр. радиоимуноесеј, преципитација во гел, аглутинација, нефелометрија и особено, ЕЛИСА. Со зголемување на потенцијалот за стандардизирање, квантифицирање и автоматизација, тестовите за испитување на автопротивтела станаа достапни за повеќе лаборатории, Сепак, значително различие во одговорот кон различни комерцијални тестови сеуште постои, главно заради различната припрема на противгенот врзан за цврстата фаза, но и заради разликите во афинитетот или авидитетот помеѓу противтелата од различни индивидуи.

19.2. Откривање на автопротивтела

Автопротивтелата присутни во биолошки течности се откриваат исклучиво со имунохемиски техники базирани на детекција на имуни комплекси формирани помеѓу автопротивтелото и целниот противген кој се наоѓа во ткивата, клетките или пак е во рекомбинантна форма.



Слика 19.2: Квантитативна имунопреципитациска крива (Heidelberger-Kendall).

Во имунохемиските реакции, додавање на растечка количина противген на константна количина на противтело, резултира со растечка преципитација, достигнува плато и потоа паѓа, како што објасниле уште во 1935 година Хеиделбергер и Кендал (Слика 19.2). Намалувањето на преципитацијата при повисоки концентрации на противген се должи на формирањето на помали, полесно растворливи комплекси и може да води до лажно негативен резултат.

19.2.1. Индиректна имунофлуоресценција

Индиректна имунофлуоресценција е најчесто користен тест за скрининг за присуство на автопротивтела. Како супстрат во реакцијата противген - противтело се користи ткиво од глувци, стаорци или примати кои не покажуваат вкрстена реактивност меѓу различните животински видови.

19.2.2. Аглутинација

Тестовите на аглутинација вклучуваат премостување со специфично противтело на специфични партикли обложени со противгени, со што се формираат големи, макроскопски агрегати. Во најголем дел, првите тестови за испитување на автопротивтела беа базирани на хемаглутинација во која како носач за противгените се користеле еритроцити. Во овие тестови, ИгМ противтелата подобро аглутинираа од ИгГ противтелата поради нивната пентамерна структура која овозможува постоење на 10 противген - врзувачки места по молекула. Покрај еритроцити, како носачи на противгени се користат желатин и латекс, а тие обезбедуваат поголема инертност и стабилност на системот. Иако овие тестови главно се дизајнирани за откривање на клинички важните ИгГ автопротивтела, низок титар на ИгМ противтела кои вкрстено реагираат или класичниот ИгМ ревматоиден фактор, потенцијално влијаат на резултатот. Овие методи се во голем дел надминати од посензизитвни и репродуцибилни нови техники.

19.2.3. Имунодифузија

Имунодифузијата е техника со добра специфичност, но мала сензитивност. Создавањето на преципитациска линија во гел е зависна од употребата на соодветни концентрации на противген и тест противтело.

19.2.4. Имунопреципитација

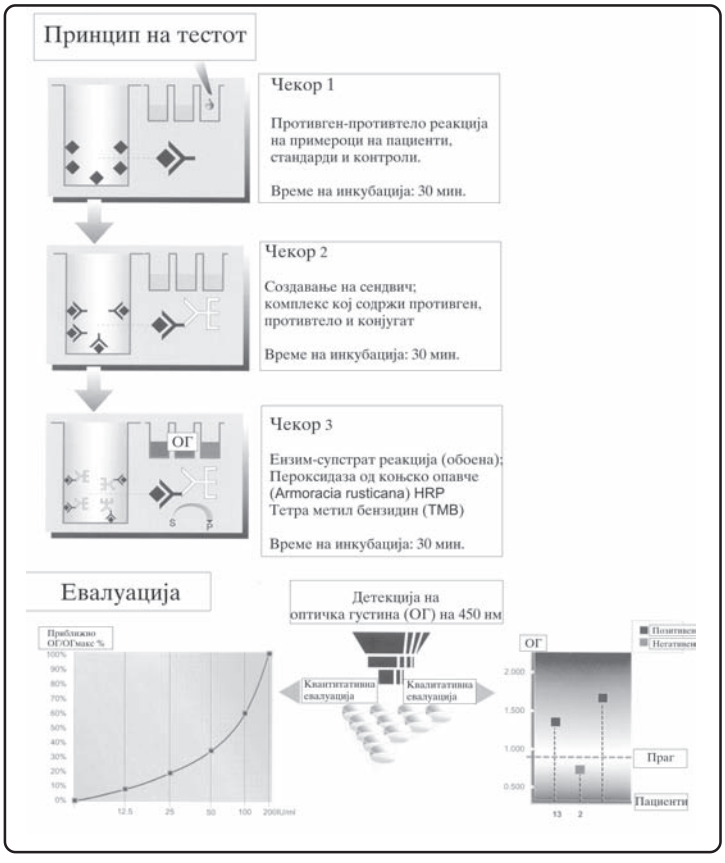
Имунопреципитацијата на клеточни екстракти со автоимуни серуми е сензитивна техника за демонстрација на противтела кон снРНП или слични партикли. Принципот се состои во анализа на РНП-противтело комплексите според содржината на РНК по СДС-акриламидна електрофореза. Оваа техника е прилично комплицирана и долготрајна, па не е погодна за рутинска лабораториска примена.

19.2.5. Имуноблотирање

Оваа исклучително сензитивна техника е важна за карактеризација на специфичност на противтела од ист примерок серум, или за дефинитивна идентификација на поинаку неидентификувано противтело. Протеините од клеточниот екстракт (кои ги содржат и испитуваните противгени) се разделуваат на СДС-ПАГЕ и се пренесуваат на нитроцелулозна мембрана. Дамките од мембраната потоа се инкубираат со серумот кој се испитува, па резултирачкиот комплекс противген-противтело се визуелизира со ензимски обележени проби. Противтела кон конформациски епитопи, како на пр. СС-А (Ро), се однесуваат неконзистентно во оваа техника.

19.2.6. ЕЛИСА

ЕЛИСА техниката е многу сензитивна и репродуцибилна. Во овие тестови бунарчиња од микротитарска плочка се обложуваат со приготвен противген. Притоа, чистотата на приготвениот противген е од фундаментално значење за специфичноста на тестот. Слободните врзни места се блокираат со инертен протеин, а со ефикасноста на блокирачката стапка може да се влијае на сензитивноста на тестот.



Слика 19.3: ВАРЕЛИСА метод за определување автопротивтела на Институт за имунобиологија и хумана генетика.

19.2.7. ЕЛИА

ЕлиА двДНК тестот се работи во бунарчиња обложени со двоверижна плазмидска ДНК. По додавање на испитуваниот серум, неврзаните противтела се плакнат, а на формираните комплекси ДНК-противтела се додаваат секундарни, против ИгГ противтелата (ИгГ конјугат) обележани со ензим (за да се формира противтело-конјугат комплекс). По одредена инкубација неврзаниот конјугат се измива и врзаниот комплекс се инкубира со раствор за развивање на реакцијата. Квантификацијата се прави преку мерење на флуоресценција и споредба со калибрациски криви добиени врз основа на раствори со позната концентрација на противтела (Слика 19.4).



Слика 19.4: Шематски приказ на ЕЛИА метод за определување автопротивтела на Институт за имунобиологија и хумана генетика.

19.2.8. Примерок за испитување

Сите серолошки тестови за испитување на автопротивтела се изведуваат на примероци од серум. Тие треба да се чуваат на 4 Ц додека се анализираат или пак на -20 Ц, ако треба да се анализираат по подолго време (неколку месеци). За некои аглутинациски тестови, серумот треба претходно да се загрее 30 мин на на 56°Ц за да се инактивира комплементот. Притоа треба да се има предвид дека температурната инактивација го прави серумот неадекватен за повеќето ЕЛИСА тестови.

19.2.9. Стабилност на противтелата

Повеќето автопротивтела се исклучително стабилни. Примероците серум може да се чуваат 2-3 недели на 4°Ц без да дојде до деградација, ако примерокот не се контаминира со бактерии или фунги. Исклучок од ова се противтелата кон гликопротеин поврзан со миелинот кои мора да се чуваат на -20°Ц до анализата.

19.3. Системски автоимуни заболувања

19.3.1. Противтела поврзани со ревматска болест

19.3.1.1. Фосфолипидни противтела

Ова е генеричко име за поголема група противтела, поврзани со истоимениот синдром. Против-кардиолипинските противтела припаѓаат на фамилија вкрстено реактивни противтела кои реагираат со негативно наелектризирани фосфолипиди. Овие противтела наоѓаат примена во испитувањето на ризик од тромбоза кај пациенти со СЛЕ или поврзани болести, како и за следење на бременост кај пациентки со ризик од спонтан абортус. При

тоа, ниски или времено позитивни резултати не се релевантни за дијагноза на антифосфолипиден синдром. Најдобро со овој синдром корелираат ИгГ противтелата. Според критериумите од 1999 година за антифосфолипиден синдром се зборува кога се исполнети најмалку еден клинички и еден лабораториски критериум од двата клинички и двата лабораториски:

Клинички критериуми:

1. Васкуларна тромбоза: една или повеќе епизоди на артериска, венска или тромбоза на мали крвни садови во било кое ткиво или орган.

