

**MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**Priručnik za nastavu iz
IMUNOLOGIJE**

Grupa autora

Beograd, 2020.

Priručnik za nastavu iz IMUNOLOGIJE

Autori:

Prof. dr Zorica Ramić
Prof. dr Vera Pravica
Prof. dr Dušan Popadić
Prof. dr Vladimir Trajković
Prof. dr Miloš Marković
Doc. dr Emina Milošević
Doc. dr Vladimir Perović
Asist. dr Marina Stamenković
Asist. dr Irena Vuković Petrović

Recenzenti: Prof. dr Marija Mostarica-Stojković
Prof. dr Tanja Jovanović

Na osnovu odluke Veća za redovnu nastavu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, br.2500/7 od 12.09. 2005. g., ova knjiga je odobrena kao stalni univerzitetski udžbenik

Izdavač: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu,
CIBID - Centar za izdavačku, bibliotečku i informativnu delatnost

Za izdavača: Prof. dr Nebojša Lalić, dekan Medicinskog fakulteta

Tehnički urednik: Vladimir Radević

Štampa: Presia i Medicinski fakultet, Beograd

Tiraž: 600

treće izdanje

© Copyright Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

ISBN 978-86-7117-559-3

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

616-097(075.8)(076)

PRIRUČNIK za nastavu iz imunologije / [Zorica Ramić ... et al.]. - 3. izd. -
Beograd : Medicinski fakultet Univerziteta, CIBID, 2020 (Beograd : Sprint :
Medicinski fakultet). - VII, 78, [10] str. : ilustr. ; 29 cm

Podaci o autorima preuzeti iz kolofona. - Tiraž 600.

ISBN 978-86-7117-559-3

1. Рамић, Зорица, 1949- [autor]

а) Имунологија -- Вежбе

COBISS.SR-ID 19463945

Ime predmeta: IMUNOLOGIJA

Sinopsis predmeta Imunologija

Cilj nastave predmeta Imunologija je da studenti ovladaju osnovnim znanjima o imunskom sistemu i njegovoj ulozi u održavanju zdravlja i učešću u patološkim procesima koji dovode do njegovog narušavanja. Kroz nastavu, studenti ovladavaju imunološkom terminologijom i stiču znanja o zadacima koje imunski sistem ima u organizmu, njegovim komponentama i organizaciji. Studenti uče i osnovne koncepte saradnje različitih komponenti imunskog sistema, što omogućava njihovu koordinisanu aktivnost, odnosno svrsishodan imunski odgovor. Zatim, studenti uče na koji način imunski sistem eliminiše različite infektivne agense i maligno transformisane ćelije. Pored toga, studenti uče pod kojim uslovima i na koje načine imunski sistem učestvuje u oštećenju organizma. Stiču se i osnovna znanja o mehanizmima delovanja vakcina, mogućnostima imunoterapije različitih bolesti, imunološkim aspektima transplantacije i posledicama nedovoljnog imunskog odgovora. Kroz vežbe se stiču znanja o imunološkim tehnikama koje se primenjuju u kliničkim laboratorijama i imunološkim parametrima koji se mogu analizirati u evaluaciji pacijenata. Stečeno znanje se na kraju primenjuje kroz diskusiju tokom prikaza kliničkih slučajeva.

Ovako osmišljena nastava iz Imunologije omogućava studentima da ovladavaju znanjima koja su im neophodna za praćenje nastave na drugim predmetima, profesionalnu komunikaciju sa kolegama i kritičko sagledavanje i analizu stručne literature.

Organizacija nastave iz Imunologije i način provere znanja studenata

Predmet Imunologija predstavlja jednosemestralan predmet na drugoj godini integrisanih studija medicine.

Broj časova nastave

Ukupan broj časova svih oblika nastave je 45, po 3 nedeljno (1 čas predavanja i 2 časa seminara/vežbi) u toku 15 nedelja zimskog semestra nastave.

Oblici nastave

Predavanja	15 časova (1/3 ukupnog fonda časova)
Seminari i vežbe	30 časova (2/3 ukupnog fonda časova)

Članovi katedre za Imunologiju

Nastavnici:	Prof. dr Vera Pravica Prof. dr Dušan Popadić Prof. dr Vladimir Trajković Prof. dr Miloš Marković Doc. dr Emina Milošević
Saradnici:	Doc. dr Vladimir Perović Asist. dr Marina Stamenković Asist. dr Irena Vuković Petrović
Šef Katedre:	Prof. dr Vladimir Trajković
Sekretar Katedre:	Asist. dr Irena Vuković Petrović

Kontakt

e-mail: imunologija@med.bg.ac.rs
tel: 011/3643-232
facebook: Antitelija Limfocitic
instagram: Antitelija

Literatura

Udžbenik:

Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Osnovna imunologija: Funkcionisanje i poremećaji imunskog sistema, Šesto izdanje, 2019. Izdavač Data Status, Beograd, 2019.

Dopunska literatura

Grupa autora: Priručnik za nastavu iz Imunologije. Izdavač, Libri Medicorum, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, CIBID, Beograd, 2020.

Mesto izvođenja nastave

Mesto održavanja predavanja je amfiteatar Instituta za patologiju.

Mesto održavanja seminara/vežbi su vežbaonice Instituta za mikrobiologiju i imunologiju.

Praćenje i evidentiranje nastave

Katedra za Imunologiju vodi evidenciju svih oblika nastave iz Imunologije kroz pisani protokol (Knjiga evidencije održane nastave). Postoje i lični studentski kartoni za evidenciju pohađanja nastave i aktivnosti studenata (karton se nalazi u Priručniku za nastavu iz Imunologije). Pored pisane, postoji i elektronska evidencija studenata na kompjuterima Katedre za Imunologiju.

Prisustvo studenta na seminarima/vežbama se evidentira. Student ima pravo na **dva izostanka** u toku semestra bez obaveze nadoknade. U slučaju većeg broja opravdanih izostanaka (tri ili četiri), student je dužan da kolokvira one seminare/vežbe sa kojih je izostao. Za studente koji imaju **pet ili više izostanaka primenjuje se Član 19** Pravilnika o organizaciji i izvođenju nastave na Medicinskom fakultetu.

Vreme održavanja nastave

Studenti su podeljeni u četiri grupe (kao i na ostalim predmetima na drugoj godini integrisanih studija iz medicine) od kojih svaka ima po tri časa predavanja, seminara i/ili vežbi iz Imunologije u jednom danu (od ponedeljka do četvrtka u zavisnosti od grupe).

Precizna satnica održavanja predavanja, seminara i/ili vežbi iz Imunologije, kao i predavanja iz predmeta koja se održavaju u Amfiteatru na patologiji, biće istaknuta pre samog početka nastave u školskoj 2020/2021. godini.

Način provere znanja i ocenjivanja studenata iz Imunologije

Studenti se ocenjuju tako što se uzima u obzir njihov rad tokom nastave (kontinuirano ocenjivanje), uspeh na kolokvijumu koji se održava posle 8. nedelje nastave i uspeh na završnom ispitu.

Kontinuirano ocenjivanje studenta podrazumeva sticanje bodova za aktivnost i uspešnost na ulaznim testovima (bodovi se evidentiraju u kartonima i u elektronskoj evidenciji studenata). Maksimalan broj bodova koji student može na ovaj način da stekne iznosi 15.

Bodovi za aktivnost u toku nastave se dobijaju na seminarima, vežbama i predavanjima (maksimalno 5 bodova u toku semestra). Pod aktivnošću se podrazumeva učešće u diskusiji, odličan odgovor na pitanje predavača ili pametno postavljeno pitanje (bodove dodeljuje nastavnik/saradnik koji vodi seminar/vežbu/predavanje).

Bodovi za ulazne testove se dobijaju za uspešno urađene ulazne testove koji se rade na početku seminara/vežbe. Test se polaže pismeno u vidu kratkog odgovora od nekoliko rečenica na jedno postavljeno pitanje. Pitanje se uvek odnosi na gradivo koje se prelazi na tom seminaru/vežbi/predavanju, a banka pitanja za sve nedelje biće javna i dostupna studentima u Priručniku i na sajtu Medicinskog fakulteta. Svaki uspešno urađen ulazni test studentu donosi po jedan bod.

Kolokvijum se polaže pismeno u vidu testa, održava se posle 8. nedelja nastave i obuhvata celokupno do tada pređeno gradivo. Test se sastoji iz pitanja sa ponuđenim odgovorima, pitanja sa popunjavanjem i pitanja na koja se odgovara u vidu kratkog eseja od nekoliko rečenica. Kolokvijum se polaže sa 13 bodova, a maksimalan broj bodova koji student može da osvoji na kolokvijumu iznosi 25. Maksimalan broj bodova na kolokvijumu u drugom terminu je 20.

- Postoje dva termina kolokvijuma
- Izlazak na prvi termin kolokvijuma je obavezan.
- Ponovni termin za kolokvijum je nedelju dana kasnije (ili dve u zavisnosti od slobodnih termina) i na njega imaju pravo da izađu svi studenti koji nisu položili ili su bili opravdano sprečeni da izađu na prvi termin (prilažu molbu Katedri Imunologije uz opravdanje).
- Rezultat kolokvijuma se evidentira u kartonu, indeksu i elektronskoj bazi.

Završni ispit se polaže usmeno pred nastavnikom i donosi maksimalno 60 bodova. Na ispitu se izvlače tri ispitna pitanja, po jedno iz svake grupe:

- I Osnove (fiziologija) imunskog sistema
- II Infektivna, tumorska i transplantaciona imunologija sa imunopatologijom
- III Primena imunoloških tehnika i principi izvođenja

Literaturu za pripremu završnog ispita čine: Udžbenik, Priručnik za nastavu iz Imunologije, prezentacije i dopunski dokumenti na zvaničnom sajtu fakulteta.

Način formiranja završne ocene iz Imunologije

Završna ocena iz predmeta Imunologija se dobija na osnovu bodova koji student kontinuirano stiče tokom nastave (maksimalno 15 bodova), bodova sa kolokvijuma (maksimalno 25 bodova) i ocene koju dobije na završnom ispitu koji se usmeno polaže pred nastavnikom (maksimalno 60 bodova).

Preračunavanje ukupnog broja bodova u završnu ocenu se vrši prema priloženoj tabeli:

ZAVRŠNA OCENA (iskazana kao ukupan broj bodova od 100 maksimalnih)	ZAVRŠNA OCENA (iskazana brojčano od 5 do 10)
≤ 50	5 (nije položio/la)
51-60	6
61-70	7
71-80	8
81-90	9
91-100	10

ISPITNA PITANJA IZ IMUNOLOGIJE ZA ŠKOLSKU 2020/2021. GODINU

(izvlači se po jedno pitanje iz svake grupe)

I grupa

1. Opšta svojstva i komponente imunskog sistema i tipovi imunskog odgovora
2. Urođena imunost
3. Preuzimanje antigena i prezentacija antigena limfocitima
4. Prepoznavanje antigena u stečenoj imunosti
5. Celularni imunski odgovor
6. Efektorski mehanizmi celularne imunosti
7. Humoralni imunski odgovor
8. Efektorski mehanizmi humoralne imunosti

II grupa

1. Mehanizmi odbrane protiv bakterijskih, virusnih, gljivičnih i parazitskih infekcija
2. Imunološka tolerancija i autoimunost, principi dijagnostike i lečenja autoimunskih bolesti
3. Imunski odgovor na tumore, principi imunoterapije malignih bolesti
4. Imunski odgovor na transplantirana tkiva, principi prevencije i lečenja odbacivanja transplantata
5. Reakcije preosetljivosti I, II, III i IV tipa, principi dijagnostike i lečenja preosetljivosti
6. Kongenitalne i stečene imunodeficijencije, principi dijagnostike i lečenja imunodeficijencija
7. Principi imunoprofilakse infektivnih bolesti

III grupa

1. Dijagnostički značaj imunoaglutinacije i principi izvođenja
2. Dijagnostički značaj imunoprecipitacije i principi izvođenja
3. Dijagnostički značaj enzimskih i radio-imunotestova (EIA, RIA) i principi izvođenja
4. Imunofluorescencija i osnovi protočne citofluorimetrije, dijagnostički značaj i principi izvođenja

SADRŽAJ

I nedelja

str. 1

Predavanje: Imunologija i njen predmet izučavanja. Nomenklatura i osnovna svojstva imunskog sistema (urođena i stečena, celularna i humoralna imunost).

Seminar: Svojstva i faze stečenog imunskog odgovora. Čelije i tkiva imunskog sistema. Centralni i periferni limfni organi. Recirkulacija limfocita.

II nedelja

str. 2

Predavanje: Svojstva urođene imunosti. Prepoznavanje mikroorganizama od strane ćelija urođene imunosti.

Seminar: Komponente urođene imunosti (celularne i humoralne). Uloga urođene imunosti u stimulisanju stečenog imunskog odgovora.

III nedelja

str. 4

Predavanje: Antigeni: vrste i svojstva. Principi prepoznavanja antigena od strane T i B-limfocita. Antigen-prezentujuće ćelije.

Seminar: Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC). Struktura i funkcija MHC molekula. Obrada i prezentacija proteinskih antigena.

IV nedelja

str. 7

Predavanje: Receptori za antigen na limfocitima.

Seminar: Građa membranskih i sekretovanih antitela. Osobine glavnih izotipova antitela. Građa T-ćelijskog receptora za antigene. Razvoj imunskog repertoara i mehanizam nastanka raznolikosti antigenskih receptora.

V nedelja

str. 9

Predavanje: Sazrevanje i selekcija T-limfocita.

Seminar: Faze T-ćelijskog odgovora. Prepoznavanje antigena i kostimulacija T-ćelija. Aktivacija, klonska ekspanzija i diferencijacija naivnih T-ćelija u efektorske i memorijske T-ćelije. Migracija T-limfocita u celularnoj imunosti. Slabljenje imunskog odgovora.

VI nedelja

str. 11

Predavanje: Uloga citokina u imunskom odgovoru.

Seminar: Tipovi celularne imunosti. Diferencijacija i efektorske funkcije osnovnih subpopulacija pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita (Th1, Th2 i Th17 ćelija). Diferencijacija i efektorske funkcije citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita (CTL).

VII nedelja

str. 16

Predavanje: Sazrevanje i selekcija B-limfocita.

Seminar: Faze i tipovi humoralnog odgovora. Aktivacija B-ćelija. Humoralni odgovor na T-zavisne antigene (promena izotipa, sazrevanje afiniteta, nastanak dugoživećih plazma ćelija i memorijskih B-ćelija). Humoralni odgovor na T-nezavisne antigene. Regulacija humoralnog imunskog odgovora.

VIII nedelja

str. 18

Predavanje: Sistem komplementa: putevi aktivacije i efektorske funkcije. Regulacija aktivacije komplementa.

Seminar: Efektorske funkcije antitela. Funkcije antitela na posebnim anatomskim mestima (mukozna i neonatalna imunost).

IX nedelja**str. 20**

Predavanje: Osnovni mehanizmi odbrane protiv intracelularnih i ekstracelularnih bakterija. Izbegavanje mehanizama odbrane od strane bakterija.

Vežba: Osnovne karakteristike antigen-antitelo reakcija: imunoaglutinacija, imunoprecipitacija i njihova praktična primena.

X nedelja**str. 31**

Predavanje: Osnovni mehanizmi odbrane protiv virusnih, gljivičnih i parazitskih infekcija. Izbegavanje mehanizama odbrane od strane virusa, gljivica i parazita.

Vežba: Enzimski imunotest (EIA), radio-imunotest (RIA), imunofluorescencija, brzi hromatografski testovi i njihova praktična primena.

XI nedelja**str. 42**

Predavanje: Evaluacija imunskog sistema. Dijagnostika bolesti posredovanih imunskim mehanizmima i imunodeficijencija.

Seminar: Poremećaji izazvani imunskim odgovorom. Reakcije preosetljivosti I, II, III i IV tipa (mehanizmi oštećenja, klinički sindromi i principi terapije).

XII nedelja**str. 51**

Predavanje: Principi inhibicije imunskog odgovora. Imunosupresivni lekovi. Monoklonska antitela i njihova primena u medicini.

Seminar: Imunološka tolerancija: značaj i mehanizmi. Centralna i periferna tolerancija T i B-limfocita. Autoimunost: principi i patogeneza. Uticaj genetskih faktora, infekcije i drugih faktora sredine na razvoj autoimunskih bolesti.

XIII nedelja**str. 58**

Predavanje: Principi stimulacije imunskog sistema.

Seminar: Imunski odgovor na tumore. Antigeni tumora. Imunski mehanizmi odbacivanja tumora. Izbegavanje imunskog odgovora od strane tumora. Imunološki pristupi u terapiji malignih tumora.

XIV nedelja**str. 61**

Predavanje: Primarne (kongenitalne) imunodeficijencije.

Seminar: Imunski odgovor na transplantirana tkiva. Transplantacioni antigeni. Indukcija imunskog odgovora i mehanizmi odbacivanja kalema. Prevencija i tretman odbacivanja kalema. Primena laboratorijskih metoda u pripremi za transplantaciju i praćenju pacijenata posle izvršene transplantacije.

XV nedelja**str. 65**

Predavanje: Sekundarne (stečene) imunodeficijencije.

Seminar: Principi imunoprofilakse infektivnih bolesti. Pasivna imunizacija. Vakcine.

Prilozi**str. 73**

Predavanje: Imunologija i njen predmet izučavanja. Imunski sistem i njegova uloga u organizmu. Nomenklatura i osnovna svojstva imunskog sistema (urođena i stečena, celularna i humoralna imunost).

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. osnovnu terminologiju vezanu za imunost i mogu da ispričaju šta je predmet izučavanja imunologije.
2. da imunski sistem služi za borbu protiv infektivnih agenasa i tumorskih ćelija i učestvuje u reparaciji oštećenog tkiva.
3. da shvataju koncept opasnosti.
4. da postoje urođena i stečena imunost, i razliku između celularne i humoralne imunosti.

Seminar: Svojstva i faze stečenog imunskog odgovora. Ćelije i tkiva imunskog sistema. Centralni i periferni limfni organi. Recirkulacija limfocita.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta su komponente urođene, a šta stečene imunosti i uviđaju koliko je vremena potrebno da bi došlo do imunskog odgovora.
2. koja su svojstva stečene imunosti i umeju da objasne termine raznovrsnost, specifičnost, klonska ekspanzija, memorija, specijalizacija i autotolerancija.
3. faze stečenog imunskog odgovora, razumeju dinamiku odgovora stečene imunosti i razliku između primarnog i sekundarnog imunskog odgovora.
4. osnovnu podelu limfocita i mogu da objasne njihove osnovne funkcije.
5. funkcije centralnih i perifernih limfnih organa i razumeju značaj građe limfnih čvorova i slezine.
6. neophodnost recirkulacije limfocita i znaju obrasce kretanja naivnih i efektorskih T-limfocita.

Nema ulaznog testa!

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|--|---|
| 1. Urođena imunost naziva se i | a. fagociti i NK ćelije |
| 2. Mehanizmi urođene imunosti posreduju u | b. humoralna i celularna |
| 3. Prvu liniju odbrane u urođenoj imunosti čine | c. B i T-limfociti |
| 4. Ćelije urođene imunosti su | d. prirodna ili nativna imunost |
| 5. Ćelije stečene imunosti su | e. raznovrsnost, specifičnost, memorija |
| 6. Tipovi stečene imunosti su | f. kostna srž i timus |
| 7. Važna svojstva ćelija stečene imunosti su | g. ranoj odbrani od infektivnih agenasa |
| 8. Centralni (primarni, generativni) limfni organi kod čoveka su | h. epitelne barijere |
| 9. Periferni (sekundarni) limfni organi kod čoveka su | i. perifernim limfnim organima |
| 10. Primarni stečeni imunski odgovor započinje u | j. limfni čvorovi, slezina, MALT |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Svojstva urođene imunosti. Prepoznavanje mikroorganizama od strane ćelija urođene imunosti.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koncept molekulskih obrazaca patogena, znaju koje su to strukture na infektivnim agensima i umeju da navedu nekoliko primera.
2. da postoje i molekulski obrasci oštećenja sopstvenih ćelija.
3. kojim receptorima ćelije urođene imunosti prepoznaju molekulske obrasce patogena, kakva je njihova distribucija i kakvim genima su kodirani.
4. kakve su posledice angažovanja receptora za prepoznavanje patogena.

Seminar: Komponente urođene imunosti (celularne i humoralne). Uloga urođene imunosti u stimulisanju stečenog imunskog odgovora.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koje su karakteristike i komponente urođene imunosti.
2. na koji način epitelne barijere sprečavaju prodor patogena i značaj integriteta epitelne barijere i fiziološke mikroflore za sprečavanje infekcija. Studenti su upoznati sa postojanjem intraepitelnih limfocita kao i antimikrobnih peptida koji sekretuju ćelije epitela.
3. da naprave podelu ćelija urođene imunosti (fagociti, NK ćelije, dendritske ćelije, mastociti, bazofili i eozinofili).
4. uloge fagocita i mogu da objasne na koji način fagociti ubijaju infektivne agense, stimulišu zapaljenje, i učestvuju u reparaciji oštećenog tkiva.
5. proces transmigracije leukocita i znaju da su citokini, hemokini i adhezivni molekuli terapijske mete u lečenju hroničnih zapaljenskih bolesti.
6. šta prepoznaju NK ćelije, kako se aktiviraju i kojim mehanizmima ubijaju ćelije. Znaju i da pomažu sposobnost fagocita da ubijaju fagocitovane mikroorganizme i na koji način to čine.
7. da dendritske ćelije i makrofagi obezbeđuju signale za aktivaciju T-limfocita.
8. koji su osnovni humoralni mehanizmi urođene imunosti (komplement, citokini, proteini akutne faze).
9. da navedu osnovne funkcije citokina koje proizvode ćelije urođene imunosti (TNF, IL-1, IL-12, hemokini, interferoni tipa I).

Pitanja za ulazne testove

1. Kako epitelne barijere učestvuju u odbrani od patogena?
2. Kako ćelije urođene imunosti prepoznaju patogene?
3. Koje su uloge NK ćelija i kako ih obavljaju?
4. Koje su ćelije fagociti i kako ingestiraju i ubijaju mikroorganizme?
5. Kako citokini urođene imunosti učestvuju u zapaljenju i antivirusnoj odbrani?

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|--|---|
| 1. Receptori na ćelijama urođene imunosti prepoznaju | a. proizvode enzime, azot-monoksid i reaktivne oblike kiseonika |
| 2. Epitelne ćelije predstavljaju i hemijsku barijeru za infekciju tako što | b. sopstvene ćelije inficirane virusima i maligne ćelije |
| 3. Makrofagi stimulišu zapaljenje zato što | c. ranoj odbrani od virusnih infekcija |
| 4. Makrofagi ubijaju fagocitovane mikroorganizme tako što | d. stvaraju TNF, IL-1 i druge medijatore |
| 5. Urođenoubilačke ćelije ubijaju | e. molekula koji funkcionišu kao „drugi signal“ |
| 6. Urođenoubilačka ćelija se aktivira kada | f. urođenoubilačke i T-ćelije |
| 7. Hemokini su važni za | g. strukture zajedničke za pojedine klase mikroorganizama |
| 8. IL-12 koga proizvode makrofagi stimuliše | h. ciljna ćelija ne eksprimira MHC molekule I klase |
| 9. Interferoni tip I (IFN- α i IFN- β) su važni u | i. migraciju leukocita |
| 10. Ćelije urođene imunosti stimulišu stečeni imunski odgovor pomoću | j. proizvode peptidne antibiotike |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Antigeni: vrste i svojstva. Principi prepoznavanja antigena od strane T i B-limfocita. Antigen-prezentujuće ćelije.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta znače i pravilno upotrebljavaju pojmove antigen, imunogen, haptan, nosač, epitop (antigenska determinanta).
2. od čega zavisi imunogenost molekula.
3. da objasne kakve antigene prepoznaju T-limfociti a kakve B-limfociti.
4. koje su profesionalne antigen-prezentujuće ćelije, kakva je njihova distribucija i kakva im je funkcija.

Seminar: Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC). Struktura i funkcija MHC molekula. Obrada i prezentacija proteinskih antigena.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. poreklo pojma *Glavni kompleks tkivne podudarnosti* (MHC), znaju kako se nazivaju produkti ovih gena kod čoveka i njihovu osnovnu funkciju.
2. osnovna svojstva MHC kao što su poligenost i polimorfizam.
3. kakva je organizacija MHC lokusa, kako se nasleđuju i eksprimiraju geni koji kodiraju MHC molekule.
4. kakva je građa MHC molekula I i II klase, i znaju kakav je njihov odnos sa peptidima, T-ćelijskim receptorom i koreceptorskim molekulima CD4 i CD8.
5. kakva je ćelijska distribucija MHC molekula I i II klase.
6. da T-limfociti prepoznaju peptidne antigene samo kad su prikazani od strane MHC molekula na površini ćelija.
7. koja su dva puta obrade i prezentacije antigena, znaju koji se peptidi vezuju za MHC molekule I klase, a koji za MHC molekule II klase i razumeju neophodnost kontinuiranog prikazivanja novih citoplazmatskih i ekstracelularnih peptida T-limfocitima.
8. neophodnost postojanja unakrsne prezentacije peptida za aktivaciju CD8⁺ T-limfocita.

Pitanja za ulazne testove

1. Definišite pojmove antigen i imunogen i napišite šta utiče na imunogenost antigena.
2. Navedite populacije dendritskih ćelija i njihove uloge u imunskom odgovoru.
3. MHC molekuli I klase (naziv kod ljudi, ćelijska distribucija i funkcija) i obrada citosolnih antigena.
4. MHC molekuli II klase (naziv kod ljudi, ćelijska distribucija i funkcija) i obrada internalizovanih antigena.
5. Unakrsna prezentacija internalizovanih antigena CD8⁺ T-ćelijama.

ANTIGENI

Antigen, imunogen, epitop - definicije**Karakteristike supstance koje doprinose njenoj imunogenosti****Faktori vezani za organizam u kome se indukuje imunski odgovor****Faktori koji zavise od načina davanja antigena**

Antigen je bilo koja struktura koju mogu da prepoznaju T i B-limfociti pomoću svojih specifičnih receptora. Delovi antigena koji stupaju u kontakt sa receptorima na T i B-limfocitima (TCR, T-ćelijski receptor i BCR, B-ćelijski receptor), nazivaju se **antigenske determinante** ili **epitopi**.

Veličina antigenske determinante je grubo uporediva sa veličinom od nekoliko aminokiselina ili šećernih rezidua. U slučaju proteina, postoje **linearne** antigenske determinante (niz od oko 6 aminokiselina i u najvećem broju slučajeva su dostupne antitelima tek pri denaturaciji proteina) i **konformacione** antigenske determinante (formiraju ih aminokiseline koje su razdvojene u primarnoj strukturi proteina i dovode se u neposrednu blizinu u nativnoj, trodimenzionalnoj, formi). **Paratop** je deo antitela koji prepoznaje epitop na antigenu.

Pojam antigena podrazumeva specifično prepoznavanje od strane limfocita, a antigeni koji mogu da pokrenu imunski odgovor nazivaju se **imunogeni**. Sposobnost indukcije imunskog odgovora, imunogenost, zavisi od više faktora i to onih koji su karakteristika same supstance, zatim od organizma u kome bi trebalo da indukuje imunski odgovor i konačno, od načina na koji dolazi u kontakt sa organizmom.