2. Комплицирана бременост: една или повеќе необјаснети смртности на морфолошки оформен плод по 10-тата недела на бременост. Едно или повеќе предвремени раѓања пред 34-недела на бременост поради сериозна пре-еклампсија, еклампсија или инсуфициенција на плацентата. Три или повеќе необјаснети последователни спонтани абортуси пред 10-тата недела на бременост.

Лабораториски критериуми:

1. Противкардиолипински противтела: присуство на противкардиолипински противтела од ИгГ или ИгМ изотип во среден или висок титар во два или повеќе наврати на растојание од 6 недели.

2. Лупус антикоагулант: лупус антикоагулант присутен во плазмата во два или повеќе наврати на растојание од 6 недели.

19.3.1.2. Нуклеарни противтела (АНА)

Нуклеарните противтела се хетерогена група на автопротивтела кои често се наоѓаат кај пациенти со системски ревматски болести. Се делат на две групи, противтела кон структурни, нерастворливи протеини и противтела кон растворливи протеини.

Системскиот лупус еритематозус е болест карактеризирана со многу различни автопротивтела. Еден просечен пациент со лупус има најмалку 3 различни вида на автопротивтела. Ваква поликлоналност на автопротивтелата постои уште кај склеродерма. Преваленцата на различните противтела кај болните од СЛЕ варира од 70% за противтела кон едноверижна ДНК, до 3% за против АлуРНК противтела.

Противтелата кон нативна или двоверижна ДНК се силно поврзани со СЛЕ.

19.3.2. Противтела кон неутрофилната цитоплазма

Опишани се противтела кон различни внатреклеточни ензими од неутрофилите, а поврзани со некротизирачки васкулитис и васкулитиси кај ревматична болест. Со индиректна имунофлуоресценција на неутрофили фиксирани со етанол, се откриваат два различни облици на боење,

едниот со потенцирање на централниот интерлобуларен дел (т.н. C-ANCA) и вториот, перинуклеарен или P-ANCA. Овој вид на боење може да се сретне и кај присуство на противнуклеарни противтела (АНА), особено противтела кон двоверижна ДНК и противхистонски противтела.

19.3.3. Системски лупус еритематозус (СЛЕ)

Системскиот лупус еритематозус е прототип на автоимуна болест, која се карактеризира со создавање палета од различни автопротивтела и повеќесистемско засегање. Слично како и други автоимуни болести, СЛЕ веројатно се должи на комбинација од генетски и фактори од околината кои придонесуваат за состојбата на имуна хипер-реактивност.

Главната серолошка карактеристика на СЛЕ е создавање автопротивтела најчесто насочени кон компоненти од клеточното јадро. Овие противјадрени противтела (АНА) се врзуваат за различни макромолекули кои вклучуваат ДНК, РНК, хистони и повеќе комплекси протеини-РНК наречени снРНП (од small nuclear ribonucleoproteins). Кај СЛЕ, целните молекули за АНА се убиквитарно присутни во клетките, додека кај здрави индивидуи тие се недостапни за имуниот систем.

Иако АНА се скоро секогаш присутни во серумот од болни со СЛЕ, овие противтела не се единствено присутни кај болни со СЛЕ, туку се јавуваат и кај болни со болести на сврзното ткиво, ревматоиден артрит или синдром на Сјегрен (Sjögren). Понатаму АНА може да се открие и кај 5% од нормалните лица. Сепак, одредени АНА се наоѓаат исклучиво кај болни со СЛЕ и може да служат како обележувач за ова заболување. Така, против-ДНК и против См противтелата се идентификувани како еден од критериумите за класификација на пациентите со СЛЕ.

Табела 19.1: Автопротивтелата, нивната молекулска цел и клиничката асоцијација кај системски лупус аритематозус (СЛЕ).

Автопротивтела кај СЛЕ		
Противтело	**Молекуларна цел**	**Клиничка асоцијација**
против-двДНК	двоверижна ДНК	Нефритис
против-См	Б, Бе, Д, снРНП протеини	/
против-РНП	А, Ц, 70К РНП протеини	Препокривачки карактеристики (миозитис, склеродермија)
против-Ро (ССА)	52кД Ро, 60кД Ро протеини	Конгенитален срцев блок, фотосензитивен исип
против-Ла (ССБ)	48кД Ла протеини	Конгенитален срцев блок, фотосензитивен исип
против-рибозомални П	рибозомален П протеин	Невропсихијатриски СЛЕ
против-фосфолипид	Б2-ГПИ, кардиолипин, други фосфолипиди	Тромбоза, тромбоцитопенија
против-еритроцитни	Рх детерминанти	Кумбс позитивна хемолитичка анемија
против-тромбоцитни	Тромбоцитни површински гликопротеини	Тромбоцитопенија

Имајќи ја предвид хетерогеноста на СЛЕ, дијагнозата СЛЕ се поставува врз основа на неколку критериуми кои вклучуваат и клинички и лабораториски наоди (Табела 19.1).

19.3.3.1. Оштетување на ткивото

Од различните манифестации на СЛЕ, нефритисот ја

илустрира комплексноста на болеста. Тој се должи на таложењето имуни комплекси во гломерулите кои го активираат комплементниот систем и промовираат воспаление. Во имуните комплекси, против-ДНК противтелата се главна причина за гломерулското оштетување. Тие се дел од големиот спектар на противтела насочени кон нуклеозомот, форма на ДНК присутна во јадрото која содржи и протеинска и нуклеинска комонента. Бидејќи ДНК е врзана за хистонското јадро, одделни пациенти може повремено да создаваат противтела кон ДНК, хистони, или нуклеозоми.

Создавањето имуни комплекси може да се случи во циркулацијата со противтела кои врзуваат ДНК или нуклеозоми ослободени од мртви клетки. Алтернативно, комплексите може да се направат во бубрегот со процес наречен ин ситу создавање на имуни комплекси.

Покрај нефритот, автопротивтелата може да посредуваат во хематолошките манифестации на болеста. Цитопении, како автоимуна хемолитичка анемија и тромбоцитопенија, може да се резултат на врзување на автопротивтелата на површинските противгени од црвените клетки (еритроцитите) или тромбоцитите, по што следува лиза посредувана од комплемент или противтелно посредувана цитотоксичност.

Засегање на централниот нервен систем, венски и артериски тромбози, како и други антифосфолипидни синдроми можат да бидат поврзани со СЛЕ.

19.4. Задача

19.4.1. Определување ИгМ противкардиолипински противтела

19.4.1.1. Потребен материјал за изведување на вежбата

За одредување ИгМ противкардиолипинските противтела (ПКП) во серум/плазма неопходни се:

- примерок на серум/плазма;
- пластичен носач за стрипови;
- стрипови (секој стрип има 8 бунарчиња);
- разредувач на примероците;
- пуфер за плакнење;
- стандарди за ПКП (0 Е/мл; 4 Е/мл; 8 Е/мл; 20 Е/мл; 40 Е/мл; 100 Е/мл) во СФП, кој содржи БСА, 0.095% натриум азид и хуман серум серум;
- позитивна контрола; СФП кој содржи БСА, 0.095% натриум азид и хуман серум;
- негативна конрола; СФП кој содржи БСА, 0.095% натриум азид и хуман серум;

- ИгМ ХРП (horse-radish peroxidase) коњугат;
- ТМБ субстрат (3,3',5,5' - тетраметилбезидин);
- раствор за стопирање на реакцијата (0.5 М H_2SO_4);
- пипети од 10 мкЛ, 50 мкЛ, 100 мкЛ и 1000 мкЛ;
- пластични продолжетоци;
- контејнери за пуферот за плакнење и разредувачот за примероците;
- дестилирана или дејонизирана вода;
- апарат за автоматско плакнење;
- спектрофотометар (Victor^2) способен да ја измери абсорбанцата на 450 нм.

19.4.1.2. Приūрема на ūуфер за ūлакнење

Се земаат 50 мЛ од концентратот за плакнење и се префрлаат во чиста колба од 1000 мЛ. Концентратот се разредува 20 пати со додавање на 960 мЛ дестилирана вода или дејонизирана вода.

19.4.1.3. Приūрема на раствор за разредување

Многу е важно растворот за разредување да ја отсликува природната средина на примерокот. Се припрема непосредно пред ставањето во количина не поголема од онаа неопходна за соодветниот број на бунарчиња. За еден стрип е доволен 1.5 мЛ од концентратот на разредувачот за примероци. На оваа количина се додава 6 мЛ дестилирана или дејонизирана вода. Вака припремениот разредувач за примероците е стабилен 2 недели на температура од +2 до +8°**C**, доколку се чува во добро затворен контејнер.

19.4.1.4. Примерок

За одредување концентрацијата на ПКП потребно е 1 мЛ примерок. Доколку се користи серум, крвта се зема со венепункција, се остава да сосири и се одвојува серумот со центрифугирање (5 минути на 4000 ввм). За добивање плазма се користи крв земена со Хепарин или ЕДТА. Хемолитичните (хемоглобин ≤500 мг/дЛ), липемичните (≤125 мг/дЛ), иктеричните примероци (билирубин ≤30 мг/дЛ) или примероците загадени со микроорганизми можат да влијаат врз точноста на резултатите па поради тоа не треба да се употребуваат. Не треба да се користат примероци кои стоеле несмрзанти повеќе од 24 часа.

Стабилноста на примерокот изнесува околу 24 часа на температура од 4-8°C. Доколу е потребно подолготрајно чување на примерокот, тогаш тоа треба да се направи на температури пониски од -25°C.

Пред да се премине на изведување на тестот, примерокот треба да се разреди со специјален разредувач во однос 1:101. Ова разредување се прави кога на 10 мкЛ од примерокот ќе му се додадат 1000 мкЛ од разредувачот.

19.4.1.5. Протокол за работа

Сите стандарди и примероци се работат во дупликат. За секој тест треба да се направи нова стандардна права. Сите хемикалии и примероци пред да се почне со работа треба да се загреат на собна температура (+20 до +25^{0}C).

1. Се разредува серумот/плазмата во однос 1:101.

2. Во рамката се местат потребниот број на стрипови.

3. Бунарчињата непосредно пред почетокот на работа се измиваат со пуфер за плакнење. Измивањето се врши на тој начин што бунарчињата се полнат со 300 мкЛ пуфер за плакнење. Пуферот стои во бунарчињата 20 секунди и потоа се фрла.

4. Во соодветните бунарчиња се додава по 100 мкЛ од стандардите, контролите и разредените примероци (Слика 19.5)

5. Се икубира 30 минути на собна температура (18-25^{0}C) без да се меша.

6. По инкубацијата сите бунарчиња се плакнат 3 пати со пуфер за плакнење.



Слика 19.5: Шема за поставување стандарди, контроли и примероци од пациенти за определување автоантитела со ВАРЕЛИСА.

7. Во сите бунарчиња се додава 100 мкЛ од коњугатот.

8. Се икубира 30 минути на собна температура (18-25^{0}C) без да се меша.

9. По инкубацијата сите бунарчиња повторно се плакнат 3 пати со пуфер за плакнење.

10. Во сите бунарчиња, директно од шишенцето, се додава по 100 мкЛ од 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (ТМБ) субстратот.

11. Се инкубира 10 минути на темно на собна температура (18-25^{0}C) без да се меша.

12. Во сите бунарчиња се додава по 50 мкЛ од растворот за стопирање на реакцијата.

13. Се проверува дали секој стрип е правилно наместен

во своето лежиште и се мери абсорбанцата на 450 нм со помош на спектрофотометар (Victor^2). Се препорачува абсорбанцата да се измери во рок од 30 минути по додавањето на растворот за стопирање на реакцијата, за да се избегне било какво влијание на надворешните фактори.

19.4.1.6. Пресметување на резултатите

За секој тест се прави нова стандардна права. Најпрвин се пресметуваат средните вредности на стандардите и се нанесуваат на билогаритамски графикон во однос на нивните концентрации. Непознатите примероци се отчитуваат од стандардната права. Примероците кои имаат абсорбанца поголема од вредноста на најголемиот стандард се означуваат со >100 Е/мЛ. Овие примероци треба да се разредат и повторно да се одреди концентрацијата на противкардиолипинските противтела.

Квалитативно пресметување: Во квалитативните пресметки најпрвин се одредува $ОГ_{cut\text{-}off}$ на секој испитуван примерок посебно. $ОГ_{cut\text{-}off}$ се одредува на следниов начин:

$$ОГ_{cut\text{-}off} = ОГ\text{позитивна контрола} \times \text{Фактор}$$

Вредноста на факторот за позитивната контрола се зема од сертификатот за контрола кој се наоѓа во секој комплет за работа.

Пример (Табела 19.2): ОГпозитивна контрола = 0.587

Фактор = 0.3

$ОГ_{cut\text{-}off}$ = 0.587 **x** 0.3 = 0.18

Пресметување на соодносот: За да се добие претстава колку еден пациент е позитивен за дадената анализа треба да се пресмета соодносот. Соодносот за секој примерок посебно се пресметува на следниот начин:

$$\text{Сооднос} = ОГ\text{испитуван примерок} / ОГ_{cut\text{-}off}$$

Пример (Табела 19.2): $ОГ_{cut\text{-}off}$ = 0.18

ОГиспитуван примерок = 0.235

Сооднос = 0.235/0.18= 1.30

19.4.1.7. Пресметување концентрација на ИгМ противкардиолипинските противтела

Концентрацијата на ИгМ противкардиолипинските противтела се пресметува според претходно опишаниот протокол. Резултатите се внесуваат во Табела 19.

Табела 19.2: Пример за пресметување концентрација на автопротивтела (горе) и место за пресметување (долу).

Пример				
Стандард/ примерок	**Екстинција (нм)**	**Средна вредност (нм)**	**Концентрација (Е/мл)**	**Сооднос**
Ст. 1	0.081/0.079	0.080		**Фактор 0.30** **Cut-off 0.18**
Ст. 2	0.115/0.111	0.113	4	
Ст. 3	0.179/0.159	0.169	8	
Ст. 4	0.360/0.354	0.357	20	
Ст. 5	0.916/0.906	0.911	40	
Ст. 6	1.453/1.253	1.353	100	
Позитивна проба	0.589/0.585	0.587	31.59	30.7-53.1 (41.9)
Негативна проба	0.050/0.048	0.049	1.66	<5
9907	0.157/0.0152	0.154	6.46	0.85
10070	0.236/0.234	0.235	10.67	1.30
10333	1.182/1.122	1.152	70.29	6.40
Случај				
Стандард/ примерок	**Екстинција (нм)**	**Средна вредност (нм)**	**Концентрација**	**Сооднос**
Ст. 1			0	**Фактор 0.30** **Cut-off**
Ст. 2			4	
Ст. 3			8	
Ст. 4			20	
Ст. 5			40	
Ст. 6			100	
Позитивна проба				
Негативна проба				
Примерок 1				
Примерок 2				
Примерок 3				

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 20: ОРГАН СПЕЦИФИЧЕН АВТОИМУНИТЕТ

20.1. Орган специфични автоимуни заболувања

20.1.1. Ендокрини автоимуни болести

Противтелата кон париеталните гастрични клетки и интринзичниот фактор, секреторен продукт на париеталните клетки, се силно поврзани со автоимуниот (тип А) гастритис и перниciозна анемија. Во комбинација, двете авто-противтела се високо специфични (90%) за автоимун гастритис и перниciозна анемија, додека не постои поврзаност со антралниот (тип Б) гастритис кој типично се сретнува кај дуоденален улкус и инфекција со *Helicobacter pylori*.

20.1.1.1. Противтела кон париетални гастрични клетки

Автопротивтелата кон гастричните париетални клетки често (40%) се присутни кај други орган-специфични автоимуни болести, особено кај болни од автоимуна тироидна болест. Присутни се во помал титар кај 10-15% од постари пациенти без да постои некаков доказ за присуство на автоимуна болест.

Овие противтела се специфични за париеталните клетки и реагираат или со бета-поединицата од H^+ и K^+ АТР-аза или со интринзик факторот.

20.1.1.2. Противтела кон интринзик факторот

Интринзик факторот е гликопротеин со маса 70 кДа секретиран од париеталните клетки од гастричната мукоза, а служи како врзувачки и транспортен протеин за витаминот Б12. Автопротивтелата насочени кон него може да се

поделат во две групи. *Тип 1 противтелата* се блокирачки противтела кои го инхибираат врзувањето на витамин Б12 и се сретнуваат кај 70% од болните со перниционзна анемија. *Тип 2 противтелата* се врзувачки противтела кои се врзуваат за интринзик факторот и за комплексот интринзик фактор-витамин Б12 и така спречуваат да дојде до апсорбција во цревата, а се сретнуваат кај околу 35% од болните со перниционзна анемија.

20.1.1.3. Автопротивтела поврзани со дијабетес

Постојат повеќе автопротивтела поврзани со инсулин зависниот дијабетес, но сите се со ограничено клиничко значење за терапијата на болеста. Нивното значење е за евентуално предвидување развојот на болеста кај роднини на болни со дијабетес. При испитување на асимптоматска, а високо ризична популација за дијабетес, позитивен одговор на две или повеќе противтела од автопротивтелата кон декарбоксилаза на глутаминската киселина, кон клетки од панкреасните островчиња или кон инсулин, е поврзан со висока инциденца за почеток на дијабет во следните 5 до 7 години. Најчесто, околу 75% од пациентите со дијабет се позитивни за автопротивтела кон панкреасните островчиња во моментот на дијагноза на болеста. Овие противтела се реактивни со целите островчиња, вклучително со алфа- и бета-клетките, а препознаваат и клетки кои создаваат глукагон, соматостатин и инсулин. Противинсулинските противтела се присутни кај околу 40% од ново дијагностицираните пациенти со дијабет. Нивната концентрација се намалува со возраста па така присутни се скоро кај сите пациенти под 4 години старост, но само кај околу 4% од возрасните.