Karakteristike supstance koje doprinose njenoj imunogenosti:

1. **Stranost** – Što je supstanca po svom poreklu filogenetski udaljenija od organizma u koji se unosi, to je njena sposobnost da pokrene imunski odgovor veća. Razlikovanje stranog od sopstvenog jedna je od osnovnih osobina imunskog sistema. Krajem prošlog veka postalo je jasno da se „odluka“ o tome da li će se uspostaviti stečeni imunski odgovor na neki molekul zasniva na sposobnosti urođene imunosti da prepozna konzervisane molekulске obrasce patogena i pokrene mehanizme stečene imunosti. Ovakvo objašnjenje aktivacije stečene imunosti dopunjeno je modelom takozvanih „signala opasnosti“ (engl. *danger signals*). Signali opasnosti bi bili oni koji potiču od ćelije koja je izmenjena ili oštećena. Prema tome, imunogene strukture su one sa kojima imunski sistem po prvi put stupa u interakciju na mestima na kojima ima oštećenja tkiva i ćelija (nekroze).
2. **Veličina** – Po pravilu su veće supstance bolji imunogeni, iako nema jasne granice ispod koje se takva osobina ne ispoljava, pa tako postoje molekuli manje mase koji su dobri imunogeni, kao i veliki molekuli koji indukuju slab imunski odgovor.
3. **Hemijski sastav** – Proteini su po pravilu bolji imunogeni od drugih materija (polisaharida, lipida, nukleinskih kiselina kao i neorganskih materija).
4. **Složenost građe** – Supstance složenije građe su bolji imunogeni od jednostavnijih molekula.
5. **Fizički oblik** – Partikulisane supstance indukuju imunski odgovor lakše od solubilnih, a denaturisani antigeni su bolji imunogeni od nativnih antigena.

Faktori vezani za organizam u kome se indukuje imunski odgovor:

1. **Genetska osnova** – Neke supstance su imunogene samo u određenim vrstama, a ne izazivaju imunski odgovor u drugim. Takođe, u okviru iste vrste neke jedinke ne mogu da odgovore ili odgovaraju veoma slabo na supstancu koja u drugim jedinkama pokreće snažan imunski odgovor.
2. **Uzrast** – Po pravilu veoma mlade i veoma stare jedinke odgovaraju lošije na supstancu koja u zrelih jedinki iste genetske osnove pokreće dobar imunski odgovor.

Faktori koji zavise od načina davanja:

1. **Doza** – Količina neke supstance sa karakteristikama antigena određuje jačinu imunskog odgovora. Postoji optimalna doza za svaki antigen i količine daleko ispod ili iznad ove ne dovode do imunskog odgovora ili čak indukuju imunološku toleranciju.
2. **Put** – Po pravilu, subkutana aplikacija neke supstance indukuje bolji imunski odgovor od onog koji bi se dobio posle peroralnog ili intravenskog davanja. Intradermalno davanje indukuje najjači imunski odgovor (dolazi do oštećenja tkiva, a Langerhansove ćelije su najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije – APC). Kod intravenskog načina davanja antigeni dolaze u slezinu gde, u zavisnosti od svojih karakteri-

stika, mogu da indukuju toleranciju ili imunski odgovor. Oralno dati antigeni, kao i davanje preko respiratornog trakta (intranazalni put) često indukuju toleranciju zbog posebnih karakteristika imunskog sistema digestivnog i respiratornog trakta.

- 3. Davanje sa adjuvansom** – Adjuvansi su supstance koje, iako same lišene antigenskih svojstava, pojačavaju imunski odgovor na dati antigen (ulja, kompleksne soli i sl.).

Antigeni koje prepoznaju B-limfociti su proteini (linearne i konformacione determinante), ugljeni hidrati, nukleinske kiseline i dr., nativni i prerađeni, solubilni i na površini ćelija.

Antigeni koje prepoznaju T-limfociti su proteini, linearne determinante, prepoznaju se na površini drugih ćelija u sklopu sopstvenih molekula.

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|---|--|
| 1. MHC molekuli I klase kod čoveka su | a. MHC molekula I klase |
| 2. MHC molekuli II klase kod čoveka su | b. CD8 ⁺ T-limfocitima |
| 3. Prerada i prezentacija antigena je neophodna za | c. HLA-A, HLA-B, HLA-C |
| 4. Egzogeni antigeni koji ulaze u ćeliju putem endocitoze po pravilu se prezentuju u sklopu | d. CD4 ⁺ T-limfocitima |
| 5. Endogeno (u ćeliji) sintetisani antigeni po pravilu se prezentuju u sklopu | e. dendritskim ćelijama, makrofagima i B-limfocitima |
| 6. Peptidi endogenih proteina koji formiraju komplekse sa MHC molekulima I klase nastaju u | f. MHC molekula II klase |
| 7. MHC molekuli I klase prezentuju peptide | g. prepoznavanje antigena od strane T-limfocita |
| 8. MHC molekuli II klase prezentuju peptide | h. na svim ćelijama sa jedrom |
| 9. MHC molekuli I klase su eksprimirani | i. proteazomu |
| 10. MHC molekuli II klase konstitutivno su eksprimirani na | j. HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Receptori za antigen na limfocitima.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koje strukture prepoznaju receptori za antigen, kakva je njihova distribucija i raspored na ćelijskoj membrani i kakvim genima su kodirani. Umeju da naprave razliku između receptora za antigen i receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca.
2. sličnosti i razlike između receptora za antigen na T i B-limfocitima.
3. koji su molekuli pridruženi membranskom imunoglobulinu i T-ćelijskom receptoru i koja je njihova funkcija.

Seminar: Građa membranskih i sekretovanih antitela. Osobine glavnih izotipova antitela. Građa T-ćelijskog receptora za antigene. Razvoj imunskog repertoara i mehanizam nastanka raznolikosti antigenih receptora.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. kakva je građa membranskih, a kakva sekretovanih antitela.
2. osobine glavnih klasa antitela.
3. kakva je građa T-ćelijskog receptora za antigen.
4. kakva je organizacija gena za lake i teške lance imunoglobulina, kao i za α i β lance T-ćelijskog receptora.
5. princip rekombinacije VDJ i VJ genskih segmenata i umeju da objasne značaj alelske ekskluzije.
6. koji mehanizmi dovode do nastanka raznolikosti receptora za antigen.
7. principe produkcije i primene monoklonskih antitela.

Pitanja za ulazne testove

1. Opišite građu antitela (membranskog i sekretovanog).
2. Opišite način vezivanja antigena od strane antitela (CDR, antigenska determinanta, afinitet, aviditet).
3. Antigenski receptor na T-limfocitima (naziv, struktura i način prepoznavanja Ag).
4. Navedite razlike između receptora na T i B limfocitima (karakteristike antigena i epitopa, molekuli koji sprovode signale).
5. Koji su mehanizmi nastanka raznolikosti receptora na limfocitima?

Monoklonska antitela

Korišćenje seruma odnosno antitela u dijagnostičke i terapijske svrhe započeto je u XIX veku. Bakteriolozi su kao kriterijume za sistematiku bakterija, pored njihovih morfoloških, kulturnih i biohemijskih osobina, proizvodili i životinjske serume koji bi vršili aglutinaciju bakterija koje su karakterisali. Emil von Behring 1901. godine dobio je Nobelovu nagradu za ideju da bi određena bolest mogla da se leči serumom koji bi bio selektivno usmeren protiv izazivača tog oboljenja, što je i dokazao lečeći pacijente obolele od difterije konjskim antidifterijskim serumom. Međutim, serum i imunizovanih životinja često su varirali u sadržaju i specifičnosti antitela koja su bila potrebna za dijagnostiku ili lečenje bolesti. Pored toga, terapija životinjskim serumom bila je kod mnogih osoba praćena neželjenim efektima.

Problem specifičnosti je mogao da se reši u *in vitro* uslovima razblaživanjem ćelija u medijumu tako da se u jednoj posudi za kultivaciju odgaja jedna jedina plazma ćelija koja bi pravila antitela samo jedne specifičnosti. Međutim jedna plazma ćelija može da napravi samo malu količinu antitela, jer umire unutar nekoliko dana od početka kultivacije *in vitro*. Sa druge strane, tumorski izmenjen plazmocit, ćelija mijeloma ili plazmocitoma, potiče od jednog B-ćelijskog klona i ima neograničen životni vek i sposobnost za deobu. Georges Kohler i Cesar Milstein su 1984. godine dobili Nobelovu za razvoj tehnike koja je omogućila spajanje aktiviranih B-limfocita poreklom iz imunizovane životinje (najčešće je to miš) koje proizvode specifično antitelo za dati antigen i besmrtnih ćelija mijeloma u jednu ćeliju koja je besmrtna, sintetiše antitelo jedne specifičnosti i naziva se hibridom.

Fuzija mijelomske ćelije i B-limfocita je redak događaj tako da se selekcija hibridoma obezbeđuje kultivacijom u medijumu koji omogućava njihovo preživljavanje (HAT medijum). Samo uspešno fuzionisane ćelije preživljavaju, dok mijelomske ćelije umiru zbog nemogućnosti sinteze DNK u takvom medijumu, a aktivirani B-limfociti umiru jer je njihov životni vek kratak. Zatim se hibridomi umnožavaju *in vitro* i prečišćavaju, odnosno selektuju se samo oni hibridomi koji proizvode antitelo specifično za određeni epitop. Na taj način je stvaranjem besmrtnih ćelija omogućena kontrolisana produkcija velike količine imunoglobulina koji svi imaju specifičnost za isti epitop (produkt su jednog jedinog B-ćelijskog klon) i ona su nazvana **monoklonska antitela** (engl. *Monoclonal antibody*, mAb).

Monoklonska antitela imaju veliku primenu u istraživanjima, savremenoj dijagnostici i terapiji. Najveći broj mAb koja se primenjuju u dijagnostici su napravljena u mišu. Cela savremena klasifikacija limfocita i drugih ćelija je zasnovana na prisustvu specifičnih markera, molekula koji definišu vrstu i stepen diferencijacije ćelija, a koji mogu da vežu grupe mAb (engl. *cluster of differentiation*, CD). Na osnovu davanja brojeva CD molekulima i definisanja njihovog prisustva na površini ćelija (CD3, CD4, CD8) moguće je razlikovati određene tipove i podtipove limfocita. Pored toga, mAb se koriste u **imunodijagnostici** različitih infektivnih i autoimunskih bolesti kao i u detekciji tumora (tumor specifična mAb) primenom metoda imunofluorescence, imunohistohemije, ELISA i Western blot tehnikama.

Mišja antitela izazivaju neželjene reakcije nakon primene a kako bi se sprečile neželjene reakcije koje njihova primena kao stranih proteina izaziva, u **terapiji** se koriste modifikovana (humanizovana) ili humana mAb. Terapijska primena mAb je izuzetno važna kod lečenja tumora, autoimunskih bolesti, teških alergijskih oboljenja, sprečavanja odbacivanja transplantata, jer se na taj način omogućava delovanje samo na određeni tip ćelija. Neka od mAb koja se koriste u terapiji reumatoidnog artritisa blokiraju TNF (Infliximab), za sprečavanje akutnog odbacivanja transplantiranog organa se koristi anti-CD25 mAb (Basiliximab), dok se Omalizumab vezuje za Fc fragment IgE i ometa vezivanje za receptore na mastocitima. Koristi se kod teških oblika alergijske astme.

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|---|--|
| 1. Rekombinacija gena za TCR | a. IgM, IgD, IgG, IgA i IgE |
| 2. Pet klasa antitela su | b. proteine, polisaharide, lipide |
| 3. TCR prepoznaje | c. α i β , odnosno γ i δ lanaca |
| 4. Rekombinacija imunoglobulinskih gena | d. peptide u sklopu MHC molekula |
| 5. TCR se sastoji iz | e. konstantne regione teških lanaca |
| 6. Antitelo se sastoji od | f. varijabilne regione lakih i teških lanaca |
| 7. Antitela različitih klasa imaju različite | g. odvija se isključivo u timusu |
| 8. Membranska antitela | h. omogućava raznolikost antitela |
| 9. Antitelo može da prepozna | i. dva ista teška i dva ista laka lanca |
| 10. Receptori na različitim klonovima B-limfocita imaju različite | j. su receptori za antigen na B-limfocitima |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Sazrevanje i selekcija T-limfocita.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. odakle potiču i gde se diferenciraju T-limfociti.
2. koji su najvažniji događaji u diferencijaciji T-limfocita.
3. koncept „smrt usled zanemarivanja“, znaju šta su to pozitivna i negativna selekcija i da objasne značaj i posledice ovih fenomena.

Seminar: Faze T-ćelijskog odgovora. Prepoznavanje antigena i kostimulacija T-ćelija. Aktivacija, klonska ekspanzija i diferencijacija naivnih T-ćelija u efektorske i memorijske T-ćelije. Migracija T-limfocita u celularnoj imunosti. Slabljenje imunskog odgovora.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koje su faze u odgovoru naivnih T-limfocita i na kojim mestima se pojedine faze odvijaju.
2. da su receptorima za prepoznavanje antigena na T-limfocitima pridruženi CD4/CD8 molekuli, CD3 i ζ lanci. Znaju kakva je uloga ovih molekula.
3. ulogu adhezivnih molekula u aktivaciji T-limfocita i značaj stvaranja imunološke sinapse.
4. uloge CD28—B7 interakcije u obezbeđivanju signala 2 za aktivaciju naivnih T-limfocita.
5. da je aktivacija T-limfocita kompleksan niz biohemijskih događaja koja dovodi do transkripcione aktivacije ćelije. Uviđaju mesto kalcineurina u aktivaciji T-limfocita i znaju da je ovaj molekul meta imunosupresivne terapije.
6. značaj interakcije IL-2—IL-2R za aktivaciju i klonsku ekspanziju naivnih T-limfocita.
7. kako se naivni CD4⁺ T-limfociti nakon aktivacije diferenciraju u Th1, Th2 i Th17 ćelije, odnosno u citotoksične T-limfocite.
8. osnovne puteve migracije naivnih, efektorskih i memorijskih T-limfocita.
9. da je migracija naivnih, efektorskih i memorijskih T-limfocita uslovljena interakcijom između adhezivnih molekula i umeju da navedu 2-3 para adhezivnih molekula važnih za izlazak iz krvnih sudova odnosno ulazak T-limfocita u sekundarne limfne organe i zapaljena tkiva.
10. da pored adhezivnih molekula važnu ulogu u migraciji, pozicioniranju i zadržavanju T-limfocita u sekundarnim limfnim organima i na mestu infekcije imaju hemokini.
11. značaj slabljenja imunskog odgovora i nastanka memorijskih T-limfocita.

Pitanja za ulazne testove

1. Opišite sazrevanje T-limfocita (mesto, faze, procesi selekcije i mehanizmi odgovorni za njih).
2. Kakva je uloga kostimulacije i adhezivnih molekula u aktivaciji T-ćelija?
3. Na koji način dolazi do proliferacije i klonske ekspanzije aktiviranih antigen-specifičnih T-limfocita?
4. Kakve osobine imaju memorijske T-ćelije i koje subpopulacije tih ćelija postoje?
5. Opišite principe migracije T-limfocita (naivnih i efektorskih).

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|---|--|
| 1. Za aktivaciju naivnih T-ćelija neophodna su | a. stabilizuju vezivanje T-ćelija za APĆ |
| 2. Početni signal za aktivaciju potiče od | b. Th1, Th2 i Th17 ćelije |
| 3. U kostimulaciji pri aktivaciji T-ćelija učestvuju | c. dva signala |
| 4. Ako APĆ ne eksprimira kostimulatore | d. produkcija citokina |
| 5. Adhezivni molekuli | e. omogućava preživljavanje korisnih limfocita |
| 6. Glavni faktor rasta T-ćelija je | f. ne dolazi do aktivacije T-ćelija |
| 7. CD4 ⁺ T-limfociti mogu da diferenciraju u | g. CD28 i B7 |
| 8. Efektorska funkcija Th ćelija je | h. uklanjaju autoreaktivni T-limfociti |
| 9. Negativnom selekcijom se | i. IL-2 |
| 10. Pozitivna selekcija | j. prepoznavanja pepida u sklopu MHC molekula |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Uloga citokina u imunskom odgovoru.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta su to citokini i znaju funkcionalnu podjelu citokina. Znaju i umeju da objasne koje su karakteristike njihovog dejstva. Upoznati su i sa postojanjem podele citokina u odnosu na tip receptora preko kojih deluju.
2. da navedu 1-2 najvažnije funkcije i ćelijske izvore svakog od navedenih citokina urođene imunosti (TNF, IL-1, IL-12, hemokini, interferoni tipa I).
3. da navedu 1-2 najvažnije funkcije i ćelijske izvore nekih citokina stečene imunosti (IL-2, IL-4, interferon-gama, IL-17).
4. da navedu 1-2 najvažnije funkcije i ćelijske izvore inhibitornih citokina (TGF-beta, IL-10).
5. da navedu 1-2 najvažnije funkcije i ćelijske izvore faktora rasta (IL-3, IL-7, CSF).
6. da navedu 4-5 primera terapije citokinima i anticitokinske terapije.

Seminar: Tipovi celularne imunosti. Diferencijacija i efektorske funkcije osnovnih subpopulacija pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita (Th1, Th2 i Th17 ćelija). Diferencijacija i efektorske funkcije citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita (CTL).

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koji su citokini ključni za diferencijaciju Th1, Th2, i Th17 ćelija.
2. koje ključne citokine sekreću Th1, Th2, i Th17 ćelije i umeju da objasne značaj ovih ćelija u odbrani od infektivnih agenasa, tumora i oštećenju sopstvenih neizmenjenih tkiva.
3. da objasne kakav je uticaj Th1 ćelija na makrofage, B-limfocite, CD8⁺ T-limfocite, NK i naivne CD4⁺ T-limfocite kao i njihovu ulogu u odbrani od intracelularnih patogena, odbrani od tumora i nastanku autoimunskih bolesti.
4. da objasne kakav je uticaj Th2 ćelija na makrofage, B-limfocite, eozinofile, ćelije epitela, mastocite i naivne CD4⁺ T-limfocite kao i njihovu ulogu u odbrani od helminata i nastanku alergije.
5. da objasne na primerima bolesti kakav je međusobni odnos Th1 i Th2 ćelija.
6. da objasne kakav je uticaj Th17 ćelija na neutrofile i ćelije epitela kao i njihovu ulogu u odbrani od nekih ekstracelularnih mikroorganizama i nastanku autoimunskih i hroničnih zapaljenskih bolesti.
7. da se CD8⁺ T-limfociti diferenciraju u citotoksične T-limfocite i uviđaju značaj pomoći CD4⁺ T-limfocita i unakrsne prezentacije antigena u ovom procesu.
8. da objasne diferencijaciju i mehanizme kojima CD8⁺ T-limfociti ubijaju svoje mete kao i njihovu ulogu u odbrani od intracelularnih patogena i tumora.

Pitanja za ulazne testove

1. Opišite diferencijaciju i efektorske funkcije Th1 ćelija (patogeni protiv kojih se bore, citokini neophodni za diferencijaciju, efektorski citokini i njihov efekat).
2. Opišite diferencijaciju i efektorske funkcije Th2 ćelija (patogeni protiv kojih se bore, citokini neophodni za diferencijaciju, efektorski citokini i njihov efekat).
3. Opišite diferencijaciju i efektorske funkcije Th17 ćelija (patogeni protiv kojih se bore, citokini neophodni za diferencijaciju, efektorski citokini i njihov efekat).
4. Opišite diferencijaciju i efektorske funkcije citotoksičnih T-limfocita (CTL) (patogeni protiv kojih se bore, mehanizam ubijanja inficiranih ćelija).
5. Na koji način mikroorganizmi izbegavaju mehanizme celularne imunosti?

CITOKINI

Opšte osobine citokina

Proinflammatorni citokini

Antiinflammatorni citokini

Antivirusni citokini (interferoni tipa I)

Citokini koji aktiviraju fagocite

Citokini koji aktiviraju T-limfocite

Citokini koji aktiviraju eozinofile

Citokini koji aktiviraju B-limfocite

Hematopoezni citokini važni za razvoj limfocita

Opšte osobine citokina

Citokini su sekretovani polipeptidi koji regulišu ćelijske funkcije i koji nastaju u odgovoru na mikroorganizme i druge antigene. Citokini posreduju u regulaciji imunskog i zapaljenskog odgovora. Druga važna funkcija citokina je stimulacija sazrevanja hematopoetskih ćelija. Čelije sintetisu i sekreću citokine tek po aktivaciji, tj. najčešće se ne oslobađaju kao prethodno formirani medijatori. Ostvaruju dejstva vezivanjem za membranske receptore na ćeliji koja ih pravi (**autokrino dejstvo**), ćelijama u neposrednoj okolini (**parakrino dejstvo**) ili, ako se luče u velikoj količini, dospevaju u krvotok i deluju na udaljene ćelije (**endokrino dejstvo**). Dejstva citokina su često **plejotropna** - jedan citokin može delovati na čitav niz različitih tipova ćelija. S druge strane, više različitih citokina može imati istu funkciju (**redundantnost citokina**). Signali koje ćelija dobija regulišu ekspresiju receptora za citokine, a time i sposobnost ćelije da odgovori na dati citokin. Vezivanjem citokina za odgovarajući tip receptora pokreće se unutarćelijska signalna kaskada specifična za taj tip receptora, a koja konačno rezultira promenama u genskoj ekspresiji ciljne ćelije. Čelija aktivirana citokinom stiče nova svojstva i/ili proliferiše. Često posledica ove aktivacije može da bude i sinteza agonističkih ili antagonističkih citokina. Čelijski odgovor na citokine je vrlo precizno regulisan solubilnim receptorima, koji deluju kao inhibitori samih citokina, ili inhibitorima molekula u signalnoj kaskadi. Podela citokina u tekstu koji sledi zasnovana je na pretežnim efektima koje citokini iskazuju u imunskom odgovoru. Postoje i druge podele od kojih je najsveobuhvatnija podela u odnosu na tip receptora i molekule koji su uključeni u prenos signala. Međutim, ta podela je dosta komplikovana i daleko prevazilazi potrebe studenata integrisanih akademskih studija Medicine.

Proinflammatorni citokini

Osnovna biološka uloga proinflammatornih citokina je izazivanje lokalne zapaljenske reakcije na mestu infekcije, a kada se sekreću u velikoj količini (TNF, interleukin (IL)-1 i IL-6) dovode do sistemskih efekata stimulišući ćelije hipotalamusa na sintezu prostaglandina koji dovode do groznice i hepatocite na sintezu proteina akutne faze. Glavni ćelijski izvor ovih citokina su makrofagi.

TNF sintetisu prevashodno aktivirani mononuklearni fagociti (a mogu i T-limfociti aktivirani antigenom, NK ćelije i mastociti). Važan stimulus za sintezu TNF je LPS Gram-negativnih bakterija. TNF deluje na endotelne ćelije krvnih sudova da ispolje adhezivne molekule na svojoj površini što omogućava vezivanje neutrofila, monocita i limfocita iz krvi za endotel. TNF istovremeno stimuliše endotelne ćelije i makrofage da sekreću hemokine koji deluju hemotaktički na pridošle ćelije i podstiče njihove mikrobicidne aktivnosti. TNF stimuliše sintezu IL-1, a IL-1 sintezu IL-6 u makrofagima. Štetno dejstvo zapaljenja u autoimunskim bolestima kao što je reumatoidni artritis smanjuje se neutralisanjem TNF terapijom anti-TNF antitelima ili solubilnim receptorima za TNF. U teškim infekcijama kao što je sepsa izazvana Gram-negativnim bakterijama, TNF se sekreću u velikoj količini, dospeva u cirkulaciju i ispoljava endokrino dejstvo: izaziva groznicu delujući na ćelije hipotalamusa da prave prostaglandine (ovo dejstvo ispoljava i IL-1), a sa IL-1 i IL-6 povećava sintezu proteina akutne faze u hepatocitima (fibrinogena, C-reaktivnog proteina i amiloida A). Povećanje sedimentacije eritrocita u zapaljenskim bolestima prevashodno je posledica ubrzane sinteze ovih proteina. Dugotrajna sekrecija TNF dovodi do gubitka težine – stanja kaheksije. TNF u visokim koncentracijama smanjuje kontraktilnost srčanog mišića i tonus glatkih mišića i time dovodi do pada krvnog pritiska, prouzrokuje trombozu jer menja antikoagulantna svojstva endotela, a uz to nastaje i metabolički poremećaj zbog smanjenja nivoa glukoze. Ovim promenama se manifestuje septički šok kao komplikacija sepse izazvane Gram-negativnim bakterijama.

Interleukin-1 i interleukin-6 imaju dejstva slična TNF. Deluju sinergistički sa TNF u nastanku lokalnog i sistemskog zapaljenja, ali ne uzrokuju i nastanak šoka. IL-1 stimuliše kostnu srž na stvaranje neutrofila i trombocita, direktno i indirektno, kroz stimulaciju produkcije IL-6. Pored toga, sam IL-6 je neophodan za diferencijaciju Th17 ćelija. Aktivnost IL-1 je regulisana produkcijom sličnog citokina koji se vezuje za isti receptor ali bez biološke aktivnosti, pa je nazvan IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). IL-1RA se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa i autoinflamatornih bolesti.

Hemokini su grupa molekula od oko 50 članova kod čoveka. Njihova osnovna uloga je usmeravanje kretanja leukocita u fiziološkim i patološkim stanjima. Na osnovu broja N-terminalnih cisteinskih rezidua klasifikovani su u četiri familije: C, CC, CXC i CX₃C hemokine (X predstavlja neku drugu aminokiselinu). CC i CXC familija su najbrojnije i njima pripada većina hemokina koje u inflamatornoj reakciji sekretuju leukociti u odgovoru na štetni stimulus, bilo direktno zbog aktivacije TLR prepoznavanjem molekulskih obrazaca patogena, ili posredno, usled dejstva TNF i IL-1. Hemokini privlače odbrambene ćelije na mesto infekcije delujući na njihov citoskelet tako da se one kreću u pravcu gradijenta hemokina. Druga važna uloga hemokina je usmeravanje naivnih limfocita i drugih leukocita u limfoidna tkiva. Aktivisani T-limfociti gube ekspresiju receptora za hemokine iz limfnih čvorova i zato, za razliku od naivnih T-ćelija, ne mogu više da dospeju u stromu limfnog čvora. Pored navedenih uloga, hemokini podstiču zarastanje rana i angiogenezu i imaju ulogu u embriogenezi.

Antiinflamatorni citokini

Antiinflamatorni citokini inhibiraju imunske reakcije i predstavljaju deo fiziološke negativne povratne sprege kojom se ograničava prekomerna aktivacija imunskog sistema tokom odbrane od infektivnog agensa i omogućava uspostavljanje homeostaze.

Interleukin-10 (IL-10) je inhibitor aktivisanih makrofaga i dendritskih ćelija. Glavni producenti IL-10 su regulatorne ćelije i sami makrofagi, na koje ovaj citokinin deluje po principu negativne povratne sprege. IL-10 učestvuje u vraćanju imunskog sistema u homeostazu nakon eliminacije patogena smanjujući sve funkcije kojima dendritske ćelije i makrofagi aktiviraju celularni imunski odgovor. On inhibira ekspresiju kostimulatornih molekula i MHC molekula II klase, čime sprečava aktivaciju T-limfocita. Takođe inhibira produkciju IL-12 koji prave makrofagi i dendritske ćelije, koji bi naivne T-limfocite diferencirao u Th1 efektorsku populaciju koja produkuje interferon (IFN)- γ , glavni aktivator makrofaga.

IL-1 receptor antagonista (vidi IL-1)

Faktor transformacije rasta- β (TGF- β) uglavnom sekretuju aktivisani T-limfociti i mononuklearni fagociti. Osnovno dejstvo TGF- β je inhibicija proliferacije i aktivacije limfocita i drugih leukocita. Međutim, u zavisnosti od okolnosti pod kojima se sekretuje (vremena, nivoa ekspresije, citokina u okruženju), TGF- β može da deluje i proinflamatorno (npr. da učestvuje u nastanku efektorske populacije CD4⁺ T-limfocita koja produkuje IL-17). TGF- β inhibira aktivaciju makrofaga i deluje suprotno proinflamatornim citokinima. U B-limfocitima dovodi do promene klase u IgA, najvažniju klasu imunoglobulina na mukozama. Učestvuje u reparaciji tkiva nakon imunskog odgovora delujući na sintezu kolagena, enzima koji remodeluju ekstraćelijski matriks i faktora angiogeneze.

Antivirusni citokini (interferoni tipa I)

Interferoni (IFN) tipa I su familija citokina neophodna za eliminaciju virusnih infekcija. Stimulišu ćeliju na sintezu enzima koji sprečavaju transkripciju virusne RNK ili DNK i replikaciju virusa. Ovo dejstvo je parakrino, tj. ćelija koja ih produkuje dovodi okolne ćelije u tzv. „antivirusno stanje“. Interferoni tipa I povećavaju ekspresiju MHC I klase, pojačavajući time odgovor citotoksičnih T-limfocita, a takođe pospešuju i ubilačku aktivnost NK ćelija. IFN tipa I stimulišu nastanak Th1 populacije. Najznačajniji iz grupe su **IFN- α** (podrazumeva 13 srodnih molekula) i **IFN- β** . Glavni izvor IFN- α su plazmocitoidne dendritske ćelije, a IFN- β fibroblasti. IFN- α se koristi u lečenju virusnog hepatitisa C. Terapija IFN- β se primenjuje u multiploj sklerozi, a mehanizam povoljnog dejstva u ovoj bolesti nije razjašnjen.

Citokini koji aktiviraju fagocite

Interferon- γ (IFN- γ) je osnovni citokin koji aktivira makrofage i ima ulogu u odbrani od intracelularnih mikroorganizama, kao i slabo antivirusno dejstvo. Naziva se i interferonom tipa II. Th1 i NK ćelije proizvode IFN- γ koji na makrofage deluje višestruko. IFN- γ povećava ekspresiju fagocitne oksidaze i inducibilne sintaze azot-monoksida, enzima za sintezu mikrobicidnih jedinjenja (reaktivni oblici kiseonika i NO) kojima makrofag ubija fagocitovane mikroorganizme. IFN- γ podstiče nastanak samih ćelija koje ga prave, efektor-

skih Th1 limfocita, a inhibira nastanak Th2 populacije. Na B-limfocite deluje tako što stimuliše promenu klase u IgG, a inhibira promenu u IgE. IgG antitela su opsonizujuća i zajedno sa fragmentima komplementa podstiču fagocitozu mikroorganizama. IFN- γ deluje i na prezentaciju antigena i aktivaciju T-limfocita jer na makrofagima povećava ekspresiju MHC molekula I i II klase, kao i kostimulatornih molekula.

Interleukin-17 stimuliše privlačenje neutrofilnih granulocita na mesto zapaljenja i podstiče ih na fagocitozu. Sekretuju ga T-limfociti. IL-17 ima važnu ulogu u eliminaciji patogena kao što su gljivice, pre svega kandida, i neke bakterije. Pored ovih odbrambenih uloga, IL-17 doprinosi oštećenju tkiva u hroničnim zapaljenjskim bolestima kao što su reumatoidni artritis i multipla skleroza.

Citokini koji aktiviraju T-limfocite

Interleukin-2 (IL-2) je neophodan kao faktor rasta, preživljavanja i diferencijacije T-limfocita. Sekretuju ga T-limfociti nakon prepoznavanja antigena i aktivacije, a istovremeno počinju i sintezu dodatne jedinice receptora za IL-2, čime stižu receptor visokog afiniteta. Zahvaljujući sticanju funkcionalnog receptora za IL-2, samo T-limfociti specifični za antigen proliferišu, dok naivni T-limfociti u okruženju miruju. Regulatorne T-ćelije konstitutivno ekspiriraju funkcionalan receptor za IL-2, bitan za njihovo preživljavanje. IL-2 stimuliše i proliferaciju i citotoksičnu funkciju NK ćelija.

Interleukin-12 (IL-12) je rani medijator urođenog imunskog odgovora na intracelularne infektivne agense. To je ključni citokin za indukciju stečenog celularnog odgovora, a proizvode ga aktivirani makrofagi. Sam IL-12 deluje na diferencijaciju naivnih CD4⁺ T-ćelija u pravcu nastanka Th1 populacije koja proizvodi IFN- γ . Nastali IFN- γ povratno stimuliše makrofage, ali i dodatno pospešuje nastanak Th1. IL-12 tako čini važnu sponu između urođene i stečene imunosti u odgovoru na intracelularne infektivne agense. IL-12 stimuliše produkciju IFN- γ i u NK ćelijama, a povećava i citotoksičnu aktivnost NK ćelija i CD8⁺ T-limfocita.

Interleukin-4 (IL-4) je neophodan stimulus za diferencijaciju Th2 ćelija i ujedno njihov glavni produkt koji deluje kao autokrini faktor rasta. B-limfociti pod dejstvom IL-4 menjaju klasu u IgE. IL-4 se suprotstavlja dejstvu IFN- γ i inhibira nastanak Th1 populacije. Ova dejstva su važna za odbranu od helminata, ali predstavljaju i patološke mehanizme u alergijskim bolestima. IL-4 zajedno sa **IL-13** dovodi do alternativne aktivacije makrofaga koja podrazumeva indukciju sinteze kolagena i vodi u fibrozu u stanjima hroničnog zapaljenja, kao npr. u astmi. U opstrukciji disajnih puteva u astmi učestvuje i povećana količina mukusa koja nastaje pod dejstvom IL-13.

Interleukin-23 (IL-23) poput IL-12 predstavlja sponu između urođenog i stečenog imunskog odgovora. Produkuju ga dendritske ćelije i makrofagi. Učestvuje u diferencijaciji naivnih pomoćničkih T-limfocita koji produkuju **IL-17** (Th17).

Citokini koji aktiviraju eozinofile

Interleukin-5 (IL-5) produkuju Th2 ćelije i mastociti u parazitarnim infekcijama. IL-5 stimuliše i rast i sazrevanje nezrelih eozinofila i aktivira zrele eozinofile koji po aktivaciji ubijaju helminte.

Citokini koji aktiviraju B-limfocite

Faktor aktivacije B-limfocita koji pripada TNF familiji (engl. *B cell activating factor belonging to TNF family*, BAFF) i **ligand koji indukuje proliferaciju** (engl. *a proliferation-inducing ligand*, APRIL) su citokini koji omogućavaju preživljavanje B-limfocita. Sekretuju ih ćelije urođene imunosti i aktivisani T-limfociti u odgovoru na proinflamatorne citokine. Pored preživljavanja, značajni su za promenu klase antitela u odgovoru na neke polisaharidne antigene u T-nezavisnom humoralnom odgovoru.

Hematopoezni citokini važni za razvoj limfocita

Faktor stem ćelija (c-Kit ligand) proizvode ćelije strome kostne srži kao membranski i sekretovani protein. Deluje na stem ćelije, koje karakteriše ekspresija receptora c-Kit, a smatra se da mu je uloga da stem ćelije učini osetljivim na dejstvo faktora koji stimulišu kolonije. Sam c-Kit ligand ne dovodi do formiranja kolonija. Moguće je da ima ulogu u održavanju nezrelih T-limfocita u timusu i mastocita u mukoznim tkivima.

Interleukin-3 (IL-3) produkuju CD4⁺ T-limfociti. Stimuliše mnoge progenitore u kostnoj srži, pa se naziva i multi-CSF (engl. *colony stimulating factor*, CSF). Dejstva mu se preklapaju sa GM-CSF (videti kasnije).

Faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita (GM-CSF) je citokin čija je osnovna funkcija da stimulira rast neutrofila, eozinofila, bazofila i monocita. Nakon prodora patogena u organizam, veliki broj ćelija (makrofagi, mastociti, NK ćelije, epitelne ćelije i T-limfociti) počinje da produkuje ovaj citokin koji je od izuzetnog značaja za brze efekte imunskog odgovora.

Interleukin-7 (IL-7) sekretuju stromalne ćelije u mnogim tkivima. Omogućava preživljavanje i ekspanziju nezrelih prekurzora B- i T-limfocita. Neophodan je i za preživljavanje zrelih naivnih i memorijskih T-limfocita.

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|--|--|
| 1. Subpopulacije efektorskih CD4 ⁺ T su | a. produkcija IL-4, IL-5, IL-13 |
| 2. Efektorska funkcija Th1 ćelija je | b. zapaljensku reakciju bogatu eozinofilima |
| 3. Th1 ćelije su važne u odbrani od | c. helminata |
| 4. Efektorska funkcija Th2 ćelija je | d. Th1, Th2 i Th17 |
| 5. Th2 ćelije su važne u odbrani od | e. alternativnu aktivaciju makrofaga |
| 6. Th2 subpopulacija indukuje | f. mobiliše i aktivira neutrofile |
| 7. IL-4 i IL-13 indukuju i | g. produkcija IFN- γ i aktivacija makrofaga |
| 8. IL-17 | h. intracelularnih patogena |
| 9. Efektorska funkcija CTL je | i. perforinom, granzimima, Fas-FasL interakcijom |
| 10. Ubilački mehanizmi CTL posredovani su | j. ubijanje virusima zaraženih i tumorskih ćelija |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Sazrevanje i selekcija B-limfocita.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. odakle potiču i gde sazrevaju B-limfociti.
2. znaju šta su to pozitivna i negativna selekcija i da objasne značaj i posledice ovih fenomena.
3. za mogućnost preuređenja receptora za antigen kod B-limfocita.

Seminar: Faze i tipovi humoralnog odgovora. Aktivacija B-ćelija. Humoralni odgovor na T-zavisne antigene (promena izotipa, sazrevanje afiniteta, nastanak dugoživećih plazma ćelija i memorijskih B-ćelija). Humoralni odgovor na T-nezavisne antigene. Regulacija humoralnog imunskog odgovora.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koje subpopulacije B-limfocita postoje, kakva je njihova distribucija i na kakve Ag odgovaraju i da li im je za taj odgovor potrebna pomoć T-limfocita.
2. mehanizme T-zavisnog i T-nezavisnog imunskog odgovora.
3. principe aktivacije B-limfocita.
4. kojim redom se sekretuju klase i kako se odvija kinetika primarnog i sekundarnog humoralnog imunskog odgovora.
5. da objasne mehanizme promene klase antitela, sazrevanje afiniteta antitela i nastanka memorijskih plazma ćelija.
6. karakteristike primarnog i memorijskog odgovora B-limfocita na antigen i umeju da navedu razlike između ova dva tipa odgovora.

Pitanja za ulazne testove

1. Opišite sazrevanje B-limfocita (mesto, faze, procesi selekcije i mehanizmi odgovorni za njih).
2. Opišite humoralni imunski odgovor na T-zavisne antigene (priroda antigena, koje ćelije odgovaraju, karakteristični procesi, koje klase antitela se sekretuju).
3. Opišite humoralni imunski odgovor na T-nezavisne antigene (priroda antigena, koje ćelije odgovaraju, koje klase antitela se sekretuju).
4. Objasnite kako dolazi do sazrevanje afiniteta antitela i njegov značaj u odbrani od patogena.
5. Objasnite kako dolazi do promene klase antitela i njen značaj u odbrani od patogena.

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|---|---|
| 1. Stečeni humoralni imunski odgovor je posredovan | a. IgM antitela |
| 2. Humoralni imunski odgovor je važan u odbrani od | b. B-ćelije marginalne zone slezine |
| 3. Humoralni imunski odgovor na neproteinske antigene je | c. kvalitativno i kvantitativno različit (brži, jači i efikasniji) |
| 4. Na polisaharidne antigene poreklom iz krvi odgovaraju | d. CD4 ⁺ T-limfocita |
| 5. U odgovoru na T-nezavisne antigene prvenstveno se produkuju | e. promena klase antitela, sazrevanje afiniteta antitela, nastanak memorijskih B-ćelija |
| 6. Na proteinske antigene odgovaraju prvenstveno | f. antitelima |
| 7. U humoralnom odgovoru na proteinske antigene neophodno je učešće | g. T-nezavisan |
| 8. Svojstva humoralnog odgovora na T-zavisne antigene su | h. povratna regulacija antitelima |
| 9. Sekundarni humoralni odgovor u odnosu na primarni je | i. folikulske B-ćelije |
| 10. Proces u kome antitelo vezano za antigen inhibira dalju produkciju antitela naziva se | j. ekstracelularnih mikroorganizama i njihovih toksina |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Predavanje: Sistem komplementa: putevi aktivacije i efektorske funkcije. Regulacija aktivacije komplementa.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta je to sistem komplementa, kakva mu je funkcija i koji su putevi aktivacije sistema komplementa.
2. na koji način dolazi do aktivacije sistema komplementa u klasičnom, lektinskom i alternativnom putu.
3. koje su komponente sistema komplementa zajedničke u sva tri puta aktivacije a koje se međusobno razlikuju.
4. da navedu najvažnije biološke posledice aktivacije sistema komplementa i komponente, fragmente ili komplekse koji učestvuju u njihovom ostvarivanju.
5. značaj regulatornih proteina u aktivaciji sistema komplementa (C1q inhibitor).

Seminar: Efektorske funkcije antitela. Funkcije antitela na posebnim anatomskim mestima (mukozna i neonatalna imunost).

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. klase antitela, koji su membranska a koja sekretovana antitela.
2. koje funkcije antitela obavljaju svojim Fab fragmentima, a koje funkcije zavise od izotipa antitela.
3. koji izotipovi antitela obavljaju koje funkcije. Znaju i da je zastupljenost pojedinih izotipova u krvi različita kao i njihov poluživot u cirkulaciji.
4. koje klase antitela imaju ulogu u mukoznoj i neonatalnoj imunosti.

Pitanja za ulazne testove

1. Nabrojite klase imunoglobulina i njihove efektorske funkcije.
2. Opišite efektorske funkcije IgG antitela.
3. Koji su putevi aktivacije sistema komplementa i šta ih pokreće?
4. Koje su funkcije komplementa i koje komponente, fragmenti ili kompleksi ih vrše?
5. Šta su to mukozna i neonatalna imunost i čime su posredovane?

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|---|---|
| 1. Aktivacija sistema komplementa je važan | a. prisustvo lektina koji vezuje manozu (MBL) |
| 2. Putevi aktivacije komplementa su | b. mehanizam urođene i stečene imunosti |
| 3. Centralnu ulogu u aktivaciji ima | c. faktor B, faktor D, properdin |
| 4. Za aktivaciju lektinskog puta neophodno je | d. klasični, alternativni i lektinski |
| 5. Aktivatori klasičnog puta su | e. C1, C4, C2 |
| 6. Komponente alternativnog puta su | f. IgM i IgG antitela vezana za antigen |
| 7. Komponente rane faze klasičnog puta su | g. komponenta C3 |
| 8. Važan opsonin je | h. MAC |
| 9. Zapaljenjsku reakciju indukuju | i. C3b fragment |
| 10. Osmotsku lizu mikroorganizma uzrokuje | j. C3a, C4a i C5a fragmenti |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

Laboratorijski testovi za ispitivanje komplementa

U kliničkoj praksi od laboratorijskih testova za ispitivanje komplementa najčešće se koriste metode za kvantifikaciju pojedinih komponenti (C3, C4) radijalnom imunodifuzijom ili nefelometrijom, kao i funkcionalni testovi za ispitivanje klasičnog i alternativnog puta aktivacije (tzv. testovi hemolize). Za ispitivanje klasičnog puta aktivacije koriste se „senzibilisani“ ovčiji eritrociti (eritrociti obloženi antieritrocitnim antitelima) inkubirani sa odgovarajućim razblaženjima ispitivanog seruma. Titar je recipročna vrednost razblaženja seruma u kome je 50% eritocita liziralo (meri se kolorimetrijski). Izražava se brojem hemolitičkih jedinica komplementa klasičnog puta u ml seruma koje dovode do 50% lize eritrocita (CH_{50}). U testu za ispitivanje alternativnog puta aktivacije koristi se pufer koji blokira klasični put i eritrociti kunića koji spontano aktiviraju alternativni put što dovodi do hemolize. Titar se izražava kao AH_{50} . Korišćenje funkcionalnih testova predstavlja efikasan „skrining“ metod za genetske deficijencije komponenti komplementa.

Predavanje: Osnovni mehanizmi odbrane protiv intracelularnih i ekstracelularnih bakterija. Izbegavanje mehanizama odbrane od strane bakterija.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. da su svi mehanizmi imunskog odgovora angažovani u borbi protiv infektivnih agenasa. Takođe im je jasno da je imunski odgovor specijalizovan za borbu protiv određene klase infektivnih agenasa i da se koriste mehanizmi koji najefikasnije mogu da odgovore na infektivni agens u odnosu na njegovu lokalizaciju u organizmu (intracelularno, ekstracelularno) ili veličinu.
2. da je ishod infekcije određen kvalitetom imunskog odgovora i karakteristikama infektivnog agenasa. Jasno im je da u nekim slučajevima imunski odgovor na infektivni agens, a ne sam infektivni agens, dovodi do oštećenja organizma.
3. na koji način ekstracelularne bakterije dovode do oštećenja organizma, koji su mehanizmi angažovani u borbi protiv ovih infektivnih agenasa i na koji način se ove bakterije brane od dejstva pojedinih komponenti imunskog sistema.
4. koji su mehanizmi angažovani u borbi protiv intracelularnih bakterija i na koji način one preživljavaju u fagocitima.

Vežba: Osnovne karakteristike antigen-antitelo reakcija. Imunoaglutinacija, imunoprecipitacija i njihova praktična primena.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. da se antigen-antitelo reakcije koriste za detekciju i antigena i antitela i da su to *in vitro* dijagnostičke metode.
2. da naprave razliku između kvalitativnih, semikvantitativnih i kvantitativnih reakcija i znaju šta je to titar antitela. Uviđaju neophodnost postojanja pozitivnih i negativnih kontrola.
3. šta je to reakcija imunoaglutinacije i znaju razliku između direktne i indirektno imunoaglutinacije.
4. kakva je zavisnost reakcije od kvantitativnih odnosa antigena i antitela, razumeju šta je to fenomen prozone i na koji način ga je moguće izbeći.
5. da navedu nekoliko primera korišćenja imunoaglutinacije u dijagnostičke svrhe za detekciju antigena i antitela.
4. princip imunoprecipitacije i razumeju da može da se odigrava u tečnoj sredini ili gelu.
6. da znaju šta je to nefelometrija i umeju da navedu nekoliko molekula koji se detektuju nefelometrijski.
7. princip testa jednostruke radijalne imunodifuzije, na kom principu se određuje količina analiziranog antigena i da navedu nekoliko molekula koji se određuju na taj način.

Nema ulaznog testa!

ODBRANA OD INFEKCIJA (Mehanizmi odbrane od bakterijskih infekcija)

Mehanizmi odbrane od ekstracelularnih bakterija

- Urođena imunost na ekstracelularne bakterije
- Stečena imunost na ekstracelularne bakterije
- Mehanizmi kojim ekstracelularne bakterije izbegavaju imunski odgovor
- Oštećenja usled imunskog odgovora na ekstracelularne bakterije

Mehanizmi odbrane od intracelularnih bakterija

- Urođena imunost na intracelularne bakterije
- Stečena imunost na intracelularne bakterije
- Mehanizmi kojim intracelularne bakterije izbegavaju imunski odgovor
- Oštećenja usled imunskog odgovora na intracelularne bakterije

Glavna fiziološka uloga imunskog sistema je odbrana od infekcija. Uspostavljanje, tok i ishod svake infekcije zavisi od veoma kompleksnih interakcija između mikroorganizma i imunskog sistema domaćina. S jedne strane, mikroorganizam pokušava da prodre u organizam (najčešće kroz epitele sluzokoža respiratornog, digestivnog i urogenitalnog trakta), izbegne mehanizme odbrane i kolonizuje domaćina, pri čemu često vrši invaziju pojedinih ćelija i tkiva, što može da rezultuje njihovim oštećenjem i razvojem bolesti. Sa druge strane, imunski sistem mora da prepozna i spreči ulazak mikroorganizma, a u slučaju njegovog prodora da ograniči njegovu replikaciju i širenje po organizmu i eliminiše ga. Pošto su infektivni agensi veoma heterogeni, kako po svojoj građi i biološkim osobinama, tako i po načinu na koji indukuju infekciju, za uspešnu borbu protiv njih imunski sistem je morao da se **specijalizuje** i razvije mnogo različitih mehanizama odbrane. Zahvaljujući tome, obezbeđeno je da imunski sistem reaguje **na optimalan način** na svaki tip mikroorganizma kojem je izložen, koristeći one **mehanizme urođene i stečene imunosti** koji su najefikasniji za borbu protiv tog mikroorganizma. Koji od mehanizama će biti pokrenut, zavisi od **osobina mikroorganizma** koji je izazvao infekciju, uključujući i njegov odnos prema ćeliji domaćina, odnosno **mesto** njegove **replikacije** u organizmu (izvan ili unutar ćelije). Naime, različiti mehanizmi se koriste u borbi protiv ekstracelularnih u odnosu na intracelularne infektivne agense. Takođe i broj mikroorganizama koji je uspeo da prodre u organizam (**inokulum**) i stepen njegove patogenosti (**virulencija**) određuju mehanizme odbrane domaćina. Kada u organizam prodre mali broj mikroorganizama ili su oni male virulencije, mehanizmi urođene imunosti su često dovoljni da blokiraju infekciju, dok je u slučaju većeg inokuluma ili veće virulencije patogena obično potrebno uključivanje i mehanizama stečene imunosti. Virulencija mikroorganizama uslovljena je, pored ostalog i njihovom sposobnošću **da izbegnu ili nadjačaju mehanizme odbrane** domaćina. Štaviše, oni mikroorganizmi koji nisu razvili tu sposobnost, obično i nemaju kapacitet da indukuju bolest kod ljudi sa normalnim funkcionisanjem imunskog sistema (tzv. imunokompetentnih osoba). Tokom evolucije, infektivni agensi su razvili različite načine i strategije da izbegnu urođenu i stečenu imunost domaćina, što je neminovno dovelo do usložnjavanja imunskog sistema čoveka i razvoja mnogih efektorskih mehanizama za uspešnu odbranu od njih.

U ovom tekstu biće dat pregled najvažnijih mehanizama u odbrani od četiri glavne grupe patogenih infektivnih agenasa, odnosno bakterija, virusa, gljiva i parazita, kao i neki primeri mehanizama koje ti mikroorganizmi koriste da bi izbegli odbranu domaćina. Iako je imunski sistem jedinstven, a odbrambeni mehanizmi često deluju udruženo i međusobno se prepliću u borbi protiv patogena, iz didaktičkih razloga, oni se navode posebno, i to prvo urođeni pa stečeni, odnosno humoralni pa celularni. Takođe, pošto su oni detaljno opisani u udžbeniku iz imunologije, ovde će biti objašnjeni samo u osnovnim crtama i stavljeni u kontekst odbrane od infekcije. Na kraju, s obzirom da imunski sistem ima kapacitet da ošteti domaćina, odnosno da u mnogim infekcijama do oštećenja tkiva dolazi prevashodno zbog imunskog odgovora domaćina, a ne dejstvom samog mikroorganizma, biće navedeni i neki primeri patoloških procesa izazvanih imunskim odgovorom na infektivne agense.

MEHANIZMI ODBRANE OD BAKTERIJSKIH INFEKCIJA

Bakterije su prokariotski jednoćelijski mikroorganizmi. Neke bakterije mogu da kolonizuju čoveka i nasele mnoge regije organizma (npr. kožu i sluzokožu) čineći **fiziološku floru**, a neke mogu svojim prisustvom i produktima (npr. toksinima) da dovedu do oštećenja različitih ćelija i tkiva i razvoja bolesti. Na osnovu mesta njihove replikacije, izvan ili unutar ćelije domaćina, sve bakterije se dele na **ekstracelularne** i **intracelularne** i s obzirom da odbrana protiv njih uključuje različite mehanizme (Tabela 1), u daljem tekstu biće razmatrane posebno.

MEHANIZMI ODBRANE OD EKSTRACELULARNIH BAKTERIJA

Ekstracelularne bakterije imaju sposobnost da se u organizmu replikuju van ćelije, npr. u cirkulaciji, tkivima i lumenima šupljih organa. One svoj patogeni efekat ispoljavaju na jedan od dva načina: **indukcijom zapaljenja** ili **produkcijom toksina** (pojedine bakterije koriste oba). Naime, iako u osnovi odbrambena reakcija, inflamacija može da dovede i do oštećenja tkiva i razvoja bolesti. Tipičan primer su piogene infekcije izazvane bakterijama iz rodova *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus* i drugih, koje uzrokuju bolest indukcijom gnojnog zapaljenja. Pored inflamacije, mnoge bakterije ispoljavaju patogeni potencijal delovanjem egzotoksina koje luče. **Egzotoksini** mogu da deluju na različite ćelije u organizmu i izazivaju različite efekte, kao što su smrt ćelije usled blokade sinteze proteina (difterični toksin), modifikacija prenosa signala u sinapsama (tetanusni i botulinski toksini) ili povećano lučenje jona i vode (toksin kolere). Sa druge strane, pored egzotoksina postoji i **endotoksin** koji ulazi u sastav ćelijskog zida Gram negativnih bakterija, po hemijskom sastavu je **lipopolisaharid (LPS)** i dovodi do patoloških procesa aktivacijom makrofaga i drugih ćelija u organizmu. (Za detalje o toksinima i mehanizmima njihovog dejstva, konsultovati udžbenik iz bakteriologije.)

Urođena imunost na ekstracelularne bakterije

U odbrani od ekstracelularnih bakterija u okviru urođene imunosti najvažniju ulogu imaju **komplement** i **fagociti**. Naime, dva od tri puta **aktivacije sistema komplementa** (alternativni i lektinski) predstavljaju mehanizme urođene imunosti. Različite strukture ćelijskog zida bakterija (npr. LPS kod Gram negativnih i peptidoglikan, prevashodno kod Gram pozitivnih bakterija) mogu da aktiviraju komplement **alternativnim putem**, dok manosa prisutna na površini mnogih bakterija reaguje sa lektinom koji vezuje manozu (engl. *mannose binding lectin*, MBL) i pokreće **lektinski put**. Kao posledice aktivacije komplementa, dolazi do **opsonizacije bakterija** (posredovanog prevashodno C3b fragmentom) i olakšane fagocitoze, stimulacije procesa **zapaljenja** (preko C3a, C4a i C5a) i **direktnog ubijanja** bakterija **lizom**, posredovanom kompleksom koji oštećuje membranu (engl. *membrane attack complex*, MAC). MAC je, na primer, efikasan u eliminaciji pojedinih Gram negativnih bakterija sa tankim ćelijskim zidom, kao što su one iz roda *Neisseria*.