20.1.1.4.Тироидни автопротивтела

Постојат различни автопротивтела поврзани со автоимуната тироидна болест, кои се карактеризирани како примарни (насочени кон мембранските рецептори и се директно патогени) или секундарни (не се директно патогени, но служат како корисни дијагностички маркери).

Примарни тироидни противтела. Најдобро познатото примарно тироидно автопротивтело е долго-делувачкиот тироиден стимулатор ЛАТС (long-acting thyroid stimulator), кое е ИгГ противтело насочено кон екстрацелуларниот домен на ТСХ рецепторот. Ова стимулаторно противтело е од значење за дијагностика на Гравес-ова болест и има големо значење за точна класификација на неонатална тироидна дисфункција.

Секундарни тироидни противтела. Најважни во оваа група автопротивтела се противтела кон тироглобулинот (ТГ) и противтела кон тироидната пероксидаза (ТПО). Покажано е дека само кај 1% од пациентите со автоимуна тироидна болест може да се утврдат против-ТГ противтела во отсуство на против-ТПО противтела. Така, клиничкото значење на против-ТГ противтелата е ограничена на мала група на

пациенти со симптоми за автоимуна тироидна болест кои се негативни за против-ТПО противтела.

20.1.2. Гастроинтестинални автоимуни болести

20.1.2.1. Противтела поврзани со целијакија

Целијакијата е постојана интолеранција на глутен која води до атрофија на цревните ресички кај осетливите лица за глутен, што претставува дефинитивна дијагноза на целијакијата. За повеќето клеточни и хуморални имунолошки абнормалности, одговорен е алфа-глијадинот, протеинска фракција од пченицата. За дијагноза на целијакијата се користи скрининг на против-глијадински противтела, противтела кон ретикулин и против-ендомизијални противтела. Секој од овие тестови е со различна специфичност и сензитивност. Циркулирачките ИгА противтела кон глијадин имаат скоро 100% специфичност, но се со релативно ниска сензитивност. ИгГ противтелата кон глијадин, пак, имаат пониска специфичност, но повисока сензитивност. Ако се користат истовремено, двата вида противтела овозможуваат специфичност од 90% и сензитивност од 95% во дијагностицирањето на целијакија. ИгГ противтела кон глијадин може да се сретнат кај мал процент на болни од улцеративен колитис, ИгА нефропатија, Кронова болест, ревматоиден артрит и интолеранција на кравјо млеко.

20.1.3. Автоимуна болест на црниот дроб

Најчесто, противтела кои се поврзуваат со автоимуни болести на црниот дроб се митохондријални противтела,

Табела 20.1: Противтела поврзани со автоимуна болест на црниот дроб.

Противтело	Поврзана болест	Фреквенција
M1	Сифилис (активна болест) Системски лупус еритематозус Системска склероза Сјогренов синдром Ревматоиден артрит Антифосфолипиден синдром	100% 50% 15% 100%
M2	Примарна билијарна цироза Хронична болест на црн дроб Системска склероза Ревматоиден артрит	94% 30% 15% 4%
M3	Псевдо лупус еритематозус синдром - предизвикан со пиразолон	100%
M4	Примарна билијарна цироза Билијарна цироза и склеродерма	50% 40%
M5	Ревматски болести Системски лупус еритематозус Антифосфолипиден синдром	Ретко
M6	Хепатит предизвикан со ипрониазид	100%
M7	Миокардит Кардиомиопатија	60% 30%
M8	Примарна билијарна цироза	50%
M9	Примарна билијарна цироза -M2 негативен -M2 позитивен Автоимун хепатит Акутен и хроничен хепатит	 80% 35% 10% 3%

противтела кон мазните мускули и противтела кон црнодробни/бубрежни микрозоми. Во најголем дел од случаите, титарот на овие противтела е од клиничко значење. Така, висок титар на митохондријални противтела е поврзан со примарна билијарна цироза во повеќе од 95% од случаите, додека низок титар на овие противтела се сретнува кај хроничен активен хепатит, механичка билијарна опструкција и неколку други автоимуни болести. За повеќето од различните митохондријални противтела, нумерирани од М1 до М9, главно се познати противгенските цели, а поврзани се со различни болести.

20.1.4. Противтела поврзани со невромускуларни болести

20.1.4.1. Противтела кон ацетилхолински рецептори

Овие противтела се откриени кај болни со мијастенија гравис, а се сретнуваат во пониска концентрација и кај болни со окуларна мијастенија. Постојат 3 типа вакви противтела: врзувачки, блокирачки или модулирачки противтела. *Врзувачките противтела* се реактивни кон неколку епитопи од моторната плоча и не го препознаваат ацетилхолинското врзувачко место. Се сретнуваат кај 88% од болните со активна мијастенија. *Блокирачките противтела* реагираат со ацетилхолинското врзувачко место и се сретнуваат кај 50% од болните со активна болест. *Модулирачките противтела* некогаш се од помош за дијагноза на болни со мијастенија гравис, кои се негативни за останатите два вида на противтела.

20.1.5. Автопротивтела поврзани со бубрежна болест

20.1.5.1. Противтела кон гломерулската базална мембрана

Овие противтела се сретнуваат кај класичен нелекуван Гудпастеров синдром (Goodpasture syndrom) и се насочени кон неколагенскиот дел од алфа-3 веригата во тип IV колагенот. Класичната презентација на оваа болест е рапидно прогресивен гломерулонефрит. Поради сличноста на противгенските епитопи помеѓу реналната и белодробната алвеоларна мембрана, можна е истовремена појава и на пулмонални хеморагии и хемоптизии. Висок титар на овие противтела може да перзистира дури и по клиничка ремисија и споро се намалува во тек на неколку месеци. Ренална трансплантација е опција за лекување само кај пациенти негативни за противтела, заради избегнување на ремисија на болеста.

20.2. Задачи

20.2.1. Определи концентрација на тироидни автопротивтела (ТГ и ТПО)

Концентрацијата на тироидните автопротивтела на Институтот за имунобиологија и хумана генетика се определува со UniCap-101 посвтен само за таа намена (Слика 20.1). Поради високата флуоресценција која се користи при определувањето на автопротивтелата, истовременото користење на апаратот за испитување алергии и за испитување автопротивтела доведува до загадување на дискот, поради што е најдобро да се користат два одделни апарати за овие две намени.

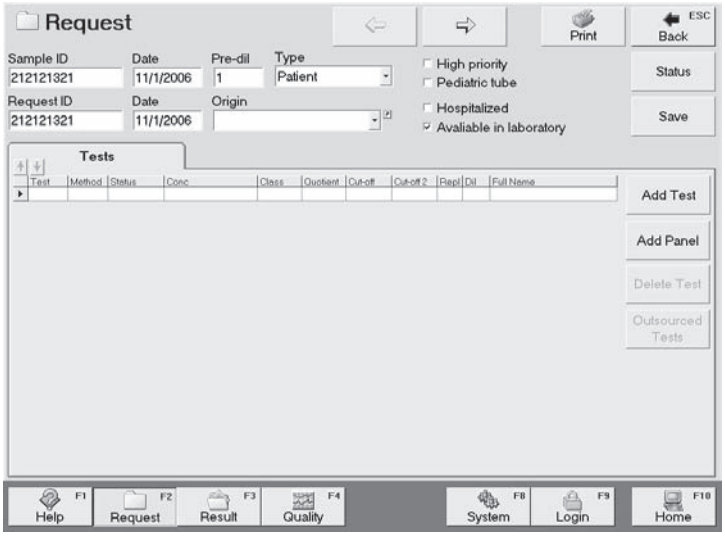
Прво се вклучува компјутерот, а веднаш потоа апаратот. Со двојно кликнување на иконата ImmnunoCAP Information Data Manager се влегува во програмата (софтвер) преку која се поврзани апаратот и компјутерот.

Откога ќе се вклучи прогармата на екранот со слика се прикажани двата апарата (UniCap 100 и UniCap 101), а под нив на долниот дел се гледаат икони преку кои се контролира работата. Веднаш под сликата на апаратот може да се види дали апаратот е вклучен (во тој случај има жолто светло и пишува "free"-слободно), исклучен (црвено светло и пишува



Слика 20.1: УниКап-101 (UniCap-101) автоматизиран лабораториски систем на Институтот за имунобиологија и хумана генетика, Медицински факултет, Скопје специјално наменет за определување автопротивтела.