Sa druge strane, **fagociti (neutrofili i makrofagi)** imaju sposobnost da prepoznaju različite **molekulske obrasce** na bakterijama (i drugim patogenima) pomoću odgovarajućih **receptora** na svojoj površini (npr. receptora sličnih Toll-u, engl. *toll like receptor*, TLR), aktiviraju se, **fagocituju i ubiju ingestirane bakterije**. Fagociti imaju i **receptore za opsonine** (uključujući i C3b fragment komplementa), čime je omogućena fagocitoza i ubijanje inkapsuliranih bakterija, čija polisaharidna kapsula sprečava prepoznavanje obrazaca i fagocitozu u odsustvu opsonizacije. Takođe, pošto prepoznaju patogene, fagociti **luče TNF, IL-1** i druge citokine koji **indukuju zapaljenje** i dovode do nakupljanja novih leukocita i proteina iz krvi (npr. proteina komplementa) na mestu infekcije i na taj način doprinose njenom ograničavanju i eliminaciji patogena iz organizma.

Stečena imunost na ekstracelularne bakterije

Glavni mehanizam stečene imunosti u odbrani od ekstracelularnih bakterija je **humoralna imunost** posredovana **antitelima** koje stvaraju **B-limfociti** nakon što su prepoznali antigen, aktivirali se i diferencirali u plazma ćelije. Antitela su po pravilu usmerena na antigene na površini bakterija (koji su obično proteinske ili polisaharidne prirode) ili toksine (koji su najčešće proteini). Ona tu funkciju obavljaju putem neutralizacije, opsonizacije i aktivacije komplementa klasičnim putem. **Neutralizacija** je praktično jedini efikasan mehanizam u borbi protiv bakterijskih toksina, zasnovan na produkciji neutrališućih antitela (najčešće IgG i IgA klase) koja se vezuju visokim afinitetom za toksine i sprečavaju da se oni vežu za receptore na ćelijama domaćina, blokirajući na taj način njihov toksičan efekat. **Opsonizacija** je posredovana antitelima IgG klase koja prepoznaju antigene ćelijskog zida ili kapsule bakterija i oblože ih (opsonizuju). Fagociti, koji ima-

ju receptor za Fc fragment IgG antitela, mogu potom da prepoznaju vezana IgG antitela, aktiviraju se i efikasnije fagocituju i ubijaju opsonizovane bakterije. **Klasični put aktivacije komplementa** se dešava kada se za nastali kompleks antigena i antitela IgM ili IgG klase veže C1 komponenta, aktivira i pokrene enzimsku kaskadu koja na kraju može da dovede do lize ili opsonizacije bakterije i indukcije zapaljenja.

Pored B-limfocita, i pomoćnički **CD4⁺ T-limfociti** imaju važnu ulogu u odbrani od ekstracelularnih bakterija, tako što obezbeđuju **pomoć B-limfocitima** u odgovoru na proteinske antigene i određuju koju će klasu antitela plazma ćelije da proizvode. Takođe, oni mogu da **stimulišu fagocite citokinima**, kao što su **IFN- γ** , kojeg proizvode Th1 ćelije i koji stimuliše fagocitnu i mikrobicidnu aktivnost **makrofaga**, odnosno **IL-17** kojeg stvaraju Th17 ćelije i koji stimuliše **neutrofile**. Pomoćničke T-ćelije mogu da luče i **pro-inflamatorne citokine** (npr. TNF) i indukuju inflamaciju (ili pojačavaju već postojeću).

Mehanizmi kojim ekstracelularne bakterije izbegavaju imunski odgovor

Ekstracelularne bakterije su razvile različite mehanizme kojim izbegavaju urođenu i stečenu imunost domaćina. Tako, mnoge bakterije stvaraju **polisaharidnu kapsulu** koja oblaže njihov ćelijski zid i „prekriva“ molekulske obrasce čime je onemogućena uspešna fagocitoza. Štaviše, ta kapsula je vrlo često **antigenski varijabilna**, tj. postoji veći broj antigenskih varijanti (tzv. tipova) kapsule (npr. bar 90 kod pneumokoka), čime su omogućene ponovne infekcije istom bakterijom (ali različitim tipom). Takođe, ekstracelularne bakterije često poseduju mehanizme kojim **sprečavaju aktivaciju komplementa** (npr. sijalinska kiselina u kapsuli nekih bakterija sprečava alternativni put aktivacije). Neke bakterije imaju genetske mehanizme kojim **menjaju strukturu svojih antigena** na površini (npr. gonokok i *Escherichia coli* menjaju sastav pila kojim adheriraju za ćelije domaćina), neke mogu da **menjaju svoje površinsko naelektrisanje** čime izbegavaju dejstvo antimikrobnih peptida koje luče epitelne i druge ćelije domaćina, a neke proizvode **IgA proteazu** i na taj način razgrađuju antitela IgA klase na mukozama. Konačno, neke bakterije su razvile načine da **inhibiraju fagocitozu** ili **blokiraju ubilačke mehanizme** u fagolizozomu (npr. da produkcijom katalaze neutrališu reaktivne oblike kiseonika).

Oštećenja usled imunskog odgovora na ekstracelularne bakterije

Inflamacija koja nastaje u odgovoru na ekstracelularne bakterije pod dejstvom citokina produkovanih od strane aktiviranih makrofaga i drugih ćelija, može da dovede i do oštećenja tkiva, naročito u slučaju kada poprimi sistemske razmere (tzv. **sindrom sistemskog inflamatornog odgovora** ili **SIRS**, engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Ekstreman slučaj toga predstavlja **septički šok**, koji tipično nastaje u toku sepse izazvane Gram negativnim, a ponekad i Gram pozitivnim bakterijama. Septički šok dovodi do cirkulatornog kolapsa i pada krvnog pritiska, diseminovane intravaskularne koagulacije i metaboličkih poremećaja, koji se neretko završavaju letalnim ishodom, a posredovani su prevashodno velikom količinom TNF-a produkovanog u toku imunskog odgovora na bakterije.

Do patološkog procesa u organizmu može da dovede i imunski odgovor na posebnu grupu antigena tzv. **superantigene**. Superantigenima pripadaju neki **egzotoksini** (npr. neki toksini koje proizvode *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*) i oni mogu da se istovremeno vežu za MHC molekul II klase na antigen-prezentujućim ćelijama i V β lanac TCR-a na T-limfocitu i da aktiviraju T-limfocit bez obzira da li je on specifičan za antigenski peptid koji se nalazi u MHC molekulu. Na taj način mogu da se aktiviraju svi T-limfociti koji imaju isti V β lanac (ponekad čak i do 20% svih T-limfocita u organizmu) i dovedu do velike produkcije citokina i sistemske reakcije nalik na septički šok.

I sama **antitela** nastala u imunskom odgovoru na ekstracelularne bakterije mogu da dovedu do oštećenja tkiva i bolesti. Tipičan primer za to je **reumatska groznica**, danas retka poststreptokokna sekvela, koja nastaje kao posledica infekcije grla pojedinim sojevima *Streptococcus pyogenes*-a. Smatra se da karditis koji se javlja u reumatskoj groznici nastaje usled sličnosti (tzv. **molekulske mimikrije**) između M-proteina u ćelijskom zidu *S. pyogenes*-a i proteina u srčanom mišiću, tako da antitela nastala u odgovoru na bakteriju prepoznaju sopstvene antigene u srcu i dovode do njegovog oštećenja i kliničkih manifestacija bolesti.

MEHANIZMI ODBRANE OD INTRACELULARNIH BAKTERIJA

Intracelularne bakterije imaju sposobnost da prežive i da se replikuju unutar ćelija domaćina. Većina tih bakterija mogu da se replikuju i izvan ćelije i nazivaju se **fakultativno** intracelularne bakterije (npr. izazivač tuberkuloze i druge bakterije iz roda *Mycobacterium*), dok neke mogu da prežive isključivo u ćeliji, te su nazva-

Tabela 1: Odbrana od bakterijskih infekcija: najvažniji mehanizmi, načini njihovog izbegavanja i oštećenja do kojih mogu da dovedu

	Esktracelularne bakterije	Intracelularne bakterije
Mehanizmi urođene imunost	Fagocitoza Komplement (alternativni i lektinski put) Zapaljenje	Fagocitoza (neefikasna bez stimulacije) NK ćelije (stimulacija fagocita)
Mehanizmi stečene imunosti	Antitela (neutralizacija i opsonizacija) Komplement (klasičan put) Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th1 i Th17) (stimulacija fagocita i B-ćelija)	Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th1) (stimulacija fagocita) Citotoksični CD8 ⁺ T-limfociti (za bakterije u citoplazmi)
Mehanizmi izbegavanja odbrane	Polisaharidna kapsula Antigenska varijabilnost Inhibicija komplementa IgA proteaze Inhibicija fagocitoze	Sprečavanje nastanka fagolizozoma Inhibicija ubilačkih mehanizama Prelazak u citoplazmu
Oštećenja usled imunskog odgovora	Sistemska inflamacija (SIRS) Superantigeni Autoimunost (molekulska mimikrija)	Granulomi

SIRS - sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*)

ne **striktno** intracelularne bakterije (npr. bakterije iz roda *Chlamydia*). Intracelularne bakterije inficiraju fagocite i druge ćelije u organizmu (npr. epitelne) i u njih prodiru endocitozom (najčešće fagocitozom, a ponekad i posredstvom određenog receptora na površini ćelije). Ove bakterije su tokom evolucije razvile različite mehanizme kojima **izbegavaju intracelularno ubijanje** što im omogućava da prežive unutar fagocita. Takođe, zbog njihove lokalizacije u ćeliji, **nedostupne** su dejstvu humoralnih faktora, kao što su **antitela** i **komplement**. Zbog svega toga, imunski odgovor na intracelularne bakterije često nije dovoljno efikasan da ih u potpunosti eliminiše iz organizma, tako da one imaju tendenciju da perzistiraju i izazivaju **hronične infekcije**.

Urođena imunost na intracelularne bakterije

Glavne ćelije urođene imunosti u odbrani od intracelularnih bakterija su **fagociti** i **urođenoubilačke ćelije (NK ćelije)**. **Fagocitoza**, u odsustvu stimulacije, praktično je **neefikasna** u borbi protiv ovih bakterija. Stoga je za njihovo uspešno ubijanje i eliminaciju, neophodno da se fagociti stimulišu. U okviru urođene imunosti, taj posao obavljaju NK ćelije. Naime, intracelularne bakterije stimulišu NK ćelije tako što na ćelijama koje inficiraju indukuju ekspresiju aktivacionih liganada za NK ćelije, ili stimulišu makrofage (i dendritske ćelije) da produkuju IL-12, koji potom deluje na NK ćelije i aktivira ih. **NK ćelije**, sa druge strane, **produkuju IFN-γ** koji **aktivira makrofage** i stimuliše njihove ubilačke mehanizme. Iako važni u ranoj odbrani od intracelularnih bakterija, fagociti i NK ćelije obično nisu sposobni da ih eliminišu iz organizma, tako da je u infekciji ovim bakterijama, prevashodni zadatak urođene imunosti da ih **drži pod kontrolom** i sprečava njihovo širenje sve dok se ne razvije stečeni imunski odgovor.

Stečena imunost na intracelularne bakterije

Ćelularna imunost posredovana **T-limfocitima** predstavlja najvažniji mehanizam stečene imunosti u odbrani od intracelularnih bakterija. Ona obuhvata aktivnost CD4⁺ T-ćelija (prevashodno Th1 subpopulacije) i CD8⁺ T-ćelija. **CD4⁺ Th1 ćelije** nastaju diferencijacijom navnih T-ćelija pod uticajem IL-12 koga makrofagi i dendritske ćelije produkuju u odgovoru na intracelularne bakterije (i druge patogene). Th1 ćelije potom **aktiviraju makrofage** i stimulišu njihove mikrobicidne mehanizme kontaktom preko **CD40L** (koji re-

aguje sa CD40 na površini makrofaga) i posredstvom **IFN- γ** koga sekretuju. Pored toga, IFN- γ stimuliše B-limfocite da produkuju **antitela** koja **opsonizuju** bakterije i **aktiviraju komplement** klasičnim putem (neke potklase IgG), što može da doprinese efikasnijoj fagocitozi i na taj način pospeši efektorsku funkciju makrofaga. CD4⁺ T-ćelije deluju i tako što luče TNF i na taj način **indukuju** (pojačavaju) **zapaljenje**.

Neke intracelularne bakterije (npr. *Listeria monocytogenes*) imaju sposobnost da **napuste fagolizozom** i pređu u citoplazmu izbegavajući na taj način ubijanje kada se makrofag aktivira. Za efikasnu borbu protiv takvih bakterija neophodna je saradnja između CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita. Naime, CD4⁺ T-limfociti stimulišu fagocitozu makrofaga i ubijanje bakterija u fagolizozomu, ali za eliminaciju onih bakterija koje su prešle u citoplazmu potrebno je i učešće **citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita** koje prepoznaju bakterijske antigene prezentovane u sklopu MHC molekula I klase na površini inficiranih ćelija (pošto se antigeni poreklom iz citoplazme prezentuju ovim putem) i **ubijaju** te ćelije indukcijom apoptoze.

Mehanizmi kojim intracelularne bakterije izbegavaju imunski odgovor

Intracelularne bakterije su razvile različite mehanizme da izbegnu ubijanje nakon fagocitoze. Tako, na primer, neke bakterije **inhibiraju** spajanje fagozoma sa lizozomom i **nastanak fagolizozoma** u kome se inače aktiviraju ubilački mehanizmi fagocita (primer je izazivač tuberkuloze, *Mycobacterium tuberculosis*). Neke, pak, **inhibiraju stvaranje ubilačkih molekula** (npr. reaktivnih oblika kiseonika i azota) unutar fagolizozoma. Već pomenuta intracelularna bakterija, *Listeria monocytogenes*, produkuje protein listerio-lizin koji joj omogućava da **napusti fagolizozom** i pređe u citoplazmu i na taj način izbegne ubijanje.

Oštećenja usled imunskog odgovora na intracelularne bakterije

Imunski odgovor na intracelularne bakterije i aktivacija makrofaga mogu da dovedu i do oštećenja tkiva domaćina. To može da se desi prilikom **granulomatoznog zapaljenja** koje prati neke infekcije intracelularnim bakterijama (npr. *M. tuberculosis*). Naime, zbog svoje sposobnosti da izbegnu ubijanje unutar fagocita, intracelularne bakterije često opstaju u organizmu duže vreme (nekad godinama), što je često praćeno dugotrajnom (hroničnom) prezentacijom antigena i nakupljanjem aktiviranih T-limfocita i makrofaga koji pokušavaju da ograniče infekciju i eliminišu bakterije. Kao posledica toga, dolazi do formiranja granulomatoznog zapaljenja koje se histološki manifestuje kao **granulom**, odnosno nakupina aktiviranih limfocita (prevashodno Th1 subpopulacije) i makrofaga oko mikroorganizama, sa nekrozom i fibrozom koja oštećuje tkivo i može da dovede do različitih funkcionalnih ispada organa u kojem se patološki proces dešava.

ANTIGEN-ANTITELO REAKCIJE

Osnovne karakteristike antigen-antitelo reakcija
Imunoaglutinacija
Imunoprecipitacija

Antigen-antitelo reakcije predstavljaju reakcije između određenih antigena i odgovarajućih specifičnih antitela koje se odvijaju u laboratorijskim uslovima (*in vitro*). Ove reakcije čine osnovu imunoloških testova, odnosno metoda (engl. *immunoassay*) koje se koriste za određivanje prisustva različitih antigena ili antitela u nekom uzorku. Pošto antitela mogu sa visokom specifičnošću da se vežu za mnoge antigene, bilo da potiču od mikroorganizama ili su produkti imunskih i drugih ćelija u organizmu (citokini, hormoni i dr.), ove metode imaju veoma široku primenu u laboratorijskoj dijagnostici u raznim oblastima medicine (biohemiji, imunologiji, mikrobiologiji, endokrinologiji, hematologiji itd.), a takođe se mnogo koriste i u istraživačkom radu. Antigen-antitelo reakcije se ponekad nazivaju i **serološke reakcije**, s obzirom da je serum vrlo često jedna od komponenti reakcije.

Antigen-antitelo reakcije se mogu zamisliti kao jednačina sa jednom nepoznatom: na osnovu poznate komponente (antigena ili antitela) i rezultata reakcije određuje se prisustvo i količina nepoznate komponente (antigena ili antitela). U slučaju kada je cilj da se u uzorku detektuju određena antitela (npr. da se odredi klasa nekog specifičnog antitela), često je neophodno da se u reakciju uvede još jedno antitelo kao reagens. Radi se o antitelima koja su specifična za određene epitope u konstantnom delu teškog lanca imunoglobulina (npr. γ lanca u slučaju detekcije IgG) i takva antitela se nazivaju **anti-imunoglobulinska antitela** ili anti-antitela, jer se radi o antitelima koja su specifična za druga antitela. Ova antitela se obično dobijaju kada se eksperimentalne životinje imunizuju imunoglobulinima druge vrste (najčešće čoveka) i ona se ponekad nazivaju i sekundarna antitela, s obzirom da se antitelo koje se direktno vezuje za antigen, često naziva primarno antitelo.

Bez obzira na to koji se reagensi koriste, da bi rezultat reakcije bio vidljiv odnosno merljiv, neophodno je da se nastali antigen-antitelo kompleks (tzv. **imunski kompleks**) na neki način detektuje. To se obično postiže na dva načina:

- 1) ili dolazi do povezivanja ogromnog broja molekula antigena i antitela u velike komplekse koji se lako detektuju, golim okom ili fotometrijski (taj proces zavisi od osobina antigena, kao što su broj epitopa, veličina i rastvorljivost, odnosno osobina antitela, npr. broja vezujućih mesta za antigen);
- 2) ili se za neki od reagenasa (najčešće antitelo) veže određeni obeleživač, tj. marker (npr. fluorescentna boja) koji po odvijanju reakcije može da se detektuje golim okom ili odgovarajućim aparatom, bez obzira na veličinu nastalog kompleksa.

Svi testovi zasnovani na antigen-antitelo reakcijama mogu da budu kvalitativni, semi-kvantitativni ili kvantitativni. Kod **kvalitativnih testova**, rezultat se izdaje kao **pozitivan ili negativan**. Kod **semi-kvantitativnih testova** pozitivan rezultat izdaje se gradirano, npr. kao granični, slabo pozitivan, umereno pozitivan ili jako pozitivan (često se koriste simboli $\pm$, +, ++, +++ ili $\emptyset$ za negativan rezultat) ili kao titar antitela (videti kasnije). Kod **kvantitativnih testova** pozitivan rezultat izdaje se najčešće kao količina u jedinici zapremine tj. **koncentracija**. Jedinice mogu da budu različite, npr. $\mu\text{g/ml}$, nM/l i sl. Nekada se rezultat izdaje kao broj internacionalnih jedinica (IU, IU) u jedinici zapremine (ml, L). Rezultat kvantitativne reakcije dobija se poređenjem sa **standardima**, tj. rastvorima koji sadrže ispitivanu supstancu u poznatim koncentracijama. Obično se koristi niz rastvora rastućih koncentracija standarda na osnovu kojih se formira **standardna** ili **kalibraciona kriva** pomoću koje se potom određuje koncentracija ispitivane supstance u uzorku.

Kada se određuje ukupna količina pojedinih klasa imunoglobulina u serumu (IgG, IgM ili dr.), nezavisno od njihove specifičnosti, ta količina se iskazuje kao koncentracija (npr. to se radi u slučaju sumnje na deficienciju humoralne imunosti). Nasuprot tome, u slučaju kada se meri količina antitela specifičnih za jedan određeni antigen (npr. količina antitela specifičnih za antigen nekog mikroorganizama prilikom dijagnostike infekcije), najčešće nije moguće da se precizno odredi koncentracija (mali broj specifičnih antitela u odnosu na ukupnu količinu antitela u uzorku). Zbog toga se količina specifičnih antitela iskazuje kao **titar**. Za određivanje titra neophodno je da se napravi niz serijskih razblaženja uzorka. Najčešće se koristi dvostruko rastuće razblaženje (npr. 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 itd.). Sa svakim od tih razblaženja obavlja se reak-

cija sa standardnom (dogovorenom, propisanom) količinom specifičnog antigena i određuje rezultat (pozitivan ili negativan). **Titar** predstavlja **recipročnu vrednost najvećeg razblaženja** uzorka koji daje **pozitivnu reakciju**. Na primer, ako je pozitivna reakcija dobijena sa razblaženjem 1/200, a negativna sa razblaženjem 1/400, onda titar iznosi 200. U praksi se rezultati često izdaju i kao najveće razblaženje koje daje pozitivnu reakciju (npr. 1/8, 1/200 i sl.). Prilikom sumnje na određenu infektivnu bolest, često se od istog pacijenta uzmu dva uzorka u dva različita vremenska trenutka (npr. u razmaku od dve nedelje) i ispituje da li postoji promena u količini produkovanih antitela specifičnih za mikroorganizam koji izaziva tu bolest, pri čemu se **četvorostruka i veća promena titra** antitela između dva ispitivana uzorka smatra značajnim.

Pri izvođenju antigen-antitelo reakcija neophodno je koristiti i **negativne** i **pozitivne kontrole**. **Negativna kontrola** ne sadrži ispitivanu supstancu, ali osim toga savršeno imitira uzorak, dok **pozitivna kontrola** sigurno sadrži ispitivanu supstancu. Da bi se test smatrao pravilno izvedenim i rezultat bio pouzdan, negativna kontrola mora da bude jasno negativna a pozitivna jasno pozitivna. Pouzdanost rezultata svakog testa zasnovanog na antigen-antitelo reakcijama može da se iskaže kroz njegovu **osetljivost** i **specifičnost**. Ukratko, **osetljivost (senzitivnost)** predstavlja udeo ispitanika koji su stvarno identifikovani kao pozitivni i ukazuje na to koliko je u ispitivanoj populaciji lažno negativnih (npr. u testu čija je osetljivost 97%, može se očekivati 3% lažno negativnih), dok **specifičnost** predstavlja udeo zdravih ispitanika koji su stvarno identifikovani kao negativni i odslikava koliko je lažno pozitivnih (npr. u testu čija je specifičnost 95%, može se očekivati 5% lažno pozitivnih) (Za detaljnije objašnjenje ovih statističkih mera konsultovati odgovarajuće knjige iz statistike). U većini savremenih testova baziranih na principu antigen-antitelo reakcije, koriste se monoklonska antitela zbog čega ti testovi po pravilu imaju visoku specifičnost i osetljivost i daju pouzdane rezultate.

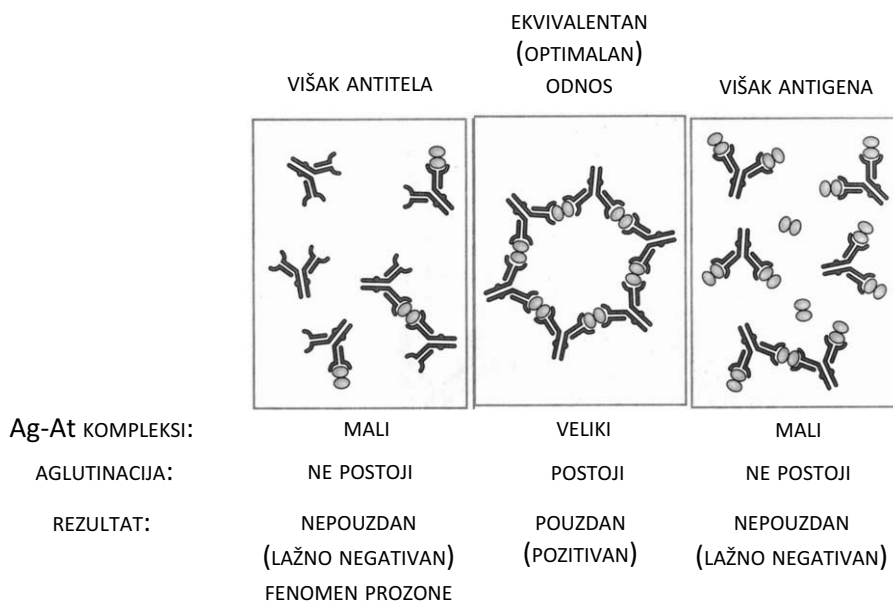
Na kraju treba naglasti da je potrebno da se u laboratoriju, uz uzorak, pošalju i sve relevantne informacije o pacijentu, a sa druge strane, laboratorija, uz rezultate analize koje izdaje, mora da priloži **referentne vrednosti** i navede metodu kojom je ispitivanje rađeno. Za pravilno tumačenje rezultata testa nepohodna je **dvosmerna komunikacija** između lekara koji traži da se uradi analiza i lekara laboratorije u kojoj se obavlja analiza. Rezultati dve analize su uporedivi samo ukoliko su urađeni istom metodom i sa istim reagensima.

U daljem tekstu biće opisani osnovni principi najčešće korišćenih testova baziranih na antigen-antitelo reakcijama, sa nekim primerima njihove primene u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Imunoaglutinacija

Imunoaglutinacija (aglutinacija) je laboratorijski dijagnostički test koji je baziran na reakciji između određenog antigena i odgovarajućih specifičnih antitela, pri čemu je **antigen nerastvorljiv**, odnosno predstavlja sastavni **deo velike nerastvorljive čestice** (npr. eritrocita, bakterije ili inertne čestice). U reakciji dolazi do međusobnog povezivanja (zgomilavanja) velikog broja molekula antitela i antigena u velike i razgranate imunske komplekse i kao rezultat nastaje **aglutinat** koji se može detektovati golim okom (ili eventualno lupom). U slučaju kada se aglutinišu eritrociti, reakcija se naziva **hemaglutinacija**. Od svih klasa antitela, IgM antitela imaju najizraženiji kapacitet da aglutiniraju antigene, s obzirom da su pentameri i da imaju 10 vezujućih mesta za antigen. Pored klase antitela, na efikasnost aglutinacije utiče i količina antigena i antitela u reakciji. Optimalno stvaranje aglutinata javlja se kada je odnos antigena i antitela **približno jednak** (u tzv. **zoni ekvivalencije**). Ako su antitelo ili antigen u velikom višku, reakcija između antigena i antitela će se odigrati, ali neće doći do izukrštanog povezivanja čestica antigena i antitela u vidljiv aglutinat zbog čega je reakcija lažno negativna (Slika 1). Odsustvo aglutinacije usled izrazitog viška antitela tradicionalno se naziva **fenomenom prozone**. Ovaj problem se može prevazići razblaživanjem ispitivanog seruma, čime se smanjuje količina antitela u reakciji i postiže zona ekvivalencije između antigena i antitela.

Imunoaglutinacija može da bude **direktna** i **indirektna** (indirektna se ponekad naziva i **pasivna**). U direktnoj imunoaglutinaciji, antigen (antigenska determinanta) je **sastavni deo velike čestice** (npr. molekul na površini bakterije) koja biva aglutinisana direktno od strane antitela, dok je kod **indirektno** imunoaglutinacije **antigen solubilni molekul** koji je pasivnom adsorpcijom ili hemijskim putem vezan za površinu velike, **nesolubilne čestice** (eritrocita ili inertnih čestica napravljenih najčešće od polistirena) koja postaje pasivni nosač datog antigena.



Slika 1. Shematski prikaz reakcije imunoaglutinacije i mogućih ishoda reakcije

Metodi imunoaglutinacije su po pravilu **kvalitativni testovi** (rezultat se izdaje kao pozitivan ili negativan) mada mogu da budu i **semi-kvantitativni** (npr. titar u slučaju kada se detektuju antitela). Oni se obično izvode na staklenoj pločici ili u epruveti, kratko traju (do 10 minuta), jeftini su i jednostavni za izvođenje i zadovoljavajuće su reproducibilnosti, specifičnosti i osetljivosti. Stoga imunoaglutinacija ima **značajnu primenu** u laboratorijskoj dijagnostici u medicini.

Jedno od najvažnijih primena direktne imunoaglutinacije je za **određivanje krvnih grupa**. Pored toga, imunoaglutinacija (i direktna i indirektna) se redovno koristi u mikrobiologiji za **dijagnozu mnogih infektivnih bolesti**, na osnovu detekcije prisustva specifičnih antitela ili antigena izazivača u uzorku pacijenta (serumu ili ponekad likvoru). Indirektna imunoaglutinacija se koristi i za **detekciju različitih autoantitela** koja se javljaju u sklopu mnogih autoimunskih bolesti. Tipičan primer je **reumatoidni faktor (RF)** koji predstavlja autoantitelo koje je specifično za drugo antitelo (tipično se radi o IgM specifičnom za Fc fragment IgG). RF se javlja u serumu ljudi obolelih od reumatoidnog artritisa i nekih drugih reumatskih bolesti i njegovo određivanje ima značaj u dijagnozi i/ili prognozi tih bolesti.

Poseban vid imunoaglutinacije predstavlja **antiglobulinski** ili **Kumbsov test** (engl. *Coombs*). On služi za **detekciju anti-eritrocitnih antitela** koja, iako se vezuju za eritrocite, ne dovode do njihove aglutinacije. Ovakva antitela se javljaju u različitim bolestima kao što su, npr. **hemolizne anemije** (autoimunske ili one izazvane lekovima) ili **hemolitička bolest novorođenčeta** koja može da nastane usled transplacentarnog prolaska majčinih anti-RhD IgG antitela senzibilisane Rh negativne majke u krvotok ploda koji je Rh pozitivan (danas se obično senzibilizacija majke sprečava odgovarajućom terapijom). Postoje dva tipa antiglobulinskog testa, **direktan** i **indirektan**. U **direktnom Kumbsovom testu**, ispituje se da li su eritrociti pacijenta (npr. onog koji ima hemoliznu anemiju) već obloženi subaglutinišućom količinom anti-eritrocitnih antitela i obavlja se tako što se u uzorak pacijenta doda antitelo specifično za humane imunoglobuline (anti-imunoglobulinsko antitelo) koje dovodi do aglutinacije eritrocita. **Indirektan Kumbsov test** služi za detekciju postojanja anti-eritrocitnih antitela u serumu ispitivane osobe (npr. anti-Rh antitela u serumu Rh negativne majke) i obavlja se u dve faze. U prvoj se serum pacijenta inkubira sa humanim eritrocitima (komercijalno dostupnim), a onda se u drugoj fazi dodaje anti-imunoglobulinsko antitelo koje dovodi do aglutinacije dodatih eritrocita.

Imunoprecipitacija

Imunoprecipitacija je laboratorijski dijagnostički test zasnovan na reakciji **precipitacije** (taloženja) **solubilnog antigena** pomoću odgovarajućih specifičnih antitela usled formiranja velikih imunskih kompleksa. Rezultat reakcije je **precipitat** (talog) i do njegovog formiranja dolazi samo ukoliko se ostvari optimalan (približno jednak) **odnos koncentracija** antigena i antitela (ako su u **zoni ekvivalencije**). Tako nastali talog se lako vizuelno detektuje (najčešće golim okom). U slučaju kada su antigen ili antitelo u velikom višku, reakcija se odigrava, ali se stvaraju mali solubilni kompleksi (tzv. mikroprecipitati) koji ostaju u rastvoru i ne izdavaju se u vidu vidljivog taloga. Ipak i tako nastali kompleksi se mogu detektovati pomoću odgovarajućih aparata, kao što je nefelometar (videti kasnije).

U zavisnosti od sredine u kojoj se precipitacija obavlja, postoje dve osnovne grupe metoda: metode imunoprecipitacije **u tečnom medijumu** i metode imunoprecipitacije **u polučvrstom medijumu** tj. **gelu** (napravljenog od agara, agaroze, poliakrilamida itd.). Obe grupe metoda se baziraju na difuziji solubilnog antigena i/ili antitela u odgovarajućem medijumu, pri čemu je difuzija u gelu znatno sporija. Naime, dok se precipitat u **tečnoj** sredini formira **relativno brzo** (često u roku od desetak minuta), do formiranja precipitata u **gelu** potrebno je znatno **duže vreme** (nekad i do 72 časa). Stoga se pri upotrebi gela ponekad koriste električna struja sa ciljem da se ubrza formiranje precipitata (tzv. metoda elektroimunodifuzije). Sa druge strane, talog u tečnoj sredini je najčešće nedetektibilan golim okom, dok se u gelu, na mestu ekvivalentnog odnosa koncentracija antigena i antitela, javlja precipitat u vidu **precipitacijske linije** koja je jasno vidljiva golim okom i stabilna duži vremenski period.

Imunoprecipitacija se najčešće koristi kao **kvantitativan test** za određivanje količine antigena ili antitela u **tečnim uzorcima**, serumu, plazmi ili nekom drugom (npr. likvoru). Njena prevashodna primena je za **određivanje količine pojedinih klasa imunoglobulina** u krvi što predstavlja važnu dijagnostičku proceduru u kliničkoj imunologiji, s obzirom da je koncentracija imunoglobulina često izmenjena u pojedinim bolestima, npr. imunodeficijencijama, kao što je hipogamaglobulinemija. Imunoprecipitacija se koristi i za **kvantifikovanje** ostalih **proteina plazme** (npr. različitih komponenti komplementa, C-reaktivnog proteina itd.), a ponekad se koristi i kao **kvalitativan** ili **semi-kvantitativan test** za detekciju prisustva određenih antigena, odnosno specifičnih antitela u uzorku.

Kvantitativne metode imunoprecipitacije

Za merenje količine imunoglobulina i drugih proteina u serumu i drugim biološkim tečnostima, najčešće se koriste **nefelometrija** koja se odvija u u tečnom medijumu i **radijalna imunodifuzija** koja se obavlja u gelu.

Nefelometrija predstavlja savremenu **kvantitativnu** metodu imunoprecipitacije u tečnom medijumu koja se koristi za brzo i precizno **merenje koncentracije** mnogih **proteina** u uzorku (npr. klasa imunoglobulina, komponenti sistema komplementa, C-reaktivnog proteina itd.). Bazira se na principu detekcije zamućenosti nastale usled stvaranja **mikroprecipitata** antigen-antitelo kompleksa u rastvoru na osnovu rasipanja upadnog zraka svetlosti iz lasera korišćenjem aparata koji se zove **nefelometar**. Koncentracija ispitivanog proteina se određuje poređenjem dobijenih vrednosti sa odgovarajućim vrednostima dobijenim sa uzorcima poznate koncentracije, tj. standardima. Nefelometrija je relativno skupa metoda (pored aparata skupi su i reagensi), ali je to **veoma osetljiva tehnika**, koja se zbog svoje preciznosti i pouzdanosti danas redovno koristi u kliničkoj praksi.

Radijalna imunodifuzija (RID test) je **kvantitativna** metoda koja se bazira na difuziji solubilnog antigena kroz gel u kome se nalazi ravnomerno raspoređeno antitelo (s obzirom da difunduje samo antigen ova tehnika se ponekad zove i **jednostruka radijalna imunodifuzija**). Na mestu ostvarivanja **ekvivalentnog odnosa** njihovih koncentracija formira se nerastvorni **precipitat u vidu kruga**. Kad se formira kružna linija precipitata, postoji direktna proporcija između prečnika kruga i količine unetog antigena što je iskorišćeno za određivanje nepoznate koncentracije antigena u ispitivanom uzorku poređenjem sa standardima. RID test se koristi za **merenje koncentracije** velikog broja **proteina plazme** (npr. IgG, IgM, IgA, C3, C4 itd.). U odnosu na nefelometriju, ova tehnika je **manje osetljiva** i pouzdana, te zbog ograničene osetljivosti, RID testom ne može da se određuje količina proteina čija je koncentracija niska u krvi (npr. IgE). Ipak cena izvođenja RID testa je znatno manja, te se ova tehnika obično koristi u manjim dijagnostičkim laboratorijama koje imaju ograničen broj uzoraka, a ne poseduju nefelometar.

Kvalitativne metode imunoprecipitacije

Za kvalitativno određivanje prisustva nekog antigena ili odgovarajućeg specifičnog antitela u uzorku često se koristi **dvostruka imunodifuzija u gelu**. Ovaj test se bazira na migraciji i solubilnog antigena i antitela kroz gel (odatle mu potiče ime dvostruka), pri čemu na mestu gde se ostvari zona ekvivalencije dolazi do pojave precipitacijske linije koja ukazuje na prisustvo ispitivanog antigena (ili antitela) u uzorku i rezultat se izdaje kao pozitivan. U slučaju kada u uzorku nema ispitivanog antigena/antitela, izostaje pojava linije, a rezultat se izdaje kao negativan. Iako se radi o **kvalitativnom testu**, pod određenim uslovima može da bude i **semi-kvantitativan**. Ova relativno pouzdana i jeftina tehnika nekada je imala mnogo veću primenu, ali se i danas često koristi i to najčešće za određivanje prisustva pojedinih **autoantitela u serumu** pacijenata sa različitim reumatskim bolestima.

Predavanje: Osnovni mehanizmi odbrane protiv virusnih, gljivičnih i parazitskih infekcija. Izbegavanje mehanizama odbrane od strane virusa i parazita.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. da objasne koji su mehanizmi imunskog odgovora angažovani u borbi protiv virusnih infekcija.
2. da objasne koji su mehanizmi imunskog odgovora angažovani u borbi protiv parazitskih infekcija.
3. da objasne koji su mehanizmi imunskog odgovora angažovani u borbi protiv gljivičnih infekcija.
4. kako imunski odgovor na viruse, parazite i gljivice može da dovede do oštećenja tkiva.
5. da navedu primere na koji način virusi, paraziti i gljivice izbegavaju imunski odgovor.

Vežba: Osnovne karakteristike antigen-antitelo reakcija sa obeleženim reagensima. Enzimski imunotest (EIA), radio-imunotest (RIA), imunofluorescencija, imunohromatografski testovi i njihova praktična primena.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. princip EIA testa i njegovu praktičnu primenu.
2. princip RIA testa i njegovu praktičnu primenu.
3. princip imunofluorescencije i protočne citofluorimetrije.
4. princip imunohromatografskih testova

Pitanja za ulazne testove

1. Imunoprecipitacija (dijagnostička primena i principi izvođenja).
2. Imunoaglutinacija (dijagnostička primena i principi izvođenja).
3. Enzimski imunotest (dijagnostička primena i principi izvođenja).
4. RIA (dijagnostička primena i principi izvođenja).
5. Imunofluorescencija (dijagnostička primena i principi izvođenja).

ODBRANA OD INFEKCIJA

(Mehanizmi odbrane od virusnih, gljivičnih i parazitskih infekcija)

Mehanizmi odbrane od virusnih infekcija

- Urođena imunost na viruse
- Stečena imunost na viruse
- Mehanizmi kojim virusi izbegavaju imunski odgovor
- Oštećenja usled imunskog odgovora na viruse

Mehanizmi odbrane od gljivičnih infekcija

- Urođena imunost na gljive
- Stečena imunost na gljive
- Mehanizmi kojim gljive izbegavaju imunski odgovor
- Oštećenja usled imunskog odgovora na gljive

Mehanizmi odbrane od parazitskih infekcija

- Urođena imunost na parazite
- Stečena imunost na parazite
- Mehanizmi kojim paraziti izbegavaju imunski odgovor
- Oštećenja usled imunskog odgovora na parazite

MEHANIZMI ODBRANE OD VIRUSNIH INFEKCIJA

Virusi su infektivni agensi jedinstveni po svojim biološkim osobinama, što je uslovalo da imunski sistem tokom evolucije razvije posebne mehanizme za odbranu od njih (Tabela 2). Virusni su **striktne intracelularni paraziti**, tj. mogu da se replikuju isključivo u živoj ćeliji domaćina koga inficiraju. Njihova građa je veoma jednostavna (na subcelularnom je nivou) i sastoji se od nukleinske kiseline (DNK ili RNK), proteina i eventualno omotača koji vodi poreklo od membrana ćelije u kojoj su se replikovali. U ćeliju po pravilu prodiru **vezivanjem** za određeni **receptor** na njenoj površini, tako da u zavisnosti od distribucije tog receptora na ćelijama, mogu da budu specifični samo za određeni tip ćelija ili da inficiraju mnoge različite ćelije u organizmu. Mada mnogi virusi indukuju **akutne infekcije** ograničenog vremenskog trajanja koje se završavaju potpunim uklanjanjem virusa iz organizma, neki mogu da izbegnu eliminaciju od strane imunskog sistema domaćina i ostanu duži period u organizmu (nekad i doživotno), uzrokujući dugotrajne infekcije hroničnog toka (tzv. **perzistentne infekcije**). U virusnim infekcijama, do oštećenja tkiva i bolesti obično dolazi usled promena koje izaziva virus tokom replikacije u ćelijama, ali i kao rezultat imunskog odgovora domaćina na virus koji je izazvao infekciju.

Urođena imunost na viruse

U urođenoj imunosti na viruse najvažniju ulogu imaju interferoni tip I i urođenoubilačke ćelije (NK ćelije). **Interferoni tip I (IFN- α i IFN- β)** su citokini koje luče ćelije inficirane virusom, čiji je prevashodni zadatak da **inhibiraju virusnu replikaciju** u susednim, neinficiranim ćelijama i na taj način spreče širenje virusa u organizmu. Oni te ćelije dovode u tzv. „**antivirusno stanje**“ aktivacijom odgovarajućih enzima koji interferiraju sa replikacijom virusa (odatle njihov naziv interferoni) i razgrađuju virusnu nukleinsku kiselinu. Pored toga, interferoni deluju i tako što na površini inficiranih ćelija **povećavaju ekspresiju MHC molekula I klase**, čime pospešuju njihovo **ubijanje** od strane CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita (CTL), a takođe mogu da stimulišu i citotoksičnu aktivnost NK ćelija i razvoj Th1 ćelija u organizmu (sve ove ćelije imaju važnu ulogu u odbrani od virusnih infekcija).

NK ćelije su ključne ćelije urođene imunosti u odbrani od virusa (i drugih intracelularnih infektivnih agensa). Na svojoj površini NK ćelije poseduju i aktivacione i inhibitorne receptore i njihova aktivacija je regulisana odnosom signala koji se prenose preko te dve grupe receptora. Na primer, virusi često dovode do **smanjenja ekspresije MHC molekula I klase** na površini inficiranih ćelija, čime izbegavaju ubijanje od strane CTL. Takve ćelije prepoznaju NK ćelije, aktiviraju se (pošto nisu angažovani inhibitorni receptori koji prepoznaju MHC molekule I klase) i **ubijaju inficirane ćelije** indukcijom apoptoze koristeći u osnovi iste mehanizme kao i CTL. Dakle, zadatak NK ćelija je da drže virusnu infekciju pod kontrolom dok se ne stvore efektorski CTL. Takođe, NK ćelije eliminišu ćelije inficirane virusom koje su „nevidljive“ za CTL, jer ne iskazuju MHC molekule I klase na svojoj površini.

Stečena imunost na viruse

Stečena imunost na viruse obuhvata i **humoralne** i **celularne mehanizme** i posredovana je antitelima i CTL. **Antitela** blokiraju uspostavljanje i širenje infekcije tako što deluju na viruse dok se oni nalaze izvan ćelije, neposredno po njihovom prodoru u organizam pre ulaska u ćelije, ili po završenoj replikaciji, kada virusi napuštaju ćeliju da bi inficirali druge, susedne ili udaljene ćelije. Svoju protektivnu funkciju antitela obavljaju prevashodno tako što **neutrališu infektivnost** virusa, vezivanjem za antigene njihovog kapsida ili omotača i na taj način ih sprečavaju da inficiraju ćelije. U osnovi protektivnog imuniteta koji ostaje nakon većine preležanih virusnih (i drugih) infekcija je produkcija visokoafinitetnih neutrališućih antitela (najčešće IgG i IgA) od strane dugoživećih plazma ćelija i memorijskih B-limfocita. Većina efikasnih virusnih vakcina zasniva se na indukciji neutrališućih antitela. Pored neutralizacije, antitela doprinose odbrani od virusa procesom **opsonizacije**, **aktivacijom komplementa** klasičnim putem, odnosno NK ćelijama posredovanom **ćelijskom citotoksičnošću zavisnoj od antitela** (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC).

Dakle, humoralna imunost i antitela mogu da spreče infekciju ili da zaštite od ponovne infekcije istim virusom, ali ne mogu da dovedu do eradikacije već uspostavljene infekcije, s obzirom da je virus unutar ćelije nedostupan antitelima. **Eliminacija virusa** koji se nalaze u ćeliji je moguća samo aktivnošću CTL. Glavna fiziološka uloga CTL je da prepoznaju ćelije inficirane virusom (ili nekim drugim intracelularnim patogenom) i ubiju ih eliminišući tako i virus iz organizma. CTL na inficiranoj ćeliji prepoznaju virusne peptide u okviru MHC molekula I klase (većina CTL su CD8⁺), a potom **indukuju apoptozu** ćelije posredstvom **perforina i granzima**, odnosno **FasL-Fas interakcije**. CTL mogu i direktno da deluju na virus unutar ćelije aktivacijom nukleaza koje razlažu virusni genom. Značaj citotoksičnog odgovora u odbrani od virusa ilustrovan je činjenicom da se na vrhuncu imunskog odgovora u nekim virusnim infekcijama broj CD8⁺ T-ćelija specifičnih za taj virus poveća i do 100.000 puta.

Mehanizmi kojim virusi izbegavaju imunski odgovor

Virusi su kroz evoluciju razvili čitav niz mehanizama kojim mogu da spreče ili izbegnu imunski odgovor domaćina. Jedan od njih su **antigenske varijacije**, nastale usled tačkastih mutacija u genomu virusa ili reasortimana genskih segmenata kod RNK virusa sa segmentiranim genomom. Usled toga dolazi do stvaranja antigenski različitih sojeva virusa koji su otporni na imunost uspostavljenu prethodnom infekcijom. Tipičan primer predstavlja virus influence, ali i mnogi drugi virusi imaju sposobnost da antigenski variraju (npr. HIV). Slično tome, mnogi virusi imaju veliki broj **antigenski različitih tipova** (npr. rinovirusi) čime je omogućen veliki broj ponovljenih infekcija istim virusom (ali različitim tipom). Neki virusi, npr. Herpesvirusi, stvaraju proteine koji inhibiraju transkripciju, transport ili stabilnu **ekspresiju MHC molekula I klase** na površini inficirane ćelije i na taj način izbegavaju citotoksični T-ćelijski odgovor. Pojedini virusi (npr. EBV), produkuju proteine koji su slični citokinima ili receptorima za citokine koji se nalaze na našim ćelijama (zbog čega su nazvani „**virokini**“ odnosno „**vioreceptori**“). Kroz kompeticiju sa citokinima, ti proteini mogu da inhibiraju ćelije imunskog sistema i promovišu perzistenciju virusa u organizmu. Neki virusi, kao HIV, direktno inficiraju imunske ćelije i time kompromituju imunski odgovor na njih, a neki to rade kroz **inhibiciju apoptoze**. Poseban oblik izbegavanja imunskog odgovora predstavlja uspostavljanje **latencije**. Naime, neki virusi ostaju u ćeliji u vidu ekstrahromozomske cirkularne DNK (npr. HSV) ili ugrade svoju DNK u genom inficirane ćelije (npr. provirus kod HIV-a) i uspostavljaju perzistentne infekcije (često sa periodima aktivacije i latencije koji se smenjuju). Iako je aktivacija praćena adekvatnim imunskim odgovorom koji uspostavlja kontrolu nad virusnom replikacijom, virus u latentnom stanju je nedostupan imunskom sistemu domaćina čime je onemogućeno njegovo trajno uklanjanje iz organizma.

Oštećenja usled imunskog odgovora na viruse

Mehanizmi kojim se organizam brani od virusa mogu da uzrokuju i **oštećenja domaćina**. Tipičan primer je imunski odgovor na infekciju hepatitis B virusom. Jak i efikasan imunski odgovor obično dovodi do izraženijih kliničkih manifestacija (žutice) sa akutnim tokom bolesti koji se najčešće završava eliminacijom virusa iz organizma. Sa druge strane, u hroničnom hepatitisu bolesnici obično nemaju klinički manifestnu bolest, ali ni ne uspostavljaju adekvatan imunski odgovor. Stoga su oni hronični nosioci virusa, koji se u njihovim hepatocitima konstantno replikuju, infektivni su i mogu da prenesu bolest na zdrave osobe. Takođe, kod bolesnika sa hepatitisom može da dođe i do formiranja **cirkulišućih imunskih kompleksa** između virusnih antigena i specifičnih antitela koji se potom talože u krvnim sudovima i dovode do sistemskih vaskulitisa i

drugih poremećaja. Pored toga, virusi se dovode u vezu sa nastankom pojedinih **autoimunskih bolesti**. Smatra se da sličnost (**molekularna mimikrija**) između pojedinih virusnih antigena i naših sopstvenih antigena u različitim ćelijama, može da pokrene autoimuni odgovor i dovede do oštećenja tih ćelija, odnosno tkiva. Iako se razni virusi dovode u vezu sa mnogim bolestima posredovanim imunskim mehanizmima (npr. dijabetesom ili mutiplom sklerozom), direktna veza između njih do danas nije nedvosmisleno dokazana.

Tabela 2: Odbrana od virusnih i gljivičnih infekcija: najvažniji mehanizmi, načini njihovog izbegavanja i oštećenja do kojih mogu da dovedu

	Virusi	Gljive
Mehanizmi urođene imunost	Interferoni tip I („antivirusno stanje“) NK ćelije (ubijanje inficiranih ćelija)	Fagocitoza (naročito neutrofili) Komplement (alternativni i lektinski put)
Mehanizmi stečene imunosti	Antitela (neutralizacija, opsonizacija, ADCC) Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th1) (stimulacija B-ćelija i CTL) Citotoksični CD8 ⁺ T-limfociti (ubijanje inficiranih ćelija)	Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th1) (stimulacija makrofaga) Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th17) (stimulacija neutrofila)
Mehanizmi izbegavanja odbrane	Antigenska varijabilnost Inhibicija ekspresije MHC molekula Virokini i viroreceptori Inhibicija apoptoze Latencija	Polisaharidna kapsula Prelazak u citoplazmu Antigenska varijabilnost
Oštećenja usled imunskog odgovora	Ubijanje inficiranih ćelija Cirkulišući imunski kompleksi Autoimunost (molekulska mimikrija)	Granulomi

ADCC - ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela; CTL - citotoksični T-limfocit

MEHANIZMI ODBRANE OD GLJIVIČNIH INFEKCIJA

Gljive žive kao saprofiti u prirodi, dok neke od njih naseljavaju tkiva čoveka i mogu da izazovu bolesti (**mikoze**) koje mogu da budu **lokalne** i **sistemske**. Morfološki se dele na **kvasnice** i **plesni** (pojedine gljive mogu da imaju obe forme) i najčešće su ekstracelularni patogeni, mada neke mogu da preživljavaju u fagocitima. Generalno, **mehanizmi odbrane** od gljiva su **efikasni** (Tabela 2), tako da gljive obično izazivaju infekcije kod osoba sa oslabljenim imunskim sistemom (tzv., oportunističke infekcije), mada ponekad mogu da izazovu bolest i kod imunokompetentnih ljudi (najčešće infekcije kože i sluzokože). Većina gljiva su ubikvitarne (svuda prisutne), dok se neke javljaju endemski u određenim regijama u svetu.

Urođena imunost na gljive

Fagociti su ključne ćelije urođene imunosti u odbrani od gljiva. Oni svojim receptorima prepoznaju mnoge strukture na površini gljiva (npr. polimere glukoze i manoze) i uspešno ih fagocituju i ubijaju. Naročito **neutrofili** imaju važnu ulogu u tome i osobe sa **neutropenijom** (smanjenim brojem neutrofila u krvi) su **veoma osetljive** na infekcije izazvane gljivama. Pored fagocitoze, neutrofili (i makrofagi) mogu **direktno da ubijaju gljive**, oslobađanjem mikrobicidnih susptanci (npr. reaktivnih oblika kiseonika). I **sistem komplementa** može da doprinese odbrani, s obzirom da mnoge gljive aktiviraju alternativni i lektinski put komplementa.

Stečena imunost na gljive

Celularna imunost, posredovana CD4⁺ T-ćelijama, je glavni mehanizam stečene imunosti u gljivičnim infekcijama. Citokini CD4⁺ T-ćelija su važni za održavanje optimalnog imunskog odgovora na gljive i glavnu ulogu

gu u tome imaju **IFN- γ** (koga proizvode **Th1 ćelije**) koji stimulira makrofage i **IL-17** (produkt **Th17 subpopulacije**), koji je moćan aktivator neutrofila. U odbrani od nekih gljiva (npr. *Cryptococcus neoformans*) i CD8⁺ T-ćelije mogu da imaju značajnu ulogu. Mada gljive obično indukuju humoralni odgovor, u većini infekcija nije jasno da li antitela imaju protektivnu ulogu (izuzetak je infekcija izazvana *Pneumocystis jirovecii*).

Mehanizmi kojim gljive izbegavaju imunski odgovor i oštećenja usled imunskog odgovora na gljive

Pojedine gljive (npr. *C. neoformans*) imaju **kapsulu** koja deluje antifagocitno ili inhibiraju fagocite tako što modifikuju produkciju nekih citokina. Neke gljive imaju sposobnost da u fagocitima pređu u filamentozne forme koje **napuste fagolizozome** i ulaze u citoplazmu. *P. jirovecii* poseduje genetski mehanizam kojim **menja strukturu** svojih **antigena** na površini, čime je omogućeno da inficira istog domaćina više puta.

Kod nekih gljivičnih infekcija imunski odgovor je taj koji dovodi do oštećenja tkiva. Na primer, u nekim infekcijama izazvanim intracelularnim gljivama (npr. histoplazmozi), razvija se **granulomatozno zapaljenje** koje dovodi do formiranja granuloma i fibroze.