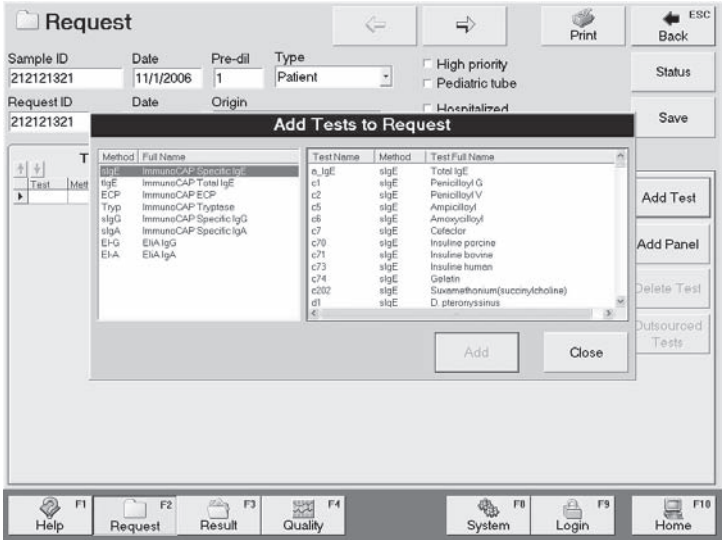
"off-line") или ако работи имаме зелено светло и пишува "assay" (Слика 16.3). Кога ќе видиме дека апаратот ја постигнал потребната температура и се поврзал со компјутерот (тоа се гледа со жолта боја на екранот или на екранот од самиот апарат пишува: prepare run? (подготви се за работа)), кликнуваме еднаш на иконата на долниот дел од екранот на која пишува "request" (барање) или притискаме Ф2. Тогаш, ни се прикажуваат сите пациенти кои дотогаш се изработени. Од десната страна на екранот има 3 икони преку кои се внесуваат нови пациенти (иконата со ознака



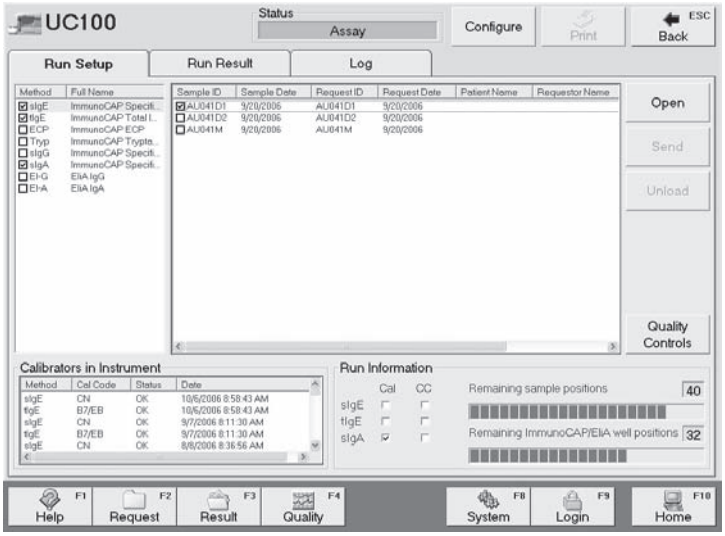
Слика 20.2: Екраноm за внесување автопротивтела (панели) на апаратот УниКап-101 (Uni-Cap-101).

"new"), се отвараат веќе изработените (икона – "open") или се бришат некои податоци (икона – "delete") (Слика 20.2).

Под нив има наредби со чие селектирање може да се видат сите изработени пациенти, оние кои не се почнати да се работат, оние кои во моментот се работат и податоците или резултатите кои сме ги одобриле или одбиле. Со клик на првата икона ("new") влегуваме во прозорецот кадешто се внесува лабораторискиот број на пациентот и каде што се бираат анализите кои треба да се изработат. Во квадратчето со ознака "Sample Id" се внесува лабораторискиот број на пациентот и се притиска "enter". Сега од страната ни се активираат две икони од кои во првата ги има сите тестови кои се работат со овој апарат, а во втората се тестови кои се работат според дијагнозата на пациентот и се нарекуваат *панели*. Со клик на првата икона "add test" се покажува табела која е поделена на два дела. Од левата страна се методите кои се работат на овој апарат. Методот се бира со негово означување и притискање на "enter". На десната страна се наоѓаат специфичните алергени кои се бираат на



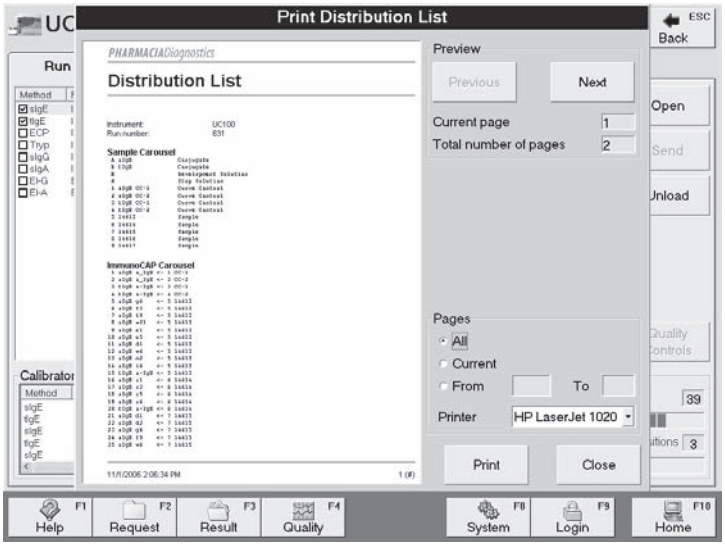
Слика 20.3: Екраноm за избор на методите кои сакаме да ги работиме на апаратот УниКап-101 (UniCap-101).



Слика 20.4: Екранот за избор на пациентите кои сакаме да ги работиме на апаратот Уни-Кап-101 (UniCap-101).

ист начин. Потоа се затвора табелата и се кликнува на иконата "save" за да се запаметат бараните податоци. На овој начин се внесуваат сите пациенти (Слика 20.3).

По внесувањето на пациентите и нивните анализи се враќаме на почетната страна (страната на која што има слика од апаратите) со притискање на икона на која што пишува "back" . Потоа кликнуваме два пати на апаратот кој што сакаме да го пуштиме. Ни се отвараат две табели. На левата страна ги гледаме сите методи кои се работат со овој апарат и со кликнување на празните квадратчиња се бираат методите кои планираме да ги работиме (Слика 20.4). Со самото бирање на методот на десната страна ни се прикажуваат сите лабораториски броеви на внесените неизработени пациенти кои ги содржат бараните анализи. Откога ќе го одбереме методот и ќе ни се покажат на екранот пациентите кои треба да се работат почнуваме со нивно селектирање на ист начин односно со кликнување на коцките пред лабораторискиот број.



Слика 20.5: Листа на распределба (Distribution list) е на апаратот Уни-Кап101 (Uni-Cap-101).

Сите стапки од понатамошниот процес се автоматизирани и од екранот на самиот апарат читаме што треба да се направи. Прво не прашува дали горе опишаните кантички се полни и правилно распоредени. Одговорот се врши со притискање на копчињата "yes" и "no" на тастатурата од самиот апарат. Потоа се внесуваат серумите на пациентите (има точно определена позиција за секој серум, а таа може да се види и од листата на распределба). Откога ќе се внесат серумите се става контрола за калибрационата крива која е со ознака EL-GCC1.

Потоа се внесуваат реагенсите кои ни се потребни. Коњугатот за ELIAIgG, стои секогаш на позиција А на надворешниот носач. При ставањето на коњугатот апаратот бара да се внесе специфичниот код од калибрацијата за тој месец.

Се внесува развоен раствор (development solution) на позиција Е и запирачки раствор (stop solution) на позиција Х и се внесува раствор за разредување (дилуент) на позиција Г. При внесување на серумите, после секој серум се става празна епруветка во кој самиот апарат автоматски прави разредување на серумот од пациентот. Потоа започнува со една слепа проба којашто трае 2 мин, пришто тој ги проверува кантичките и дали се е ставено на соодветното место. Од екранот може да видиме кое автопротив-тело треба да се внесе. Автопротивтелата се редат на внатрешниот носач. Во овој систем автопротивтелата се фиксирани на топчиња кои се наредени во пенкала. Од надвор се поставува пенкалото, а апаратот сам ги зема и ги реди на точно определената позиција.

Добиените резултати се внесуваат во формулар погоден за таа намена (Табела 20.2).

Табела 20.2: Внесување резултати од автопротивтела од UniCap-101.

Кратенка	МЕТОД	Резултат (ИЕ/мЛ)	Интерпретација на резултатот (ИЕ/мЛ)
ТПО	ЕЛИСА	/	негативно < 60, гранично 60-100, позитивно > 100
	ЕЛИА		негативно < 0.02
ТГ	ЕЛИСА	/	негативно < 60, гранично 60-100, позитивно > 100
	ЕЛИА		негативно < 0.02

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата _____ Студент (име и презиме) _____ Асистент (потпис и печат) _____

ВЕЖБА 21: АНАЛИЗА НА АВТОИМУНИ ЗАБОЛУВАЊА

21.1. Нормални вредности за системски автопротивтела

Нормалните вредности за системските автопротивтела се искажуваат различно зависно од употребената метода. Во морфолошките испитувања, како што е имунофлуоресценцијата, тие се дефинираат како позитивни (со искажувања на интензитет во облик на плусеви) или негативни. Имунофлуоресценцијата може да даде и описни резултати, како на пример во кој дел од клетката се гледа флуоресценцијата, каков облик има и слично.