MEHANIZMI ODBRANE OD PARAZITSKIH INFEKCIJA

Paraziti su velika grupa eukariotskih organizama koji su adaptirani da parazitiraju u ili na čoveku izazivajući različite bolesti (**parazitoze**). Oni obuhvataju **jednoćelijske protozoe** i **višećelijske helminte** (crve) i **artropode** (koji su najčešće ektoparaziti). **Protozoe** se javljaju u cističnom i vegetativnom obliku i u organizmu mogu da parazitiraju **izvan ili unutar ćelije**. Stoga imunski sistem u borbi protiv njih koristi mehanizme odbrane i od ekstracelularnih i od intracelularnih patogena (Tabela 3). Sa druge strane, **helminti** imaju složene životne cikluse sa većim brojem razvojnih oblika koji se razvijaju u više različitih domaćina (neki od njih parazitiraju u čoveku) i oni su **ekstracelularni** agensi koji su često **mногоstruko veći** od ćelija domaćina što je uslovalo da imunski sistem razvije posebne mehanizme za odbranu od njih (Tabela 3). Većina parazita (i protozoa i helminata) su **visoko adaptirani** na svog domaćina i **uspešno izbegavaju** (ili ograničavaju) **odbranu** domaćina. Zbog toga je imunski odgovor na parazite često **nedovoljno efikasan** da ih eliminiše iz organizma, uslovljavajući da infekcije koje izazivaju imaju **hroničan tok**. Tome doprinosi i činjenica da se paraziti najčešće prenose biološkim vektorima (npr. komarcima) ili hranom i vodom, zbog čega su ljudi u endemskim krajevima konstantno izloženi infekciji. Zato nije iznenađujuće da su parazitoze danas **najčešće infektivne bolesti** u svetu i procenjuje se da čak oko 30% svetske populacije ima neku parazitsku infekciju.

Tabela 3: Odbrana od parazitskih infekcija: najvažniji mehanizmi, načini njihovog izbegavanja i oštećenja do kojih mogu da dovedu

	Protozoe	Helminti
Mehanizmi urođene imunost	Fagocitoza (mnoge protozoe otporne) Komplement (alternativan put) (mnoge protozoe otporne)	Eozinofili - granule (oštećenje omotača helminata) Komplement (alternativan put) (većina helminata otporni)
Mehanizmi stečene imunosti	Antitela (ekstracelularne protozoe) Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th1) (protozoe otporne na fagocitozu) Citotoksični CD8 ⁺ T-limfociti (protozoe u citoplazmi)	IgE antitela (pomoć eozinofilima) Pomoćničke CD4 ⁺ T-ćelije (Th2) (stimulacija B-ćelija i produkcije IgE) (stimulacija eozinofila) (stimulacija mastocita, peristaltike i produkcije mukusa)
Mehanizmi izbegavanja odbrane	Antigenska varijabilnost Inhibicija komplementa „Skrivanje“ od imunskog sistema Inhibicija imunskog odgovora	
Oštećenja usled imunskog odgovora	Cirkulišući imunski kompleksi	Granulomi i fibroza

Urođena imunost na parazite

Glavni mehanizam urođene imunosti u **odbrani od protozoa** je **fagocitoza**. Ipak, mnoge protozoe su otporne na ubijanje unutar fagolizozoma i čak mogu i da se replikuju u njima (npr. lajšmanije). Sa druge strane, glavnu ulogu u borbi **protiv helminata** imaju **eozinofili** (većina infekcija helmintima je praćena povećanim brojem eozinofila u krvi, tzv. eozinofilijom). Oni poseduju **granule sa različitim supstancama toksičnim** za parazite (npr. baznim proteinom) koje mogu da oštete omotač parazita (tzv. tegument) i ubiju ih. Iako su helminti suviše veliki da bi bili fagocitovani, i fagociti mogu da doprinesu odbrani od njih oslobađanjem mikrobicidnih supstanci. Takođe, neki paraziti mogu da aktiviraju sistem komplementa alternativnim putem, ali su paraziti, po pravilu, otporni na ubijanje posredovano komplementom.

Stečena imunost na parazite

U **odbrani od protozoa** važnu ulogu imaju i **humoralna i celularna imunost**. **Antitela** su važna u odbrani od **ekstracelularnih protozoa**, kao i intracelularnih u fazi kada se nalaze izvan ćelije (npr. patogena ameba ili plazmodijum koji izaziva malariju). Za borbu protiv protozoa koje parazitiraju u **fagocitima**, ključnu ulogu imaju **Th1 ćelije** koje kontaktom i citokinima (IFN- γ) aktiviraju makrofage i pospešuju njihove ubilačke mehanizme. I **CD8⁺ T-ćelije** mogu da imaju značaj u borbi **protiv intracelularnih protozoa** (npr. protiv plazmodijuma u fazi dok se nalazi u hepatocitima). Iako često nedovoljna da elimiše patogene ili spreči ponovnu infekciju njima, stečena imunost koja se vremenom razvije ipak može da u određenoj meri štiti domaćina. Primer je malarija, koja u endemskim krajevima izaziva najtežu kliničku sliku kod dece (sa izraženom smrtnošću), dok kod odraslih ima znatno blaži, često asimptomatski tok.

Odbrana od helminata posredovana je **Th2 imunskim odgovorom**. U odgovoru na helminte, dolazi do diferencijacije **CD4⁺ Th2 ćelija**, koje luče IL-4 i druge citokine i dovode do produkcije IgE antitela i aktivacije eozinofila, mastocita i bazofila, što sve može da doprinese eliminaciji helminata iz organizma. Naime, u prisustvu **IL-4**, B-limfociti produkuju **IgE antitela** usmerena na antigene parazita. IgE antitela mogu da se vežu za helminte i **pomognu eozinofilima** da ih prepoznaju i ubiju (eozinofili imaju receptor za Fc fragment IgE), ili da se **vežu za mastocite** i aktiviraju ih da luče citokine i **indukuju zapaljenje**. Drugi važan Th2 citokin, **IL-5**, deluje tako što stimuliše razvoj i **aktivaciju eozinofila**. Pored toga, Th2 citokini dovode i do nakupljanja eozinofila i bazofila i proliferacije mastocita u tkivima u kojima se nalaze paraziti. Mogu i da **stimulišu peristaltiku i sekreciju mukusa**, što pomaže izbacivanju helminata koji parazitiraju u digestivnom traktu.

Mehanizmi kojim paraziti izbegavaju imunski odgovor

Kao što je već pomenuto, paraziti (i protozoe i helminti) su tokom evolucije razvili veliki broj različitih mehanizama kojim izbegavaju ili ograničavaju imunski odgovor domaćina. **Antigenske varijacije** su čest mehanizam izbegavanja odbrane, bilo usled postojanja više razvojnih oblika parazita koji su antigenski različiti (kao kod plazmodijuma) ili stalnoj promeni površinskih antigena (kod afričke tripanozome). Slično tome, lajšmanija menja svoj površinski antigen (lipofosfoglikan) i na taj način izbegava ubijanje od strane komplementa i fagocita. Neki drugi paraziti **preuzimaju regulatorne proteine komplementa** od domaćina i na taj način izbegavaju njegovu aktivaciju, dok neki otpuštaju površinske antigene posle vezivanja antitela za njih. Mnogi paraziti se „**skrivaju**“ od imunskog sistema boravkom u određenim regijama nedostupnim imunskom sistemu (npr. gastrointestinalnom traktu) ili razvijanjem cisti. Konačno, u nekim parazitozama je primećena **inhibicija imunskog odgovora**, verovatno usled produkcije određenih inhibitornih citokina od strane ćelija domaćina, mada tačni imunosupresivni mehanizmi u tim infekcijama nisu u potpunosti razjašnjeni.

Oštećenja usled imunskog odgovora na parazite

Imunski odgovor na parazite često dovodi do oštećenja tkiva. U mnogim infekcijama helmintima, tipično dolazi do snažnog Th2 odgovora, nakupljanja Th2 ćelija, eozinofila, makrofaga i fibroblasta i **formiranja granuloma** (obratiti pažnju da se ovaj tip granuloma razlikuje od onog koji nastaje usled Th1 odgovora na intracelularne bakterije). Iako je cilj takvog granuloma da ograniči širenje parazita po organizmu, hronična stimulacija imunskog sistema koja ide uz to na kraju dovodi do **izražene fibroze**, a ponekad i do gubitka funkcije organa u kojem se dešava (npr. izražena ciroza jetre usled formiranja granuloma oko jaja trematoda iz roda *Schistosoma*). U pojedinim infekcijama (npr. malariji), može da dođe do **formiranja imunskih kompleksa** između antigena parazita i specifičnih antitela, njihovog taloženja u malim krvnim sudovima i odgovarajućih patoloških promena (videti imunokompleksne bolesti u udžbeniku imunologije).

ANTIGEN-ANTITELO REAKCIJE SA OBELEŽENIM REAGENSIMA

Enzimski imunotest

Radio-imunotest

Imunofluorescencija i protočna citofluorimetrija

Brzi imunološki (imunohromatografski) testovi

Mnogi imunološki testovi su bazirani na principu antigen-antitelo reakcije u kojima je jedan od reagensa obeležen nekim **obeleživačem (markerom)** koji može da se vidi ili detektuje odgovarajućim aparatom. U velikoj većini testova marker je vezan za antitelo, mada se ponekad obeležava i antigen (npr. u tehnici koja se zove RIA, radioaktivni izotop se često vezuje za antigen). U slučaju kada je obeleženo antitelo, marker se hemijskim putem **vezuje za Fc fragment imunoglobulina**, dok Fab fragmenti ostaju slobodni da reaguju sa antigenom (pri tome veći broj molekula obeleživača može da se veže za jedan molekul antitela što pojačava signal koji se detektuje i doprinosi većoj osetljivosti ovih tehnika). Kao obeleživači se koriste različiti enzimi, fluorescentne boje, radioaktivni izotopi, koloidno zlato i drugo. U zavisnosti od korišćenog markera, razlikujemo nekoliko različitih metoda od kojih su danas najčešće u upotrebi enzimski imunotest, radio-imunotest i imunofluorescencija.

Enzimski imunotest

Enzimski imunotest EIA ili **ELISA** (engl. *Enzyme ImmunoAssay* ili *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) je metoda koja je bazirana na antigen-antitelo reakciji u kojoj je jedan od reagensa (tipično antitelo) **obeležen enzimom** (najčešće korišćeni enzimi su peroksidaza i alkalna fosfataza). Po odigravanju reakcije između antigena i obeleženog antitela, dodaje se odgovarajući supstrat koji je tako odabran da pod katalitičkim dejstvom enzima od njega nastaje obojeni produkt. Boja se potom detektuje **kolorimetrijski**, pri čemu je jačina dobijenog signala (iskazana kao **apsorbancija**) proporcionalna količini ispitivanog molekula u uzorku.

ELISA test se prevashodno koristi **za detekciju molekula (antigena ili antitela) u rastvoru**, odnosno **tečnim uzorcima** (npr. serumu, likvoru, urinu itd.). Ona se najčešće obavlja u **pločama za mikrotitraciju** koje imaju 96 rupica (bunarčića), pri čemu u svakoj rupici može da se ispita po jedan uzorak što omogućava istovremenu analizu velikog broja uzoraka ovom metodom (Slika 3).

A) Detekcija antitela

Mikrotitraciona ploča je obložena antigenom



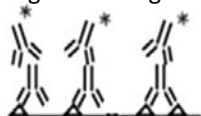
Dodavanje uzorka koji sadrži antigen-specifična antitela



Pranje



Dodavanje detekcionog (sekundarnog) antiimunoglobulinskog antitela



B) Detekcija antigena („sendvič“ ELISA)

Mikrotitraciona ploča je obložena primarnim antitelom



Dodavanje uzorka koji sadrži antigen



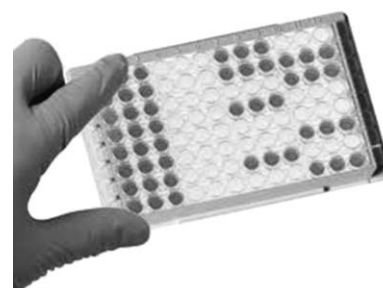
Pranje



Dodavanje detekcionog antitela specifičnog za antigen



Slika 2. Uporedni prikaz izvođenja ELISA testa kojim se detektuju A) antitela i B) antigeni (tzv. „sendvič“ ELISA).



Slika 3. Ploča za mikrotitraciju

Test se sastoji iz nekoliko faza i zasniva se na principu da se u rupicu u kojoj se obavlja, uvodi jedan po jedan reagens, inkubira određeno vreme i potom ispira da bi se uklonili nevezani reagensi. Na slici 2, prikazan je **princip ELISA testa** kada se detektuje antitelo (pod A), odnosno antigen (pod B). U slučaju kada se u uzorku **detektuje antitelo** specifično za određeni antigen (npr. antigen nekog mikroorganizma), taj antigen se prethodno vezuje za plastiku u rupici u kojoj se reakcija obavlja. Dalje se test odvija tako što se redom u istu rupicu doda uzorak u kojem se traže antitela, pa sekundarno anti-imunoglobulinsko antitelo obeleženo enzimom i na kraju supstrat. U slučaju kada se u uzorku **detektuje antigen**, za plastiku je vezano antitelo specifično za taj antigen (neobeleženo), pa se potom dodaje uzorak, zatim još jedno antitelo (specifično za neku drugu antigensku determinantu ispitivanog antigena, tzv. detekciono antitelo) koje je obeleženo enzimom i na kraju supstrat. Ova varijanta ELISA testa se naziva „**sendvič**“ ELISA, pošto antigen biva uhvaćen između dva antitela koja su specifična za isti antigen, ali ne i iste epitope čime ne ometaju vezivanje onog drugog. U slučaju kada u uzorku postoji ispitivana supstanca (antigen ili antitelo) obeleženo antitelo će se vezati i po dodavanju supstrata razvije se boja čija je jačina proporcionalna količini te supstance (više supstance u uzorku—više vezanog obeleženog antitela—jača boja) iz čega proizilazi mogućnost kvantifikacije u ELISA testu. Sa druge strane, kada nema ispitivanog antigena ili antitela u uzorku, antitela obeležena enzimom se neće vezati, tako da neće doći ni do formiranja obojenog produkta po dodavanju supstrata. Dakle, odsustvo obojene reakcije se proglašava negativnim rezultatom.

ELISA može da bude **kvalitativna** ili **kvantitativna**. Rezultat kvalitativnog testa se izdaje kao pozitivan ili negativan (primer je ELISA test za određivanje postojanja HIV infekcije). Pri korišćenju **kvalitativnog testa** veoma je važno definisati vrednosti apsorbancije koja je donja granica za pozitivan rezultat (tzv. „**cut-off**“ **vrednost**). Postoje više načina za određivanje „cut-off“ vrednosti i obično je to određeno od strane proizvođača testa. Na primer, jedan od načina je poređenje sa vrednostima negativne i slabo pozitivne kontrole, pri čemu se „cut-off“ vrednost određuje kao srednja vrednost apsorbancija za negativnu i slabu pozitivnu kontrolu. U slučaju **kvantitativnog ELISA testa**, rezultat se izdaje kao koncentracija ispitivanog antigena i ona se određuje poređenjem vrednosti apsorbancije ispitivanog uzorka sa vrednostima apsorbancija dobijenih **sa standardima**.

Enzimski imunotestovi imaju **visoku specifičnost i osetljivost**. Veoma su **praktični**, jer omogućavaju istovremenu analizu većeg broja uzoraka. Takođe, ne zahtevaju korišćenje skupih aparata (osim kolorimetra) i jednostavni su za izvođenje, što ih čini pristupačnim tehnikama za većinu laboratorija. Zbog svih ovih prednosti, ova metoda je danas jedna od najviše korišćenih imunoloških metoda i našla je primenu u raznim oblastima medicine. Tako, na primer, ELISA se često koristi za **dijagnozu infektivnih bolesti**, bilo da se detektuju solubilni antigeni infektivnih agenasa ili specifična antitela. ELISA se koristi i za određivanje postojanja **autoantitela** kod pacijenata sa autoimunskim bolestima ili **specifičnih antitela na alergene** kod atopičara. Kada su u pitanju detekcija specifičnih antitela, ELISA test omogućava i **određivanje** njihovog **izotipa** (klase) i **aviditeta** (jačine kojom se antitela vezuju za svoje antigene). ELISA se često koristi i za **precizno merenje količine različitih proteina** (hormona, citokina, tumorskih markera i mnogih drugih) u serumu i drugim tečnim uzorcima. Zbog **visoke osetljivosti** savremenih ELISA testova, ova metoda je danas u velikoj meri zamenila RIA test u laboratorijskoj dijagnostici i istraživanju.

Radio-imunotest

Radio-imunotest ili **RIA** (engl. *RadioImmunoAssay* - RIA) je imunološka tehnika kojom se ispitivani molekul detektuje pomoću specifičnog antitela obeleženog **radioaktivnim izotopom** po sličnom principu kao i u enzimskom imunotestu. Takođe, postoje i varijante ove metode u kojima je antigen obeležen radioaktivnim izotopom. Signal se detektuje merenjem radioaktivnosti (tj. broja raspada radioaktivnog izotopa) pomoću odgovarajućeg **brojača**, a količina ispitivanog antigena se određuje poređenjem **sa standardima**. RIA je **veoma osetljiv kvantitativni test**, koji se koristi se za određivanje **vrlo niskih koncentracija antigena** u rastvoru, tj. **tečnim uzorcima**, kao, na primer, pojedinih hormona u krvi. Zbog toga je RIA, kada je razvijena pedesetih godina prošlog veka, revolucionarno promenila medicinu (naročito endokrinologiju), jer do tada nije postojala tehnika kojom bi se merile supstance koje se u telesnim tečnostima nalaze u malim količinama. Takav je slučaj i sa IgE antitelima koje se vezuju za receptore na mastocitima i u krvi se nalaze u veoma malim koncentracijama. Za određivanje prisustva IgE antitela specifičnih za

određene alergene u krvi osoba sa alergijama ranije se mnogo koristila **RAST** metoda (engl. RadioAllergoSorbentTest - RAST), koja predstavlja jednu od varijanti RIA testa.

RIA test je veoma precizan i pouzdan test, a pored osetljivosti, njegove prednosti su i **visoka specifičnost** i relativno **pristupačna cena**. Ipak, ova tehnika ima i **ozbiljne nedostatke** kao što su problemi sa nabavkom radioaktivno obeleženih reagenasa, poluživot radioaktivnih izotopa, izlaganje zračenju tokom rada i problem odlaganja radioaktivnog otpada. Zbog takvih ograničenja, kao i činjenice da je osetljivost novih generacija enzimskih imunotestova izrazito povećana, danas se RIA (uključujući i RAST metodu) sve više napušta i **zamenjuje enzimskim imunotestovima** i drugim osetljivim imunološkim metodama.

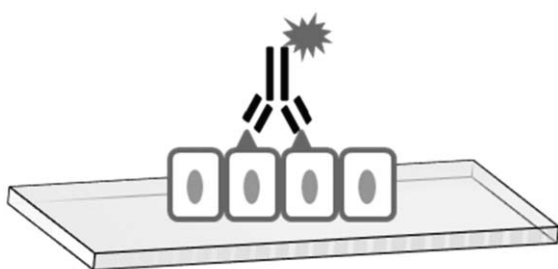
Imunofluorescencija

Imunofluorescencija (IF) je tehnika bazirana na antigen-antitelo reakciji u kojoj se za otkrivanje nekog molekula koriste antitela obeležena **fluorescentnom bojom (fluorohromom)**. Fluorescencija je osobina pojedinih supstanci da kada se izlože svetlosti određene talasne dužine emituju svetlost druge talasne dužine, koja se vidi kao određena boja. Ova tehnika se prevashodno koristi za detekciju **antigena na ćelijama (ili unutar njih)**, mada se može koristiti i za **detekciju antitela** (kako u serumu, tako i onih koja su vezana za ćelije u tkivima u okviru pojedinih autoimunskih bolesti). Ova tehnika može da se izvodi **na mikroskopskom predmetnom staklu** u kojem slučaju je za uočavanje rezultata neophodan **fluorescentni mikroskop**, koji se od klasičnog optičkog mikroskopa razlikuje po izvoru svetlosti (kod fluorescentnog mikroskopa se obično koristi neki izvor UV svetla) i postojanju odgovarajućih filtera koji propuštanjem samo određene talasne dužine svetlosti omogućavaju jasniju sliku. Druga mogućnost je da se imunofluorescencija izvodi u uzorcima koji su u suspenziji (npr. ćelije periferne krvi) kada se analiza vrši pomoću **protočnog citofluorimetra** (engl. *flow cytometer*, videti kasnije). Imunofluorescencija je **kvalitativna tehnika**, pri čemu se pojava odgovarajuće boje na ispitivanim ćelijama tumači kao pozitivan rezultat, a njeno odsustvo kao negativan. Pod određenim uslovima, imunofluorescencija može da bude i **semi-kvantitativna** (npr. kada se određuje titar u slučaju detekcije antitela u serumu). Ponekad, imunofluorescencija je i **kvantitativna** metoda, prvenstveno kada se protočnom citofluorimetrijom određuje srednji stepen fluorescencije na analiziranim česticama.

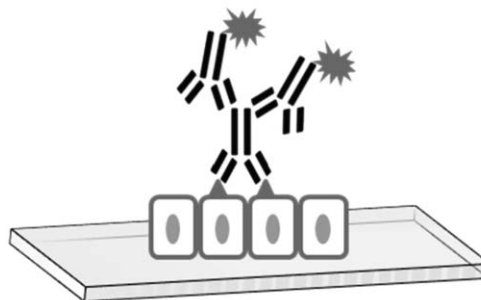
Postoje dve varijante ove tehnike, **direktna imunofluorescencija (DIF)** i **indirektna imunofluorescencija (IIF)**. Kod DIF tehnike, primarna antitela (ona koja su specifična za antigen) su obeležena fluorescentnom bojom, a kod IIF za antigen se najpre vezuju specifična neobeležena antitela, a potom se u sistem dodaju anti-imunoglobulinska, tzv. sekundarna antitela, obeležena fluorescentnom bojom. **Direktnom IF** detektuju se **antigeni u/na ćelijama u tkivima** korišćenjem obeleženih antitela specifičnih za ispitivani antigen (Slika 4a). Na primer, DIF testom se dokazuje prisustvo antigena bakterije *Chlamydia trachomatis* u preparatu uretralnog brisa u slučaju hlamidijalne infekcije ili prisustvo depozita fragmenata nastalih aktivacijom komplementa i imunoglobulina u isečcima kože ili bubrega kod različitih bolesti. **Indirektna IF** se takođe koristi za dokazivanje **antigena**, što se izvodi ukoliko nisu dostupna obeležena specifična antitela, pa se koristi kombinacija specifičnog neobeleženog i sekundarnog obeleženog anti-imunoglobulinskog antitela (Slika 4b). Za razliku od DIF, IIF može da se koristi i za detekciju prisustva **specifičnih antitela** u serumu i drugim telesnim tečnostima. Tada je potrebna mikroskopska pločica sa tkivom ili ćelijama kao supstratom za koja će se vezati antitelo iz uzorka. Primer za korišćenje IIF u ove svrhe je za **određivanje autoantitela** u različitim autoimunskim bolestima. Na primer, tako se detektuju antinuklearna antitela (ANA) prilikom laboratorijske evaluacije sistemskih bolesti vezivnog tkiva (u tom slučaju supstrat su ćelije sa jedrom), ili se određuju antineutrofilna citoplazmatska antitela ili ANCA u dijagnozi vaskulitisa (supstrat su neutrofili). Na sličan način se dokazuju i antivirusna antitela u krvi pacijenata (na predmetnom staklu su fiksirane ćelije inficirane virusom).

Imunofluorescencija je pouzdana kvalitativna tehnika **relativno visoke specifičnosti i osetljivosti** zbog čega se često koristi u dijagnostičkim i istraživačkim laboratorijama. Ipak, ova tehnika ima i **određene nedostatke**, koji ograničavaju njenu primenu. S obzirom da se rezultat često procenjuje gledanjem pod mikroskopom, postoji određena doza subjektivnosti prilikom izdavanja rezultata, a i sama cena fluorescentnog mikroskopa je prilično visoka. Takođe, potreba da se svaki preparat sa uzorkom detaljno pregleda ograničava broj uzoraka koji može da se analizira ovom tehnikom.

Slika 4.a) Direktna IF



Slika 4.b) Indirektna IF



Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija je metoda kojom se detektuju svetlosni parametri **pojedinačnih ćelija u suspenziji** na osnovu obeležavanja fluorescentnom bojom, najčešće konjugovanom za antitelo koje se vezuje za neki molekul na ili u ćeliji. Čelije pri tom bivaju izložene svetlosti lasera i prolaze kroz sistem za detekciju na taj način da se u jednom trenutku registruje samo jedna ćelija koja se nalazi u jednoj mikrokapi (detektuje se jedna po jedna ćelija). Boje koje se najčešće koriste za obeležavanje antitela su fluorescentni izotiocijanati (FITC, zelena fluorescencija) i fikoeritrin (PE, narandžasta fluorescencija), a pored fluorescencije, ovom metodom mogu da se detektuju i veličina i granuliranost ćelija.

Korišćenjem fluorescentno obeleženih antitela za različite površinske molekule moguće je odrediti **zastupljenost ćelija u suspenziji** koje imaju takav molekul odnosno ćelijski marker (npr. korišćenjem antitela za CD4 molekul može da se odredi broj pomoćničkih CD4⁺ T-ćelija u krvi). Karakterizacija ćelija na osnovu markera se naziva **imunofenotipizacija**.

Protočna citofluorimetrija ima **široku primenu u dijagnostici**. Vršiti se u cilju postavljanja dijagnoze i određivanja terapije i prognoze bolesti kod nekih **limfoproliferativnih bolesti i imunodeficijencija** (npr. leukemije, primarne imunodeficijencije i HIV infekcije). Tako na primer, samo B-ćelijske limfome koji ekspresiraju CD20 ima smisla lečiti rituksimabom (anti-CD20 monoklonskim antitelom) te je neophodno pre započinjanja terapije izvršiti imunofenotipizaciju tumorskih ćelija. Takođe, protočna citofluorimetrija je važna za praćenje terapijskog odgovora kod različitih bolesti (npr. pad broja CD4⁺ T-limfocita ukazuje na progresiju HIV infekcije odnosno na neadekvatan terapijski odgovor).

Pored dijagnostike, protočna citofluorimetrija ima nezamenjivu ulogu u istraživačkim laboratorijama. Osim imunofenotipizacije i određivanja tipa ćelije, na osnovu površinskih markera može se odrediti i faza sazrevanja ćelije, kao i njen aktivacioni status jer se pojedini molekuli izgube, a drugi počnu da se ispoljavaju u određenom stadijumu (npr. alfa lanac receptora za IL-2 se javlja na T-limfocitu nakon aktivacije). Vrlo često se u istraživačke svrhe ne detektuju samo površinski markeri nego i molekuli u unutrašnjosti ćelije. Za to se primenjuje tzv. unutarćelijsko bojenje koje zahteva da se prethodno ćelijska membrana učini propustljivom za obeleženo antitelo. Na ovaj način može da se utvrdi da li, recimo, populacija CD3⁺ ćelija (T-limfocita) pod određenim eksperimentalnim tretmanom sintetiše IFN- γ . Pored fluorescentno obeleženih antitela, kao reagensi mogu da se koriste i druga hemijska jedinjenja koje fluoresciraju i to je našlo primenu za analizu ćelijskog ciklusa, detekciju apoptoze, oksidativnog stresa i promena u ćelijskoj koncentraciji Ca²⁺ i u mnoge druge svrhe.

Postoje i uređaji koji ne samo da mogu da identifikuju ćelije na osnovu markera, nego imaju mogućnost da **odvoje različite populacije ćelija** (npr. one koje imaju od onih koje nemaju dati marker) - tzv. **sorteri**.