Во квантитаивните мерења автопротивтелата можат да се искажат како титар на автопротивтела (титар е реципрочна вредност во најголемото разредување кога е видлива реакција), како апсолутна вредност во меѓународни единици во еден милилитар (ИЕ/мЛ), или како релативни квантитативни соодноси (Табела 21.1). На табелата се дадени ***смеши*** и ***одделни автопротивтела***. Смешите се испитуваат кога сакаме да видиме дали воопшто постои зголемување на било кое од составните автопротивтела. Ако е резултатот негативен не правиме дополнителни испитувања, но доколку е позитивен се испитуваат сите одделни автопротивтела кои ги има во смешата. На тој начин се рационализира потребниот број испитувања, се штедат време и пари. За полесно комуницирање со клиничките доктори внесени се кратени за секое автопротивтело, како и методот со кој се испитуваат (ВАРЕЛИСА или ЕЛИА).

Интерпретацијата на резултатите може да биде квантитативна и/или квалитативна. Се гледа дека смешите од противтела можат да се анализираат само квалитативно (негативно, гранично или позитивно), додека одделните автопротивтела можат да бидат анализирани само квантитативно (негативно, гранично или позитивно) или и на двата начини. Секако дека вредностите на одделните автопротивтела варираат зависно од осетливоста на употребената метода и од нивната количина во серумот.

Табела 21.1: Нормални вредности на автопротивтелата кај системските заболувања.

АВТОПРОТИВТЕЛО	КРАТЕНКА	МЕТОД	ИНТЕРПРЕТАЦИЈА (ИЕ/мЛ)	ИНТЕРПРЕТАЦИЈА (сооднос)
Смеши				
Смеша од антинуклеарни противтела (RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Центромер B, Scl-70, Jo-1, прочистен Sm протеин)	Sy	ЕЛИА	/	негативно <0.7 гранично 0.7-1.0 позитивно >1.0
Смеша од антинуклеарни противтела (dsDNA, RNP, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, Центромер B, Scl-70, Jo-1)	ANA Screen	ЕЛИСА	/	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Одделни автоантитела				
Противмитохондријални противтела	M2П	ЕЛИСА	негативно < 3 гранично 3-5 позитивно > 5	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон базалната мембрана на гломерулите (кон алфа3-ланецот од тип IV колагенот)	GBMA	ЕЛИСА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
Противтела кон двоверижна ДНК	ds-DNAA	ЕЛИСА	негативно < 35 гранично 35-55 позитивно > 55	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 10 гранично 10-15 позитивно > 15	/
Противтела кон едноверижна ДНК	ss-DNAA	ЕЛИСА	негативно < 35 гранично 35-55 позитивно > 55	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон рибонуклеарните протеини со уридин	U1RNPA	ЕЛИСА	негативно < 5 гранично 5-9 позитивно > 9	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 5 гранично 5-10 позитивно > 10	/
Противтела кон субклеточните SS-A/Ro партикли од RNP	SS-A/Ro-RNPA	ЕЛИСА	негативно < 3 гранично 3-8 позитивно > 8	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
Противтела кон субклеточните SS-B/La партикли од RNP	SS-B/La-RNPA	ЕЛИСА	негативно < 3 гранично 3-8 позитивно > 8	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
Противтела кон рибонуклерен протеин-70	RNP70	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
Противтела кон центромерниот протеин Б	CENP	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
		ЕЛИСА	негативно < 3 гранично 3-8 позитивно > 8	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон Sm протеинот	SmA	ЕЛИСА	негативно < 10 гранично 10-15 позитивно > 15	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
		ЕЛИА	негативно < 5	/

21.2. Нормални вредности за орган специфични противтела

Нормалните вредности за орган специфичните автопротивтела се дадени на Табела 21.2. Нивното прикажување е слично како и кај системските автопротивтела, само што молекулите кои се испитуваат се однесуваат специфично за определен орган.

На табелата се дадени нормалните вредности на автопротвтелата во ендокриниот систем и автопротивтелата во гастроинтестиналниот систем, додека нормалните вредности за автопротивтелата на другите органски системи не се дадени.

АВТОПРОТИВТЕЛО	КРАТЕНКА	МЕТОД	ИНТЕРПРЕТАЦИЈА (ИЕ/мЛ)	ИНТЕРПРЕТАЦИЈА (соодносс)
Ендокрини заболувања				
Противтела кон тиреоглобулин	TG	ЕЛИСА	негативно < 60 гранично 60-100 позитивно > 100	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон тиреоидна пероксидаза	TPO	ЕЛИСА	негативно < 60 гранично 60-100 позитивно > 100	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон сперматозоидите	СП	ЕЛИСА	негативно < 14 гранично 14-20 позитивно > 20	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Гастроинтестинални заболувања				
Противтела кон микрозомите од црниот дроб/бубрезите	LKM1A	ЕЛИСА	негативно < 2 гранично 2-3 позитивно > 3	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон париеталните клетки на желудникот	ПКЖП	ЕЛИСА	негативно < 10 гранично 10-15 позитивно > 15	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Противтела кон мазните мускулни клетки	SMA	ЕЛИСА		негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Против ИгА противтела кон ткивна трансглутаминаза	ATAIgA	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
		ЕЛИСА	негативно < 5 гранично 5-8 позитивно > 8	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Против ИгГ противтела кон ткивна трансглутаминаза	ATAIgG	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
		ЕЛИСА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Против ИгА противтела кон глијадин	AGAIgA	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
		ЕЛИСА	негативно < 11 гранично 11-17 позитивно > 17	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Против ИгГ противтела кон глијадин	AGAIgG	ЕЛИА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	/
		ЕЛИСА	негативно < 11 гранично 11-17 позитивно > 17	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4
Против ИгГ противтела кон Helicobacter pylori	AHpAIgG	ЕЛИСА	негативно < 7 гранично 7-10 позитивно > 10	негативно <1.0 гранично 1.0-1.4 позитивно >1.4

Табела 21.2: Нормални вредности на автопротивтелата кај орган специфичните заболувања.

21.3. Толкување системски автопротивтела

Принцип на процедурата. ЕлиА бунарчињата се обложени со соодветен противген. Доколку се присутни во анализираниот примерок, автопротивтелата се врзуваат за противгенот. По плакнење на неврзаните противтела, против ИгГ противтелата обележани со ензим (ИгГ конјугат) се додаваат за да се формира противтело-конјугат комплекс. По инкубација неврзаниот конјугат се измива и врзаниот комплекс се инкубира со раствор за развивање. Потоа се мери флуоресценција и се споредува со стандардна права изработена за соодветни калибратори по што се добива квантитативен резултат изразен како ИЕ/мЛ (интернационални единици на милилитар).

Пресметување и интерпретација на резултатите. Апаратот мери концентрација на ИгГ во мг/Л. Со користење фактор на конверзија дефиниран од специфичниот код на ЕлиА резултатите автоматски се конвертираат во ИЕ/мЛ (интернационални единици на милилитар) (ИЕ/мл).

21.3.1. Автопротивтела кон двоверижна ДНК (двДНК)

Примена. ЕлиА двДНК тестот служи за квантитативна *ин витро* детекција на ИгГ противтела насочени кон двоверижна ДНК во серум или плазма. Спаѓа во антинуклеарни антитела (АНА) и е високо специфичен обележувач кој претставува еден од дијагностичките критериуми за СЛЕ. Дури 90% од пациентите со активен СЛЕ имаааат авто противтела кон двоверижна ДНК. Овој маркер е важен и за следење на активноста на болеста, особено кај оние болни со засегање на бубрезите преку следење титарот на авто противтелата.

21.3.2. U1RNP

Примена. ЕлиА U1RNP тестот служи за *ин витро* квантитативно мерење на ИгГ противтела кон U1RNP во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на мешана болест на сврзното ткиво и системски лупус еритематозус.

Објаснение на тестот. Одредувањето на антинуклеарните антитела (АНА) е од централно значење за клиничка дијагноза на болести на сврзното ткиво. У1-снРНП противтелата типично се присутни кај болни од СЛЕ (во 30-40% од случаите) и мешана болест на сврзните ткива (синдром на Sharp), каде се неопходни за поставување на дијагнозата. Иако имунолошкиот одговор со против-У1-снРНП противтела подразбира присуство кон трите протеински компоненти (70 кДа, А, Ц), против-70 кДа противтелата - особено кај случаите со висок титар, се поспецифични за мешана болест на сврзните ткива, бидејќи се поретко присутни кај болни со СЛЕ (приближно кај 12%), отколку противтелата кон А и Ц протеините (приближно кај 23%). Неколку студии покажуваат дека против-У1-снРНП одговор во отсуство на против-70 кДа противтела е силно асоциран со СЛЕ.

21.3.3. РНП70

Примена. ЕлиА РНП70 тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон РНП70 во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на мешана болест на сврзното ткиво и системски лупус еритематозус.

21.3.4. См

Примена. ЕлиА См тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон См во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на системски лупус еритематозус.

21.3.5. Ро

Примена. ЕлиА Ро тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон Ро во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на Сјегренов синдром и системски лупус еритематозус.

21.3.6. Ла

Примена. ЕлиА Ла тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон Ла во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на Сјегренов синдром и системски лупус еритематозус.

21.3.7. ЦЕНП

Примена. ЕлиА ЦЕНП тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон ЦЕНП во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на склеродермија (ЦРЕСТ синдром).

21.3.8. Сцл-70

Примена. ЕлиА Сцл-70 тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон Сцл-70 во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на склеродермија (дифузна форма).

21.3.9. Јо-1

Примена. ЕлиА Јо-1 тестот служи за ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела кон Јо-1 во човечки серум и плазма, кои се важни во клиничката дијагноза на полимиозитис/дерматомиозитис.

21.3.10. Автопротив тела кон протеиназа 3 (ПР3)

Со оваа метода се врши ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела насочени кон протеиназа 3 (ПР3) во серум и плазма.

Спаѓа во АНКА и е маркер за Вегенерова грануломатоза (високо специфични - 97%, и сензитивни - 81%), а позитивен е и кај пациенти со микроскопски полиангиитис (васкулитис на малите крвни садови), Chrug – Strauss Sy (алергичен грануломатозен васкулит), некротизирачки гломерулонефритис.

21.3.11. Автопротив тела кон миелопероксидаза (МПО)

Со оваа метода се врши ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела насочени кон миелопероксидаза (МПО)

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Системски лупус еритематозус:
Случајот на Николина Цековска, премногу сонце на плажа.

во серум и плазма.

Спаѓа во АНКА и е позитивен кај пациенти со микроскопски полиангиитис (васкулитис на малите крвни садови), Chrug – Strauss Sy (алергичен грануломатозен васкулит), некротизирачки гломерулонефритис.

21.3.12. Автопротив тела кон алфа3 ланецот на колаген 4 (ГБМ)

Со оваа метода се врши ин витро квантитативно мерење на ИгГ противтела насочени кон алфа3 веригата од колаген 4.

Спаѓа во АНКА и е позитивен кај пациенти со Гудпастеровиот синдром (Goodpasteure syndrom), анти-ГБМ болест, АНКА асоциран васкулитис.

21.3.13. Кардиолипински противтела

Примена. Варелиса тестот за кардиолипински противтела (ПКП) служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на ИгГ или ИгМ противтела кон кардиолипин во хуман серум или плазма, кои се важни за дијагноза на примарна антифосфолипиден синдром и за евалуација на тромбо-тичниот ризик кај пациенти со СЛЕ.

Објаснение на тестот. Антикардиолипинските противтела припаѓаат на групата антифосфолипидни противтела. Најпрво тие биле откриени кај болни од сифилис, а покасно и кај болни од СЛЕ и други ревматски болести. Антифосфолипидниот синдром познат и како синдром на Hughes, се карактеризира со типична клиничка слика која вклучува артериска/венска тромбоза или рекурентни абортуси и присутни антифосфолипидни противтела.

Околу 5% од нормалната навидум здрава популација може да биде позитивна за ПКП. Големината на оваа група се зголемува со текот на стареењето. Против-кардиолипинските противтела се карактеристични за противфосфолипидниот синдром (ПФС) (примарен или секундарен), а се среќаваат со преваленца од 30-40% и кај пациентите со СЛЕ. Нивна клиничка манифестација би била појавата на тромбоза, повторувачки абортуси, тромбо-цитопенија, невролошки пореметувања и др. ПКП кај противфосфолипидниот синдром се сретнуваат со следнава преваленца:

а) Кај примарен ПФС - Кардиолипински ИгГ 81%, ИгМ 40% и ИгА 24%.

б) Кај секундарен ПФС - Кардиолипински ИгГ 85%, ИгМ 65% и ИгА 10%.

Нормалните вредности можат да варираат во зависност од

Табела 21.3: Нормални вредности на противкардиолипински противтела (ПКП).

Проценка	Квантитативно одредување	Квалитативно одредување
Негативно	<10 Е/мл	Сооднос <1.0
Сомнително	10-15 Е/мл	Сооднос 1.0-1.4
Позитивно	> 15 Е/мл	Сооднос > 1.4

популацијата, начинот на исхрана, лабораториските техники кои се користат и од селекцијата на контролната група од која се изведени.

Анти кардиолипинските противтела присутни кај инфективни болести или кај антифосфолипиден синдром може да се разликуваат според нивната зависност од кофактори: кај пациентите со инфективна болест противтелата се насочени кон чист фосфолипид како противген, додека противтелата кај пациенти со ПФС бараат гликопротеин 1 како кофактор. Овие противтела се значајни заради зголемена тенденција за венска/артериска тромбоза (вклучително апоплексија), тромбоцитопенија, чести абортуси и неуролошки манифестации на пациенти позитивни за овие противтела.

Зголемени нивоа на овие противтела се сретнуваат и кај пациенти со цереброваскуларна инсуфициенција или миокарден инфаркт.

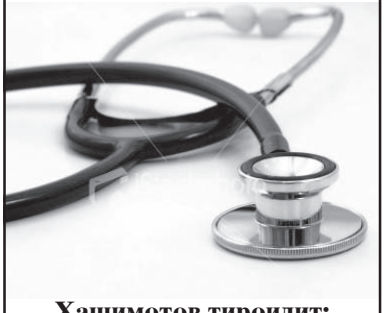
21.4. Толкување орган специфични автопротивтела

21.4.1. Антитироглобулински противтела (ТГ)

Примена. Варелиса ТГ (Тироглобулин) тестот служи за квантитативно и квалитативно одредување на противтироглобулински противтела во серум или плазма кои се важни за клиничка дијагноза на тироидна болест како на пр. автоимун тироидитис и Гравес-ова болест.

Објаснение на тестот. Тироидните автоимуни болести се група на различни, но патогенетски поврзани орган-специфични заболувања на тироидната жлезда, карактеризирани пред се со присуство на авто противтела кон тироидни противгени, како на пр. тироглобулинот (ТГ), тироидната пероксидаза (ТПО) или ТСХ рецепторот. Повеќе од 98% од болните со тироидитис имаат противтела кон ТГ, ТПО или и двата. Автопротивтела кон ТГ се присутни кај повеќето пациенти со гушавост (Хашимотов тироидит), кај повеќе од 30% од болните со Гравес-ова болест и во варијабилен процент од пациенти со друга автоимуна болест на тироидеја, како на пр. тивок тироидитис, постпартален тироидитис, или пак перницiозна анемија, дијабет и Адисонова болест. Зголемени нивоа на ТГ противтела се сретнуваат и кај здрави индивидуи (од 3,2% до 17,8% во селектирана женска популација).

АНАЛИЗА НА СЛУЧАЈ



Хашимотов тироидит: Случајот на Благуња Сетолска, безболно отечување на вратот.

21.4.2. ТПО

Примена. Варелиса ТПО тестот служи за квантитативно и квалитативно одредување на против-ТПО (тироидна пероксидаза) противтела во серум или плазма кои се важни

за клиничка дијагноза на тироидна болест како на пр. автоимун тироидитис и Гравес-ова болест.

Објаснение на тестот. Хроничниот автоимун тироидитис (Хашимото тироидитис) е оригиналната парадигма за автомуна болест воопшто. Ги зафаќа жените 4 до 20 пати почесто од мажите, а најчесто се јавува кај жени на возраст помеѓу 30 и 60 години. Противтела кон ТПО имаат повеќе од 70% од болните со Гравес-ова болест и во различен процент пациенти со нетироидна автоимуна болест и нормални индивидуи. Титарот на овие автопротивтела не корелира со функционалниот тироиден статус.

21.4.3. Противтела кон париетални клетки

Примена. Варелиса тестот за автопротивтела кон париетални клетки служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на овие противтела во серум или плазма кои се важни за клиничка дијагноза на пернициозна анемија.

Објаснение на тестот. Пернициозната анемија е орган специфична автоимуна болест на гастричната мукоза, која се карактеризира со хроничен атрофичен гастритис од тип А, ахлорхидрија, недостаток на продукција на интринзик фактор, малапсорбција на вит. Б12 и присуство на противтела кон париеталните клетки и кон интринзик факторот. Болеста претежно зафаќа белци со Северно европско потекло. Најчеста причина е дефицит на вит. Б12. Кај повеќе од 90% од сите пациенти со пернициозна анемија може да се детектираат циркулирачки противтела кон париеталните клетки. Овие противтела често може да се најдат и кај роднини на пациенти со пернициозна анемија (20-30%).

21.4.4. Тест за ГБМ противтела

Примена. Варелиса тестот ГБМ служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на противтела кон конституент на гломеруларната базална мембрана (алфа3 веригата од колаген тип 4) во хуман серум или плазма, а важни се за дијагноза на бубрежни заболувања.