Brzi imunološki (imunohromatografski) testovi

Brzi imunološki testovi se zasnivaju na **imunohromatografskoj tehnici**, nazvanoj tako jer se koriste **antitela koja su obeležena nekom bojom** (koja nije fluorescentna). Kao obeleživač se koriste različiti molekuli, uključujući i koloidno zlato čija je upotreba vrlo raširena zbog njegove velike stabilnosti. Princip ove tehnike je da se solubilni antigen u uzorku vezuje za obojena antitela, a zatim tako nastali antigen-antitelo kompleksi migriraju sa frontom tečnosti pod dejstvom kapilarnih sila kroz poroznu membranu ili odgovarajuću

polimersku trodimenzionalnu strukturu (matriks). Kada kompleksi dospeju do još jednog antitela (specifičnog za isti antigen, ali drugi epitop) koje je neobeleženo i fiksirano za membranu/matriks, ti kompleksi se nagomilavaju u velikom broju što se manifestuje kao jasna, **golim okom vidljiva traka određene boje** (prisustvo odgovarajuće trake se tumači kao pozitivan nalaz, a njeno odsustvo kao negativan nalaz). Takođe, na ovaj način mogu da se detektuju i antitela u uzorku dodavanjem sekundarnog anti-imunoglobulinskog antitela obeleženog odgovarajućom bojom, koje se vezuje za formirani antitelo kompleks na membrani/matriksu.

Imunohromatografski testovi su **kvalitativni** i služe za određivanje prisustva različitih antigena ili specifičnih antitela u **tečnim uzorcima** (npr. serumu ili urinu). U slučaju kada uzorak nije tečan (npr. stolica), on se pre izvođenja testa rastvori u odgovarajućem puferu da bi migracija kroz membranu ili matriks bila moguća. S obzirom da se koriste monoklonska antitela, ovi testovi su pouzdani i imaju **visoku specifičnost i osetljivost**. Njihova velika prednost je i **jednostavnost izvođenja i brzina dobijanja rezultata** (najčešće posle nekoliko minuta), a imaju i relativno pristupačnu cenu. Danas je komercijalno dostupno mnogo različitih testova baziranih na principu imunohormatografije. Tako, na primer, postoje testovi za detekciju različitih infektivnih agenasa, kao što su virus influence, virusi prouzrokovajući gastroenteritisa (rotavirus i adenovirus), streptokok grupe A i drugi. Na sličnom principu rade i testovi za brzu dijagnozu trudnoće (detekcijom β hCG u urinu) ili dokazivanje tragova krvi u forenzici (detektovanjem hemoglobina). U ove testove spada i ImmunoCAP test koji služi za detekciju IgE antitela specifičnih na različite alergene i ovaj test je u znatnoj meri zamenio do nedavno korišćenu RAST metodu (videti RIA test).

Predavanje: Evaluacija imunskog sistema. Dijagnostika bolesti posredovanih imunskim mehanizmima i imunodeficijencija.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. koji se uzorci i na koji način uzimaju za evaluaciju ćelija i humoralnih komponenti imunskog sistema.
2. koje su metode brojanja leukocita.
3. da navedu osnovne markere T i B-limfocita kao i NK ćelija i znaju da se njihov broj određuje protočnom citofluorimetrijom. Upoznati su i sa drugim primenama protočne citofluorimetrije u evaluaciji imunskog sistema.
4. metode izdvajanja pojedinačnih tipova ćelija iz mešovitih ćelijskih populacija.
5. metode funkcionalnih ispitivanja fagocita i NK ćelija.
6. kako se indukuje i meri proliferacija T i B-limfocita.
7. da je moguće meriti koncentracije komponenti komplementa, pojedinih izotipova ukupnih antitela i antigen specifičnih kao i sekretovanih citokina.

Seminar: Poremećaji izazvani imunskim odgovorom. Reakcije preosetljivosti I, II, III i IV tipa (mehanizmi oštećenja, klinički sindromi i principi terapije).

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. da definišu reakcije preosetljivosti. Uviđaju da isti mehanizmi dovode do oštećenja tkiva u reakcijama preosetljivosti kao i da se ne razlikuju od mehanizama koji učestvuju u odbrani organizma od infekcija i tumora i mehanizama oštećenja u autoimunskim bolestima.
2. podelu reakcija preosetljivosti na četiri tipa i osnovne mehanizme koji dovode do oštećenja tkiva.
3. redosled događaja u nastanku I tipa preosetljivosti.
4. da navedu nekoliko medijatora oštećenja tkiva u reakcijama I tipa preosetljivosti i znaju mehanizme oštećenja tkiva u I tipu preosetljivosti.
5. da navedu najčešće alergene (inhalatorne i nutritivne, lekove i venome insekata).
6. da navedu neki primer bolesti posredovane I tipom preosetljivosti.
7. šta su to provokacioni testovi, kožne probe rane preosetljivosti, i umeju da navedu primere.
8. principe lečenja bolesti nastalih po I tipu preosetljivosti.
9. da kliničke manifestacije II, III i IV tipa zavise od izotipa antitela i tipova ćelija koji u njima učestvuju kao i od mesta na kome se događaju.
10. mehanizme oštećenja tkiva u II, III i IV tipu preosetljivosti.
11. da navedu nekoliko primera bolesti posredovanih II, III i IV tipom preosetljivosti i principe njihovog lečenja.

Pitanja za ulazne testove

1. Rana preosetljivost – I tip preosetljivosti (patogenetski mehanizmi i medijatori koji dovode do oštećenja).
2. Rana preosetljivost – I tip preosetljivosti (klinički sindromi i principi terapije).
3. Bolesti izazvane antitelima – II tip preosetljivosti (mehanizmi oštećenja, primeri bolesti, principi terapije).
4. Bolesti izazvane imunskim kompleksima – III tip preosetljivosti (mehanizmi oštećenja, primeri bolesti, principi terapije).
5. Bolesti izazvane T-limfocitima – IV tip preosetljivosti (mehanizmi oštećenja, primeri bolesti, principi terapije).

METODE EVALUACIJE IMUNSKOG SISTEMA

Evaluacija imunskog sistema pacijenta

Anamneza
Klinički pregled
Ostala ispitivanja
Određivanje broja ćelija
Protočna citofluorimetrija
Izdvajanje mononuklearnih ćelija periferne krvi izopikničkim centrifugiranjem
Funkcionalna ispitivanja *in vitro*
Procena imunskog odgovora *in vivo*

Između funkcionalnog imunskog odgovora i zdravlja često se postavlja znak jednakosti. Veliki broj pacijenata se žali lekarima na „pad imuniteta“, za koji često smatraju da je uzrok njihovim tegobama a koje se manifestuju na vrlo različite načine - od velikog broja prehlada do gubitka energije. Od lekara često traže da im se „ispita imunitet“. **Za sada ne postoji definisani skup postupaka kojima se u primarnoj zdravstvenoj zaštiti može izaći u susret takvim potrebama pacijenta.** Nekada u takvim slučajevima, može biti opravdano korišćenje pristupa koji je ustanovljen u evaluaciji pacijenata sa urođenim imunodeficijencijama. Ovakva obrada pacijenta zahteva pažljivo **uzimanje anamnestičkih podataka, detaljan fizički pregled kao i parakliničko ispitivanje.**

Anamneza

Pri uzimanju anamnestičkih podataka posebnu pažnju treba obratiti na **broj infekcija, njihovo trajanje i izazivače.** Naročito treba obratiti pažnju na neuobičajene infektivne agense i to neočekivane za uzrast, sredinu ili lokalizaciju. Treba voditi računa i o trajanju bolesti i registrovati infekcije koje traju neobično dugo. U slučaju rekurentnih infekcija istim mikroorganizmom treba proveriti da li se možda radi o sojevima koji su rezistentni na primenjenu terapiju. Važno je i tragati za epidemiološkim karakteristikama infekcija odnosno odrediti postupke koji bi doveli do prekida lanaca prenošenja infekcije. Korisne informacije se mogu dobiti i uvidom u dotadašnju terapiju pri čemu ne smeju promaći infekcije koje zahtevaju dugotrajnu terapiju, parenteralnu primenu ili neuobičajeno visoke doze lekova. Pri uzimanju anamneze potrebno je obratiti pažnju i na bolesti koje mogu da budu udružene sa povećanom sklonošću ka infekcijama kao što je dijabetes melitus. Na kraju, potrebno je u **porodičnoj anamnezi tražiti podatke o imunodeficijencijama ili bolestima koje su udružene sa njima.**

Klinički pregled

Kliničkim pregledom se mogu otkriti neki od poremećaja u rastu i razvoju koji ukazuju na postojanje nekih naslednih činilaca udruženih sa poremećajima imunskog odgovora. Međutim, to nije tako često jer su urođene imunodeficijencije retke. **Uhranjenost pacijenata** je važna jer **proteinsko-kalorijska malnutricija** može da dovede do kvalitativnih i kvantitativnih promena imunskog odgovora. Sa druge strane, i **gojaznost** može da bude udružena sa većom sklonošću ka infekcijama. Pregledom kože i vidljivih sluznica mogu se ustanoviti znaci postojanja infekcije, steći uvid u higijenske navike i videti ožiljci koji mogu da ukažu na stil života i da budu relevantni za izloženost ali i odbranu od infekcija. Preterano **izlaganje kože suncu** često je udruženo sa reaktivacijom pojedinih virusnih infekcija. Ne treba zanemariti ni **psihičko stanje** pacijenta jer depresija, neuroze i izloženost velikom psihičkom stresu mogu da promene način na koji imunski sistem reaguje na patogene.

Ostala ispitivanja

Ostala ispitivanja se ponekad nazivaju **paraklinička** i obuhvataju **snimanje dubokih tkiva i organa** nekim od metoda vizualizacije (ultrazvuk, rentgen, kompjuterizovana tomografija, magnetna rezonancija) kao i laboratorijsku evaluaciju pacijenata.

Metodama vizualizacije moguće je otkriti **aplazije timusa i tonzila**, zatim prisustvo bronhijektazija, infekcije sinusa i drugih telesnih šupljina i organa koje mogu biti udruženi sa poremećajima funkcionisanja imunskog sistema. Moguće je ustanoviti i neke od morfološko-funkcionalnih poremećaja koji su praćeni čestim infekcijama, kao što su na primer vezikoureteralni refluks i poremećaji funkcije sfinktera.

U okviru laboratorijske evaluacije moguće je odrediti broj i fenotipske karakteristike leukocita, odrediti aktivnost imunskog sistema, ispitati funkcionalnost sistema komplementa, vršiti funkcionalna ispitivanja ćelija imunskog sistema i proceniti imunski odgovor kožnim probama i provokacionim testovima. Određivanje broja i fenotipskih karakteristika ćelija imunskog sistema predstavlja važan deo laboratorijske evaluacije pacijenata. Obično započinje određivanjem **leukocitne formule** kojom se određuje apsolutan broj i relativna zastupljenost pojedinih subpopulacija leukocita, dok se krvnim razmazom može odrediti postojanje eventualnog „skretanja u levo“ koje je karakterisano većim brojem nezrelih neutrofila usled infekcije. Pomoću fluorescentno obeleženih antitela moguće je protočnom citofluorimetrijom odrediti apsolutni broj ćelija u subpopulacijama limfocita kao što su T i to CD4⁺ i CD8⁺, B, NK, Treg, NKT, $\gamma\delta$ T, a pomoću **MHC tetramera** (koji se kada su kombinovani sa peptidom vezuju za specifični TCR) i **broj antigen specifičnih T-ćelija**. **Aktivacioni status leukocita** takođe se može određivati protočnom citofluorimetrijom i to merenjem ekspresije aktivacionih markera kao što su CD69, CD25, CD23 i drugi.

Određivanje broja ćelija

Broj ćelija se može odrediti na osnovu morfologije i bojenja posmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom korišćenjem komore za brojanje - hemocitometra.

Za pouzdano određivanje procentualne zastupljenosti pojedinih populacija ćelija (leukocitna formula) koristi se obojen krvni razmaz.

Na osnovu veličine i granuliranosti ćelije broje automatski brojači (merenje rasipanja svetlosti ili imedanse). Pored toga, ćelije se mogu identifikovati na osnovu specifičnih površinskih obeležja (tzv. površinskih markera), na primer:

T-limfociti: CD3, CD4, CD8...

B-limfociti: Ig, CD19, CD20...

NK ćelije: CD16, CD56...

Tehnika koja se za to koristi je protočna citofluorimetrija.

Protočna citofluorimetrija

Pored imunofenotipizacije (opisano ranije) koja ima neizmeran značaj u evaluaciji imunskog sistema, protočna citometrija može da se koristi za određivanje drugih parametara ćelija korišćenjem različitih fluorescentnih obeleživača. Tako se ovom metodom može analizirati ćelijski ciklus na osnovu vezivanja hemijskog jedinjenja kao što je propidijum jodid čija se fluorescencija povećava 20-30 puta nakon vezivanja za DNK (npr. u ispitivanju dejstva antitumorskih lekova). Jedinjenja koja fluoresciraju po vezivanju za reaktivne oblike kiseonika i azota koriste se za detekciju oksidativnog stresa. Na sličan način može se odrediti i unutarćelijski sadržaj Ca²⁺. Respiratorni prasak, promene u ćelijskoj koncentraciji Ca²⁺ i intracelularni pH reflektuju ćelijsku aktivaciju. Protočna citofluorimetrija omogućava i kvantifikaciju apoptoze detekcijom promena u lipidnom sastavu ćelijske membrane (fosfatidil serin prelazi iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj lipidnog dvosloja) i sadržaja DNK ili merenjem depolarizacije mitohondrija (boja koja menja fluorescenciju u zavisnosti od stepena depolarizacije).

Izdvajanje mononuklearnih ćelija periferne krvi izopikničkim centrifugiranjem

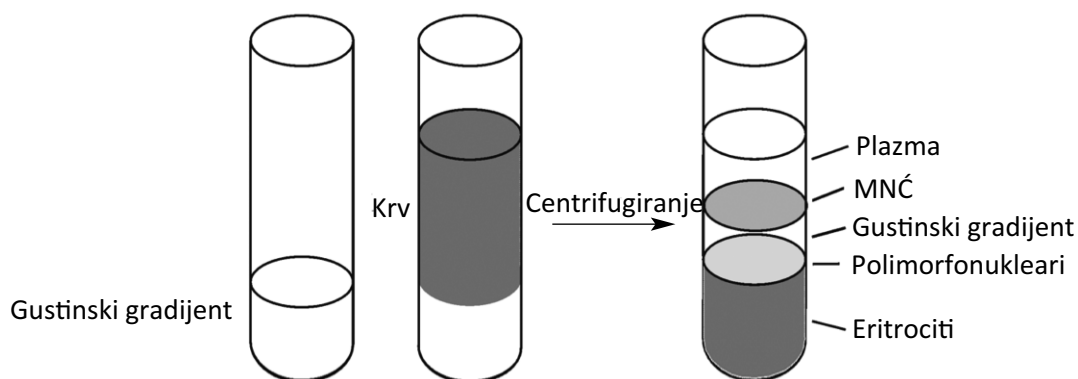
Populacija mononuklearnih ćelija (MNC) krvi obuhvata ćelije sa nesegmentiranim jedrom (monocite, T-limfocite, B-limfocite i NK ćelije) koje obavljaju bitne funkcije u urođenoj (monociti i NK ćelije) i stečenoj imunosti (T- i B-limfociti). Izolovanje čiste populacije MNC iz periferne krvi predstavlja važan postupak u mnogim dijagnostičkim i eksperimentalnim procedurama. Za izdvajanje MNC najčešće se koristi separacioni gustinski gradijent čija specifična gustina odgovara flotacijskoj gustini MNC, tako da u toku centrifugiranja eritrociti i polimorfonuklearni leukociti prolaze kroz njega i talože se, a MNC se zadržavaju u sloju iznad gradijenta (Slika 5).

Funkcionalna ispitivanja *in vitro*

Ćelije urođene imunosti

Ispitivanje funkcije ćelija urođene imunosti *in vitro* podrazumeva ispitivanje funkcionalne sposobnosti fagocita i NK ćelija. Kada su u pitanju fagociti, moguće je meriti sposobnost za hemotaksu, kao i sposobnost da vrše fagocitozu. **Hemotaksa** se ispituje tako što se ćelijama ponudi hemotaktička supstanca i on-

Slika 5. Shematski prikaz razdvajanja elemenata krvi na gradientu gustine



da meri broj ćelija koji je migrirao. Tehnike se zasnivaju na migraciji kroz kanale u gelu u pravcu gradijenta hemotaktičke supstance ili kroz filter u komoru sa hemotaktičkom supstancom. **Adherencija** se određuje brojanjem ćelija koje adherišu na staklo ili neki drugi materijal. **Ingestija** se može detektovati mikroskopiranjem ili protočnom citofluorimetrijom (ukoliko je fagocitima ponuđen fluorescentno obeležen materijal). **Intracelularno ubijanje** mikroorganizama je moguće izmeriti tako što se meri ubijanje bakterija u kulturi. Mnogo češće se koriste testovi koji ovu funkciju fagocita određuju posredno, **merenjem nastanka slobodnih radikala kiseonika i azota** (respiratorni prasak) kolorimetrijskim, hemiluminiscentnim ili fluorescentnim tehnikama.

Kada su u pitanju **NK ćelije**, pored njihovog broja, određuje se i **citotoksična aktivnost** radioaktivnim (merenjem oslobađanja radioaktivnog hroma iz ubijenih ćelija koje su njim obeležene) i neradioaktivnim metodama.

Ćelije stečene imunosti

Ispitivanje funkcije ćelija stečene imunosti *in vitro* podrazumeva **ispitivanje proliferativnog kapaciteta** T- i B-ćelija nakon stimulacije mitogenima (molekulima koji indukuju aktivaciju i deobu ćelija), superantigenima i antigenima a može se određivati radioaktivnim i neradioaktivnim kolorimetrijskim i fluorescentnim metodama.

Citotoksični test CD8⁺ T-ćelija se retko primenjuje i rezervisan je za ispitivanje postvakcinalnog citotoksičnog odgovora i za razliku od citotoksičnog testa sa NK ćelijama zahteva postojanje MHC kompatibilne mete.

Produkcija citokina se meri u tečnim uzorcima kao što je serum ili supernatant stimulisanih ćelija **ELISA** metodom, dok se do broja ćelija koje proizvode citokin dolazi **ELISPOT** metodom ili intracelularnim fluorescentnim bojenjem nakon koga se ćelije analiziraju protočnom citofluorimetrijom.

Merenje funkcije B-limfocita podrazumeva određivanje klasa i potklasa antitela nefelometrijom ili radijalnom imunodifuzijom. **Nivo izohemaglutinina** (antitela usmerena na antigene krvne grupe) u serumu je jedan od testova koji se koristi za funkcionalno ispitivanje B-limfocita. **Titar i aviditet** antitela nakon imunizacije, određuju se u serumu, i mogu se ispitivati nakon vakcinacije ili imunizacije sa KLH (engl. *keyhole limpet hemocyanin*, antigen puža pilepka, koristi se kao neoantigen, jer se organizam s njim ranije nije susreo).

Procena imunskog odgovora *in vivo*

Procena imunskog odgovora *in vivo* se najčešće vrši kožnim probama i provokativnim testovima. Od **kožnih proba rane preosetljivosti** najčešće se koriste „prik“ i intradermalni testovi. Ovakvim testiranjem se može utvrditi postojanje alergije koja često može da bude razlog tegoba kod pacijenata.

Kožne probe kasne preosetljivosti se koriste za ispitivanje celularne imunosti a u našoj sredini se koristi najčešće PPD ili tuberkulinska proba. U zemljama gde se ne sprovodi BCG vakcinacija za procenu celularne imunosti se koriste „recall“ (antigeni sa kojima je osoba sigurno prethodno bila u kontaktu, npr. prečišćeni proteinski derivat tuberkulina, kandidin, trihofitin itd.) antigeni i KLH.

Provokativni testovi se koriste za utvrđivanje postojanja imunskog odgovora i to najčešće na inhalatorne (spirometrijom) i nutritivne (engl. *DBPCFC, Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge*) alergene. U

inhalatornim testovima, pacijent udiše alergene u aerosolu. Procena odgovora na alergene vrši se spirometrijskim merenjem protoka vazduha i poređenjem dobijenih vrednosti pre i nakon inhalacije alergena. Nespecifična hiperreaktivnost bronhija (npr. u astmi) vrši se inhalatornim testom sa metaholinom. U testovima za utvrđivanje osetljivosti na nutritivne alergene, pacijent dobija alergen ili placebo u kapsuli. Pri testiranju, ni pacijent ni lekar ne znaju da li pacijent unosi kapsulu koja sadrži potencijalni alergen ili placebo. U toku jednog dana se može testirati preosetljivost na alergene prisutne u samo jednoj namirnici ili placebo.

Spoj odgovarajuće parove

- | | |
|--|--|
| 1. Izdvajanje ćelija iz krvi vrši se na osnovu | a. ispituje funkcija CD4 ⁺ T-limfocita |
| 2. Površinski markeri T-limfocita su | b. ELISA testom |
| 3. Površinski markeri B-limfocita su | c. kod obolelih od hronične granulomatozne bolesti |
| 4. Površinski markeri NK ćelija su | d. citotoksičnim testom |
| 5. Ubilačka aktivnost NK ćelija se određuje | e. razlike u gustini i površinskim markerima |
| 6. Respiratorni prasak fagocita je smanjen | f. CD3 i CD4 ili CD8 |
| 7. Merenjem produkcije citokina se | g. membranski imunoglobulini, CD19, CD20 |
| 8. Nivo produkcije citokina se meri | h. progresiju HIV infekcije |
| 9. Pad broja CD4 ⁺ T-limfocita ukazuje na | i. stimulacijom sa T-ćelijskim mitogenima |
| 10. Proliferacija T-limfocita se ispituje | j. CD16 i CD56 |

1. ____ 2. ____ 3. ____ 4. ____ 5. ____ 6. ____ 7. ____ 8. ____ 9. ____ 10. ____

LABORATORIJSKE PROCEDURE ZA DIJAGNOSTIKU IMUNSKI POSREDOVANIH BOLESTI I PRIMARNIH IMUNODEFICIJENCIJA**Alergije****Imunski posredovane hemolitičke bolesti****Reumatoidni artritis****Autoimunske bolesti tiroidne žlezde****Dijabetes melitus****Multipla skleroza****Primarne imunodeficijencije**

Za detalje izvođenja ovih procedura pogledati opis u poglavlju o antigen-antitelo reakcijama.

Alergije

Alergije predstavljaju široko rasprostranjeni zdravstveni problem u svetu. Procenjuje se da oko 25% svetske populacije ima neku vrstu alergije. Kliničke manifestacije, koje su posledica oslobađanja prethodno formiranih i nososintetisanih medijatora iz mastocita i bazofila, variraju od lokalizovane reakcije na koži (npr. koprivnjača ili ekcem) pa sve do generalizovane sistemske reakcije – anafilaksije. Simptomi zavise od puta unosa, doze kao i učestalosti izlaganju alergenima. Ukoliko se alergen inhalira, najverovatnije će se razviti simptomi kao kod alergijskog rinitisa ili astme. Ingestija (gutanje) alergena dovešće do gastrointestinalnih simptoma (proliv, bol, mučnina) dok ubrizgavanje alergena u krvotok može dovesti do sistemske reakcije. Najčešće kliničke manifestacije koje obuhvata preosetljivost I tipa su: koprivnjača, ekcem, alergijski rinitis, konjunktivitis i astma. Anafilaksija je najteži oblik alergijske reakcije jer nastaje akutno (sekunde, minuti) i istovremeno zahvata nekoliko organa.

Metode za dijagnostiku alergijskih bolesti se mogu podeliti na *in vitro* i *in vivo* testove.

In vitro testovi uključuju merenje ukupne količine IgE ili određivanje IgE specifičnih za određeni antigen (alergen). Ova metode su manje senzitivne od *in vivo* testova o kojima će kasnije biti reči. Merenje ukupne količine IgE predstavlja odličan „skrining“ test pre nego što se pacijent sa simptomima alergije uputi specijalisti alergologije. Ovaj test takođe pomaže lekaru kliničaru pri postavljanju dijagnoze parazitskih infekcija i hiper-IgE sindroma. Najčešće se **ukupna količina IgE meri u serumu metodom nefelometrije, dok se IgE specifični za određeni antigen određuju ImmunoCAP i, do nedavno, RAST testom**. Ovi testovi su bezbedni i veoma komforni za pacijenta. *In vivo* testiranje uključuje direktno nanošenje alergena na ili pod kožu i predstavlja najjeftiniju i najspecifičniju vrstu testa. Najčešće se vrše **kožne probe** (tzv. prick ili prick-prick probe) ili intradermalne probe. Iako se na ovaj način može ispitati veliki broj alergena, postoje i neka ograničenja za izvođenje ovih testova: 1) koža na koju se nanosi alergen ne sme biti iritirana; 2) terapija antihistaminicima mora biti obustavljena najmanje 72 časa pre testiranja; 3) postoji opasnost od pojave sistemske reakcije; 4) ne preporučuje se izvođenje ovih testova kod dece koja su mlađa od 3 godine.

Imunski posredovane hemolitičke bolesti

U imunski posredovanim hemolitičkim bolestima glavni reaktanti su imunglobulini klase G i M. Oni se vezuju za sopstvene izmenjene ili strane antigene koje se nalaze na površini ćelija. Ova antitela oblažu površinu ćelije i potpomažu fagocitozu posredstvom opsonizacije i aktivacijom kaskade komplementa.

Transfuzijske reakcije su tipičan primer ubijanja ćelija, koji nastaje kao rezultat vezivanja antitela za strane bezopasne antigene (heteroantigene) i javljaju se tokom transfuzije nekompatibilne (nepodudarne) krvi. Do danas je identifikovano tridesetak različitih sistema krvnih grupa koje broje više od 700 različitih antigena prisutnih na površini ljudskih eritrocita. Neki od tih antigena jako stimulišu stvaranje antitela i odgovorni su za pojavu transfuzijskih reakcija. Antitela mogu biti prisutna u cirkulaciji bez prethodnog kontakta sa eritrocitima koji nose strane antigene i takva antitela se zovu prirodna (izohemaglutinini npr. A i B antigeni ABO sistema krvnih grupa). Druga antitela se stvaraju tek nakon kontakta sa eritrocitima neodgovarajućeg davaoca (npr. anti Rh-D antitela). Najpoznatiji sistemi krvnih grupa: ABO, Rh, Kell, Duffy i Kidd.

ABO sistem krvnih grupa ima ključnu ulogu prilikom transfuzije krvi. Osobe A krvne grupe imaju anti-B antitela dok osobe B krvne grupe imaju anti-A antitela u serumu. Osobe 0 krvne grupe imaju anti-A antitela i anti-B antitela jer njihovi eritrociti ne poseduju na svojoj površini antigene A i B. Antitela koja se stvaraju su klase IgM mada mogu biti IgG klase. Ukoliko pacijent primi krv neodgovarajuće krvne grupe nastaje reakcija koja se može manifestovati u vidu neznatnog smanjenja broja eritrocita pa sve do akutne (nagle) masivne hemolize unutar krvnih sudova. Akutna hemolitička reakcija može se razviti unutar nekoliko minuta do nekoliko sati nakon transfuzije krvi. Reakcije koje se javljaju veoma brzo najčešće su povezane sa davanjem krvi koja je nekompatibilna u okviru ABO sistema krvnih grupa. Jačina reakcije zavisi od nekoliko faktora kao što su: klasa antitela, temperatura na kojoj se vezuju antitela za antigen, količine primljene krvi, gustine antigena na eritrocitima, koncentracije antitela u plazmi i stepena aktivacije komplementa. Pacijent može imati simptome kao što su groznica, povišena telesna temperatura, mučnina, bolove i u donjem delu leđa, ubrzan rad srca i šok.