Објаснение на тестот. Противтелата кон базалната гломеруларна мембрана се еден од трите специфични критериуми за дијагноза на Гудпастеровиот синдром. Останатите два критериуми за орган-специфично автоимуно заболување вклучуваат рапидно прогресивен гломрулонефритис и пулмонални хеморагии. Дополнително и други автоимуни болести (како ANCA асоциран васкулитис) може да се придружени на Гудпастеровиот синдром. Бидејќи ГБМ противтелата се патогени за бубрегот, нивно детектирање укажува на висок ризик за развивање на акутна бубрежна слабост. Затоа нивното откривање не е само важно за дијагноза на овој синдром, туку е важно и за пациенти со гломерулонефритис, позитивен резултат за

ANCA или во припрема на трансплантација. Противгенот за кој ГБМ противтелата се специфични се наоѓа скоро исклучиво во базалните мембрани на бубрегот и белите дробови. Бидејќи противтелата се насочени кон т.н. "неколагени" домени кои се скриени во нивната нативна структура, за детекција на противтелата се користи денатуриран противген. Тоа е тешко да се постигне со индиректната имунофлуоресценција и заради тоа овие тестови се со мала сензитивност. Тоа ги прави ЕЛИСА тестовите кои користат денатуриран прочистен противген (вклучително и Варелиса ГБМ тестот) метод од избор за детекција на ГБМ противтелата.

21.4.5. Тест за противспермални противтела

Примена. Варелиса тестот за противспермални противтела служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на овие противтела во хуман серум или плазма, кои се важни за дијагноза на имунолошки условена субфертилност или инфертилност.

Објаснение на тестот. Во западните општества, инциденцата на инфертилност се движи помеѓу 10 и 15%. Постоењето на противтела кон сперматозоиди се претпоставувало долго време. Денес со сигурност се знае дека и мажите и жените создаваат противспермални противтела, што во голема мера може негативно да влијае на успехот во репродукцијата. Иако причините за постоењето на овие противтела сеуште не се јасно дефинирани, тие се признати како значаен фактор во етиологијата на имунолошки условената субфертилност. Кај мажите, сперматозоидите се скриени од имуниот систем со помош на т.н. крвно-тестикуларна бариера. Кога оваа бариера е пореметена, како при тестикуларна траума, вазектомија, опструкција на каналот на епидидимис или инфекција, сперматозоидите стануваат имуногени.

Помалку се знае за условите под кои се создаваат изопротивтелата кај жени. Се претпоставува дека неспецифични бактериски или вирусни инфекции може да водат до создавање на противтела кои вкрстено ги препознаваат сперматозоидите. Единствени противтела со клиничко значење се оние кои се специфични за спермалната плазматска мембрана. Тие го засегаат мотилитетот на сперматозоидите и воопшто нивното учество во оплодувањето преку пречки во пенетрацијата низ цервикалниот мукус, прикачувањето на сперматозоидот за јајце клетката, како и неговата пенетрација во јајце клетката и конечно самото оплодување.

21.4.6. Противмитохондријални противтела

Примена. Варелиса М2 тестот служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на митохондријални М2

противтела во хуман серум или плазма, кои се важни за дијагноза на примарна билијарна цироза.

Објаснение на тестот. Примарната билијарна цироза е хронична инфламаторна болест на црниот дроб. Раната фаза на болеста хистолошки се карактеризира со инфламаторни инфилтрати во перипорталните поростори, особено во регионот на септалните и интерлобуларни жолчни канали. Болеста напредува кон прогресивна деструкција на малите и средните жолчни канали што води до црнодробна фиброза, а во терминалниот стадиум на болеста доаѓа до комплетна цироза. Болеста може долго време да перзистира без симптоми. Најчесто започнува меѓу 40 и 60 години возраст, а 6 до 10 пати е почеста кај жени. Етиологијата сеуште не е позната, но се претпоставува дека е од автоимуна природа. Типична карактеристика на болеста е присуство на автопротивтела насочени кон митохондријални противгени. Денес се разликуваат 9 различни против-митохондријални противтела (М1 до М9). Од значење за примарната билијарна цироза се М2, М4, М8 и М9. М2 противтелата се сретнуваат кај околу 95% од болни со оваа болест.

21.4.7. ЛКМ1 противтела

Примена. Варелиса ЛКМ1 тестот служи за семиквантитативно и квалитативно одредување на ЛКМ1 противтела во хуман серум или плазма, кои се важни за дијагноза на автоимун хепатитис (АИХ).

Објаснение на тестот. Генерално, на автоимуниот хепатитис отпаѓаат 10-40% од сите хронични активни хепатитиси кои се негативни за ХбсАг. Постојат неколку повеќе или помалку специфични противтела кои се сретнуваат кај АИХ. Антинуклеарните противтела (АНА) и противтелата кон мазни мускули и актин се дијагностички релевантни за АИХ тип1, познат како лупоиден АИХ. Тоа е класичниот и најчест тип на автоимун хепатитис. АИХ тип 2 се јавува кај повеќе од 50% од децата со АИХ. Се карактеризира со противтела кон микрозомите од бубрег/црн дроб (ЛКМ). Тие реагираат предоминантно со 50 кД протеин идентификуван како П450 2Д6. Во овој тест се користи рекомбинантен хуман цитохром П450 2Д6 противген. Серолошкото раздвојување на двата типа на АИХ е значајно бидејќи АИХ тип 2 се смета за попрогресивен и кај него побрзо се развива цироза на црн дроб. 82% од болните со АИХ тип 2, наспроти 43% од болните со АИХ тип 1 развиваат цироза во тек на 3 години. Ретко постои позитивен резултат за ЛКМ противтелата и кај вирусен хепатит Ц (ХЦВ). Бидејќи терапијата на автоимун и вирусен хепатит е различна, терапевтските чекори треба внимателно да се избираат.

Вкупно бодови: _____ (присуство 0.5 бода, знаење од 0.0 до 1.0 бод)

Дата	Студент (име и презиме)	Асистент (потпис и печат)
_____	_____	_____

22. ОСНОВНИ ЛАБОРАТОРИСКИ ПРАВИЛА

1. За поефикасно да ги совладате практичните вежби по имунологија, предвидената содржина научете ја пред доаѓање на вежби;
2. Не е дозволено заменување на вежбите (во исклучителни состојби консултирајте се со Шефот на катедрата);
3. Заштитна облека (мантил) мора да се носи за цело време на изведување на вежбите/експериментите;
4. Секој студент е одговорен за одржување на неговата уредна и средена работна површина;
5. Не фрлајте хартија, стакло или пластика во мијалниците;
6. Не користете мобилни телефони за време на изведувањето на практичната настава;
7. За оштетување на опрема или прекумерно трошење на реагенси ќе се наплаќа соодветен паричен надоместок.

Безбедоноста е ваша основна грижа за време на вашиот престој во лабораториите, затоа земете ги во предвид следниве препораки:

1. Биолошките примероци кои се користат во лабораториските тестови (на пр. крв) треба секогаш да се третираат како потенцијално инфективни. Примероците од високо ризични пациенти се посебно означени и се работат во издвоени работни површини.
2. Директно изложување на ултравиолетно светло може да доведе до акутно оштетување на ретината од 30 минути до 24 часа по изложувањето. Затоа УВ светлото секогаш се гледа преку соодветно заштитно стакло;
3. Не јадете, не пијте и не пушете во лабораториите;
4. Не работете во лабораториите, освен во времето превидено за изведување на вежби;
5. Не внесувајте посетители во лабораториите без претходна дозвола на наставниците;
6. Не пробувајте да правите експерименти кои не се предвидени. За било какви модификации во работата, претходно побарајте дозвола од наставникот;
7. Не трчајте низ лабораториите.

Кога работите со хемикалии:

8. Не пипетирајте со уста, секогаш користете пипетори со продолжетоци за една употреба;
9. Секогаш носете заштитни ракавици и избегнувајте контакт на кожата со реагенсите, контролните примероци или примероците за испитување;
10. Никогаш не додавајте вода на концентрирани бази или киселини;
11. Никогаш не мешајте концентрирани бази и киселини;
12. Никогаш не истурајте запаливи супстанции во близина на пламен;
13. Никогаш не враќајте користен реагенс во ново шишенце.

Во случај на несреќа:

14. За било каков инцидент (дури и истурање неколку капки од некој реагенс) веднаш известете го вашиот наставник.

23. ЛИТЕРАТУРА

1. Hyde RM. National Medical Series for Independent Study. Immunology. Williams & Wilkins: Philadelphia, 1995:1-316.

2. Спироски М, Колевски П. Основни имунолошки методи. МЕДИС - информатика: Скопје, 1995.

3. Roitt I. Roitt's Essential Immunology. Blackwell Science: Oxford, 1997.

4. Спироски МЖ. ИМУНОСТ - 1. Имунолошка школа. Катедра за имунологија: Скопје, 1998.

5. Андреис И, Чуло Ф, Марушић М, Таради М. Имунологија. Медицинска Наклада - Загреб, 1998.

6. Paul WE. Fundamental Immunology. Lippincott - Raven: Philadelphia, 1999.

7. Janeway CA, Travers PWalport M, Capra JD. Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. Current Biology Publications: London, 1999.

8. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Mosby: London, 2000.

9. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology. Freeman: New York, 2000.

10. Abbas AK, Lichtamn AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Company: Philadelphia, 2000.

11. Наставни содржини од имунологија 1999/2000. Институт за имунобиологија и хумана генетика, Институти, Медицински факултет: Скопје 2000.

12. Спироски М, Трајков Д, Петличковски А, Арсов Т, Стрезова А, Ефинска-Младеновска О. Имунолошки практикум. Институт за имунобиологија и хумана генетика, Институти, Медицински факултет: Скопје 2005.