Transfuzijske reakcije su relativno retke jer se danas određivanje antigena ABO i Rh sistema krvnih grupa na eritrocitima vrši rutinski metodom imunoaglutinacije. Prisustvo antieritrocitnih antitela u krvi pacijenata takođe se rutinski određuje pre transfuzije imunoaglutinacijom (interreakcija).

Hemolitička bolest novorođenčeta se javlja kod novorođenčadi čije su majke bile prethodno u kontaktu sa eritrocitima koji na svojoj površini imaju antigene različite od sopstvenih. Do kontakta između krvi majke i bebe dolazi tek tokom porođaja. Prvo dete obično ne razvija bolest dok u kasnijim trudnoćama memorijski B-limfociti majke počinju da sintetišu IgG koji prolaze feto-placentalnu barijeru i uništavaju fetalne eritrocite. U zavisnosti od količine antitela koju stvori majka u trudnoći može doći do prevremenog rođenja ili uginuća ploda. Težak oblik ove bolesti naziva se *erythroblastosis fetalis* i manifestuje se žuticom i teškom hemolitičkom anemijom. Antigen D, koji pripada Rh sistemu krvnih grupa, je u velikom broju slučajeva odgovoran za pojavu hemolitičke bolesti. Antitela specifična za ABO antigene su mnogo češće prisutna u krvi majke i većinom su IgM. Ova antitela ne prolaze kroz placentu i zbog toga su kliničke manifestacije bolesti mnogo blaže. **Prisustvo anti-Rh(D) antitela kod majke se može ustanoviti indirektnim Kumbsovim testom.**

Imunske hemolizne anemije uzrokovane lekovima bile su uobičajene u slučajevima primene visokih doza penicilina i u periodu kada je alfa metildopa široko korišćena u lečenju hipertenzije. Međutim, u današnje vreme ovaj tip hemoliznih anemija relativno je redak u kliničkoj praksi. Lekovi koji mogu izazvati imunske hemolizne anemije podeljeni su, prema mehanizmima delovanja, u tri grupe: 1. alfa metildopa tip (lek menja strukturu proteina Rh kompleksa na membrani eritrocita koji tako postaje imunogen, antitela koja se formiraju unakrsno reaguju i sa normalnim Rh proteinima, uvek su nekog od IgG izotipa, a hemoliza se dešava i posle prekida uzimanja leka); 2. penicilinski tip (lek se kao haptent čvrsto vezuje za glikoprotein na membrani eritrocita, antitela koja se formiraju su IgG i ne vezuju komplement, hemoliza se ispoljava samo u prisustvu leka i obično nije teška); i 3. kinidinski tip (lek se kao haptent slabo vezuje za proteine na membrani eritrocita, antitela su često IgM tipa i vezuju komplement, hemoliza se ispoljava samo u prisustvu leka ali može biti izuzetno teška, ponekad sa svim znacima intravaskularne hemolize). Prestanak primene leka uglavnom je sve što je potrebno primeniti u ovom tipu imunih hemoliznih anemija. **U dijagnostici koristi se direktan Kumbsov test.**

Autoimunska hemolitička anemija predstavlja još jedan primer bolesti u čijoj osnovi je reakcija preosetljivosti II tipa. Simptomi ove bolesti su malaksalost, slabost i ponekad slaba žutica. Pacijenti razvijaju antitela usmerena prema sopstvenim antigenima koji se nalaze na eritrocitima. Ova antitela se mogu podeliti u dve grupe: topla (topli aglutinini), koja se vezuju na 37°C, i hladna koja reaguju na temperaturi ispod 30°C.

Autoimunske hemolizne anemije uzrokovane **toplim aglutininima**, obuhvataju više od 70% autoimunskih anemija, i karakterišu se formiranjem IgG antitela koje vezuju za eritrocitne antigene na 37°C.

Pacijenti ispoljavaju simptome anemije jer se antigen-antitelo kompleksi uklanjaju u makrofagno-fagocitnom sistemu slezine i jetre. Hemoliza se prvenstveno odvija van krvnog suda (ekstravaskularno) jer IgG nisu tako efikasni u aktivaciji komplementa kao IgM.

Hladni aglutinini su znatno ređe uzrok imunskih hemoliznih anemija i češće se javljaju kod osoba u pedesetim i šezdesetim godinama.

Smatra se da se javljaju posle preležanih infekcija kao npr. posle infektivne mononukleoze ili pneumonije izazvane *Mycoplasma pneumoniae*. Često se može javiti u sklopu drugih oboljenja kao npr. hronične limfocitne leukemije, ne-Hoćkinovog limfoma ili sistemskog eritemskog lupusa. Kod dece, ova antitela se javljaju u sklopu virusnih i respiratornih infekcija.

Ova antitela su IgM klase i pacijenti najčešće ne ispoljavaju kliničke simptome. Simptomi se javljaju tek ukoliko se pacijent izloži hladnoći odnosno ukoliko temperatura periferne cirkulacije padne ispod 30°C. Iako aktivacija komplementa može započeti izlaganjem hladnoći, ona se može nastaviti i nakon utopljanja.

Ukoliko se aktivira kompletna kaskada komplementa javiće se hemoliza unutar krvnog suda (intravaskularna hemoliza). Eritrociti koji su obloženi sa C3b fragmentom vezuju se za receptore na makrofagima i dalje razaraju u jetri, čime se njihov broj dodatno smanjuje. Jednu od teških komplikacija predstavlja nekroza perifernih tkiva.

U dijagnostici hemoliznih anemija primena direktnog i indirektnog Kumbsovog testa ima značajnu ulogu.

Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je još jedan primer sistemske autoimunske bolesti od koje boluje oko 1% populacije u razvijenim zapadnim zemljama. Žene imaju tri puta veću verovatnoću da dobiju RA od muškaraca. Bolest se najčešće javlja između 35-50. godine života. Karakterišu je hronične, simetrične i erozivne promene na perifernim zglobovima mada promene mogu zahvatiti i organe kao što su srce i pluća.

Laboratorijska dijagnostika RA je dosta složena. U serumu 75% pacijenata koji boluju od RA prisutan je **reumatoidni faktor (RF)**. RF predstavlja antitelo IgM klase specifično za Fc fragment IgG (autoantitelo specifično za IgG). RF gradi imunske komplekse sa IgG koji se nošeni krvlju talože u zglobovima. C1 komponenta komplementa se vezuje za imunske IgM-IgG komplekse i pokreće klasični put aktivacije. **Za određivanje RF u serumu ili sinovijalnoj tečnosti koristi se imunoaglutinacija, ELISA, nefelometrija ili RID test.**

U novije vreme uveden je mnogo specifičniji test za RA tj. ELISA test kojim se određuju antitela specifična za ciklični citrulinisani peptid (**anti-CCP**). Ovaj test je od izuzetnog značaja u dijagnostici kod pacijenata koji nemaju pozitivan RF. Jedan od testova koji je od najveće pomoći za praćenje toka bolesti je merenje koncentracije **CRP** metodom nefelometrije. Ovaj nespecifični pokazatelj zapaljenja koreliše sa povećanim stvaranjem proinflamatornih citokina kao i sa aktivnošću bolesti.

Autoimunske bolesti tiroidne žlezde

Autoimunske bolesti koje zahvataju tiroidnu žlezdu su redak primer na kome se može pokazati da autoantitela, specifična za jedan isti organ, mogu na različite načine ometati funkciju žlezde a samim tim i dovesti do različite kliničke slike. Pod normalnim uslovima, hipotalamus stvara tirotropni otpuštajući hormon koji stimuliše hipofizu da luči tirostimulišući hormon (TSH). TSH se vezuje za svoj receptor na membrani tirocita koji oslobađaju tiroglobulin koji se kasnije cepa na trijodtironin (T3) i tiroksin (T4). Stvaranje autoantitela onemogućava ovaj proces i dovodi do smanjene odnosno povećane aktivnosti tiroidne žlezde. **Ovi hormoni se određuju ELISA ili RIA metodom.**

Hašimoto tiroiditis je hronično autoimunske zapaljenje tiroidne žlezde koje se može javiti u bilo kom životnom dobu i to 5 do 10 puta češće kod žena nego kod muškaraca.

Kod pacijenta se javlja uvećana tiroidna žlezda (gušavost) praćena hipotirozom uz pojavu autoantitela, predominantno antitiroglobulinska antitela (anti-TG) kao i antitela specifična za tiroidnu peroksidazu (anti-TPO antitela). **Ova antitela se mogu dokazati ELISA metodom ili indirektnom imunofluorescencijom.**

Grejvsovu bolest, suprotno od Hašimoto tiroiditisa, karakteriše hipertiroza. Najvažnija antitela koja se mogu detektovati u Grejvsovoj bolesti su: autoantitelo specifično za receptor tirostimulišućeg hormona (anti-TSHR antitelo) i anti-TPO antitela. Kada se anti-TSHR antitelo zakači za receptor tirostimulišućeg hormona on imitira normalno dejstvo TSH i dovodi do prekomernog oslobađanja tiroidnih hormona. **Za dokazivanje ovih antitela se može koristiti ELISA metod ili indirektna imunofluorescencija.**

Dijabetes melitus tip I

Autoimunske dijabetes (dijabetes melitus tip I) je hronična autoimunska zapaljenska bolest koja se javlja kod osoba sa genetskom predispozicijom pod dejstvom faktora sredine. Kod ove bolesti javlja se progresivno zapaljenje Langerhansovih ostrvaca u pankreasu koje dovodi do fibroze i uništenja većine β -ćelija. Autoantitela se mogu pojaviti u serumu i do nekoliko godina pre pojave bolesti. Iako se dijabetes najčešće dijagnostikuje merenjem glukoze u krvi, serološki testovi su se pokazali veoma korisnim za „skrining“ predijabetičnih stanja pre nego što je uopšte došlo do oštećenja tkiva pankreasa. **Nekada su se autoantitela specifična za antigene ostrvaca detektovala indirektnom imunofluorescencijom na smrznutim presecima humanog pankreasa. Danas je ova metoda zamenjena RIA i EIA metodom. Antitela koja se danas koriste u dijagnostici autoimuskog dijabetes su anti-GAD (glutamat dekarboksilaza) antitela i anti-IA2 (tirozin fosfataza) antitela.**

Multipla skleroza

Multipla skleroza (MS) je autoimunska zapaljenska demijelinizirajuća bolest centralnog nervnog sistema od koje boluje oko milion ljudi širom sveta. Karakteriše je formiranje lezija (plakovi) u beloju masi mozga i kičmene moždine koje dovode do progresivne destrukcije mijelinskog omotača aksona. Oštećenje ćelija centralnog nervnog sistema može da izazove poremećaje vida, slabost i paralizu ekstremiteta, vrtoglavice kao i brojne poremećaje senzibiliteta. Bolest se često javlja između 20 i 40. godine života i to dva puta češće kod žena nego kod muškaraca.

U dijagnostici MS-a vrši se pregled likvora i detekcija intratekalne sinteze IgG metodom izoelektričnog fokusiranja likvora i seruma sa imunofiksacijom (oligoklonalne trake).

Primarne imuodefijencije

Komponente imunskog sistema imaju važnu ulogu u odbrani domaćina od patogena. Poremećaji u samo jednoj komponenti imunskog sistema može imati za posledicu široki spektar efekata kako na celularnu tako i na humoralnu imunost. Primarne imunodefijencije spadaju u retke bolesti gde izuzetak predstavlja IgA defijencija. Incidencija ovih bolesti je 2 na 10.000 živorođene dece. Uprkos tome što su ovo retke bolesti, veoma je važno prepoznati ova oboljenja kod dece sa ponavljanim epizodama teških infekcija i blagovremenim lečenjem sprečiti teške posledice. Do sada je identifikovano preko 120 različitih kongenitalnih formi imunodefijencija koje obuhvataju defekte limfocita, fagocita i komponenti komplementa. Klinički simptomi mogu varirati od blagih do teških koje ugrožavaju život pacijenta. Veoma često autoimunske bolesti javljaju se udruženo sa primarnim imunodefijencijama.

Brutonova agamaglobulinemija je recesivna bolest vezana za X hromozom od koje gotovo isključivo obolevaju muškarci. U krvi ovih pacijenata nedostaju zreli CD19⁺ B-limfociti a samim tim i sve klase imunoglobulina. Zbog nedostatka B-limfocita, oni imaju male tonzile i limfne čvorove bez normalnih germinativnih centara. Broj i funkcija T-limfocita je relativno očuvana. Ovi pacijenti imaju teške infekcije pluća i sinusa izazvane inkapsuliranim bakterijama (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) još u periodu odojčeta nakon gubitka majčinskih antitela koja su prošla kroz placentu. **Ovi pacijenti ne smeju primati žive atenuisane vakcine.**

U dijagnostici Brutonove agamaglobulinemije koristi se nefelometrija za ukupno određivanje IgG, IgA i IgM. Izohemaglutinini (antitela specifična za antigene krvnih grupa) se normalno detektuju nakon druge godine života ali kod pacijenata sa ovom bolešću su odsutna. Rutinski test imunoaglutancije koji se izvodi pomoću eritrocita poznate krvne grupe je uvek negativan kod ovih pacijenata. Kao konačni test za potvrdu koristi se imunofenotipizacija leukocita periferne krvi, pri čemu se periferna krv inkubira sa fluorescentno obeleženim anti-CD19 antitelom i analizira protočnom citofluorimetrijom.

Di Džordžov sindrom obuhvata čitav spektar anomalija koji uključuje poremećaje u razvoju timusa, srca, kostiju i centralnog nervnog sistema. Ova deca imaju česte i teške virusne i gljivične infekcije zbog nedostatka T-limfocita. **Od imunoloških testova koristi se imunofenotipizacija leukocita periferne krvi, pri čemu se periferna krv inkubira sa fluorescentno obeleženim anti-CD3 antitelom i analizira protočnom citofluorimetrijom.**

Hronična granulomatozna bolest je X-vezana recesivna imunodefijencija koja nastaje kao posledica poremećaja u aktivaciji oksidativnog metabolizma fagocita i odsustvom stvaranja kiseoničnih produkata. U nizu reakcija koje katalizuje NADPH oksidaza fagocita od molekula kiseonika nastaje superoksid, a zatim vodonik-peroksid, hipohloritna kiselina i hidroksilni radikal koji su toksični za fagocitovane mikroorganizme. U kliničkoj slici dominiraju kožne infekcije, gnojno zapaljenje limfnih čvorova, apscesi unutrašnjih organa i respiratorne infekcije. Najčešći uzročnici infekcija kod ovih bolesnika su katalaza pozitivne bakterije (rodovi *Staphylococcus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*) ili gljivice iz roda *Aspergillus*. Bolest je dobila naziv zbog pojave granuloma u organima, kojim organizam pokušava da ograniči dalje širenje infekcije. **Dijagnoza se može postaviti pomoću dva testa: nitroblutetrazolijum testom (NBT) i testom oksidacije dihidrorodamina (DHR). NBT je jednostavna semikvantitativna metoda. U prisustvu reaktivnih oblika kiseonika, koji se stvaraju u aktiviranim neutrofilima, NBT prelazi u jedinjenje plave boje (formazan). Formazan se u uočava na preparatu neutrofila kao sitne plave granule. DHR test se bazira na principu oksidacije nefluorescentnog dihidrorodamina u fluorescentni rodamin u prisustvu vodonik-peroksida koji nastaje tokom oksidativnog praska. Fluorescencija rodamina se detektuje protočnom citofluorimetrijom.**

Predavanje: Principi inhibicije imunskog odgovora. Imunosupresivni lekovi. Monoklonska antitela i njihova primena u medicini.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. načine inhibiranja imunskog odgovora.
2. klasičnu medikamentoznu imunosupresivnu terapiju i lekove koji se koriste.
3. šta su intravenski imunoglobulini, kako deluju i u kojim bolestima se koriste.
4. principe biološke terapije.
5. šta su monoklonska antitela, kako se dobijaju i njihovu primenu u medicini.
6. principe antigen-specifične imunoterapije i načine njenog izvođenja.

Seminar: Imunološka tolerancija: značaj i mehanizmi. Centralna i periferna tolerancija T i B-limfocita. Autoimunost: principi i patogeneza. Uticaj genetskih faktora, infekcije i drugih faktora sredine na razvoj autoimunskih bolesti.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. da definišu imunološku toleranciju i razumeju njen značaj.
2. koji su mehanizmi centralne i periferne tolerancije T i B-limfocita.
3. kako dolazi do prekida tolerancije na sopstvene molekule i nastanka autoimunosti i kakva je uloga genetskih faktora, infekcija i drugih faktora sredine na razvoj autoimunskih bolesti.
4. podelu autoimunskih bolesti.

Pitanja za ulazne testove

1. Objasnite mehanizme centralne tolerancije kod T-limfocita.
2. Objasnite mehanizme periferne tolerancije kod T-limfocita.
3. Objasnite mehanizme centralne i periferne tolerancije kod B-limfocita.
4. Na koji način genetski faktori i infekcija doprinose nastanku autoimunskih bolesti?
5. Objasnite šta su to monoklonska antitela i kakva je njihova primena u medicini (primer)?

Lekovi za supresiju imunskog odgovora

Klasična medikamentozna imunosupresivna terapija

Kortikosteroidi

Inhibitori sinteze nukleotida i alkilišući agensi

Inhibitori IL-2

Antiinflamatorni lekovi

Intravenski imunoglobulini**Biološka terapija**

Rekombinantni proteini

Monoklonska antitela

Agensi koji vrše neutralizaciju proinflamatornih citokina i njihovih receptora

Genska terapija

Antigen-specifična imunoterapija

Adekvatan imunski odgovor značajan je u borbi protiv infekcija, sprečavanju rasta tumora, odstranjivanju mrtvih ćelija i otpočinjanju reparacije tkiva. On je rezultat kako direktnih interakcija među različitim ćelijama imunskog sistema tako i indirektnih, preko učešća ćelijskih produkata kakvi su citokini, hemokini ili faktori rasta.

Terapija bolesti imunskog sistema čini važan deo kliničke imunologije sa značajnim potencijalom za novim otkrićima i danas predstavlja predmet velikog interesovanja u modernim istraživanjima. Iako ne postoji jedinstvena i opšte prihvaćena podela terapeutika koji se primenjuju u lečenju ovih bolesti, u odnosu na krajnji efekat koji se postiže kada je u pitanju funkcija imunskog sistema, oni se mogu grubo klasifikovati u dve osnovne grupe i to imunosupresivne i imunostimulatorne lekove. Naime, određena stanja i bolesti posledica su neadekvatnog imunskog odgovora, kao što je reagovanje na neškodljive antigene (neki tipovi preosetljivosti), na sopstvene antigene (autoimunske bolesti) ili odbacivanje transplantiranog tkiva. U lečenju ovakvih bolesti veliki značaj ima **imunosupresivna terapija** koja dovodi do smanjenja imunskog odgovora i njegovih štetnih efekata. Sa druge strane, pojačavanje imunskog odgovora u slučajevima kao što su borba protiv infekcija i nekih tumora postiže se primenom **imunostimulatorne terapije**.

Ovo poglavlje ima više informativni karakter i osmišljeno je sa ciljem da se studentima prevashodno prikažu osnovne karakteristike imunosupresivnih lekova koji su svoju primenu našli u terapiji odbacivanja transplantiranog tkiva, autoimunskih i zapaljenskih bolesti posredovanih imunskim sistemom, sa osvrtom na najznačajnije agense i predstavnike pojedinih grupa kao i bazične mehanizme njihovog delovanja. (Za više informacija i detalja studenti mogu konsultovati odgovarajući udžbenik iz farmakologije.)

Klasična medikamentozna imunosupresivna terapija**Kortikosteroidi**

Kortikosteroidi (glukokortikoidi i mineralokortikoidi) predstavljaju steroidne hormone nadbubrežne žlezde koji su uključeni u mnogobrojne fiziološke procese u organizmu kao što su metabolizam ugljenih hidrata, katabolizam proteina, regulacija koncentracije jona i vode i odgovor na stres. U kontekstu imunoterapije, zbog svog antiinflamatornog, antialergijskog i imunosupresivnog dejstva veliki značaj imaju **glukokortikoidi**. Najvažniji prirodni glukokortikoid kod čoveka je **kortizol**, a njegovi sintetski derivati koriste se u terapiji velikog broja bolesti. Ovi lekovi mogu ostvariti genomske i negenske efekte na nivou ćelije, pri čemu genomski podrazumevaju translokaciju glukokortikoida vezanih za sopstvene receptore u jedro i kontrolu transkripcije, dok negenomski efekti podrazumevaju uticaj na pojedine signalne puteve i delovanje na ćelijsku membranu. Smatra se da je **antiinflamatorno dejstvo** glukokortikoida prevashodno posledica genomskih efekata koje ostvaruju u ćelijama, pri čemu je krajnji rezultat ovakvog delovanja inhibicija efekata proinflamatornih citokina i njihove produkcije. Glukokortikoidi takođe deluju inhibitory na tkivne makrofage koji pritom gube sposobnost da fagocituju i ubijaju bakterije, kao i da produkuju IL-1, kolagenazu, elastazu i TNF. Ovi lekovi smanjuju i produkciju IL-2 od strane limfocita, a pored toga vrše i stabilizaciju membrane lizozoma čime se otežava oslobađanje destruktivnih enzima u zapaljenjskom procesu.

Antialergijski efekat glukokortikoidi ispoljavaju tako što inhibiraju metabolizam arahidonske kiseline pa samim tim i formiranje njenih metabolita. Imunosupresivno dejstvo postiže se visokim dozama leka, a ogleda se u smanjenju produkcije antitela. Značaj u **kontroli odbacivanja transplantata** ogleda se u smanjenju oslobađanja antigena iz presađenog tkiva, odlaganja revaskularizacije i ometanja B-limfocita u produkciji antitela. Veoma visoke doze glukokortikoida (tzv. pulsne doze, koji se aplikuju 1-5 dana) ometaju normalan transport katjona (Na^+ , Ca^{2+}) kroz ćelijske membrane i dovode do gubitka H^+ jona iz mitohondrija. Ovi efekti su odgovorni za brz odgovor limfocita na pulsnu terapiju.

U zavisnosti od načina upotrebe leka postoje forme za lokalnu, oralnu i parenteralnu primenu. Glukokortikoidi se koriste u lečenju nekih tipova preosetljivosti (astma, alergijski rinitis, serumska bolest, urtikarija, kontaktni dermatitis), autoimunskih bolesti (sistemski eritemski lupus - SLE, reumatoidni artritis - RA), inflamatornih bolesti posredovanih imunskim sistemom (sarkoidoza, inflamatorna bolest creva - odnosno Kronova bolest ili ulcerozni kolitis) kao i u terapiji sprečavanja odbacivanja transplantata. Primena glukokortikoida može da bude udružena sa velikim brojem neželjenih dejstava pri čemu dugotrajna primena dovodi do ozbiljnih poremećaja metabolizma ugljenih hidrata i lipida u organizmu kao i do imunodeficijencije.

Inhibitori sinteze nukleotida i alkilišući agensi

Azatioprin pripada klasi purinskih analoga (aktivna forma je 6-merkaptopurin) i koristi se u imunosupresivnoj terapiji već više od 50 godina. Deluje tako što blokira sintezu purina i kostimulaciju preko CD28 molekula. Primenjuje se u terapiji odbacivanja transplantata, kao i različitim autoimunskim bolestima uključujući RA, pemfigus vulgaris, SLE. U kombinaciji sa kortikosteroidima važan je u terapiji imunski posredovanih bolesti kao što su inflamatorna bolest creva i multipla skleroza (MS).

Mikofenolat mofetil predstavlja važan imunosupresivni lek u transplantacionoj medicini kao manje toksična alternativa azatioprinu. Reverzibilnom inhibicijom enzima inozin-5'-monofosfat dehidrogenaze ovaj lek onemogućava put *de novo* sinteze guanozina neophodnog u rastu T- i B-limfocita i na taj način suprimira njihovu proliferaciju (T- i B-limfociti zavise od ovog biosintetskog puta koji im omogućava adekvatne zalihe guanozina). Primenu je našao i u lečenju autoimunskih bolesti kao što je pemfigus vulgaris, hronična urtikarija, SLE i vaskulitisi.

Metotreksat je lek koji inhibira metabolizam folne kiseline. Kompetitivni je inhibitor dihidrofolat reduktaze koja katalizuje konverziju folne u folinsku kiselinu i time inhibira biosintezu nukleinskih kiselina. Primenjuje se kako u terapiji tumora (dojke, glave i vrata, leukemija i limfoma) tako i u lečenju nekih autoimunskih bolesti (RA, juvenilni dermatomiozitis, SLE, sarkoidoza).

Ciklofosfamid deluje tako što se umeće između niti DNK indukujući apoptozu u ćelijama koje proliferišu. Na taj način suprimira funkciju T- i B-limfocita. Koristi se u lečenju nefritisa u sklopu SLE, RA i ponekad u lečenju MS.

Inhibitori sinteze i dejstva IL-2

Ciklosporin A je lek koji se vezuje za kalcineurin i ometa njegovo funkcionisanje, a najvažniji efekat je posledična inhibicija transkripcije gena za IL-2. Koristi se za lečenje akutnog odbacivanja transplantata, RA, psorijaze i drugih bolesti. **Takrolimus** (FK506) se vezuje za molekul nazvan FKBP1A (engl. *FK506 binding protein 1A*) u kompleks koji ometa funkcionisanje kalcineurina. Koristi se u lečenju akutnog odbacivanja transplantata, inflamatorne bolesti creva, vitiliga i atopijskog dermatitisa (lokalna primena). **Rapamicin** se vezuje za molekul nazvan mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*) i inhibira odgovor na stimulaciju ćelija sa IL-2 i tako blokira aktivaciju T- i B-limfocita. Najznačajniju primenu ima u sprečavanju akutnog odbacivanja transplantata i lečenju autoimunskog limfoproliferativnog sindroma. Kako je mTOR uključen u veliki broj različitih signalnih puteva i predstavlja jedan od glavnih senzora energetske ravnoteže u ćeliji, rapamicin pokazuje niz različitih efekata od kojih su neki iskorišćeni za eksperimentalno lečenje malignih tumora, mišićne distrofije, Alchajmerove bolesti kao i za inhibiciju replikacije HIV-a. Interesantno, u nekim eksperimentima je pokazano da zdrave životinje tretirane rapamicinom žive do 50% duže nego kontrole.

Antiinflamatorni lekovi

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAID) predstavljaju posebnu klasu lekova koja pored antiinflatarnog ima antipiretički (sniženje povišene telesne temperature) i analgetički (smanjenje bola) efekat. Mehanizam dejstva ostvaruju blokiranjem enzima ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze koji su uključeni u metabolizam arahidonske kiseline pa samim tim smanjuju i količinu njenih produkata - leukotrijena, tromboksana i prostaglandina. Primenu su našli u velikom broju bolesti kao što su RA, psorijazni artritis, SLE itd.

Talidomid je lek koji se inicijalno upotrebljavao kao sedativ, a kasnije i u lečenju jutarnje mučnine u trudnoći. Vrlo brzo je povučen iz upotrebe zbog izraženog teratogenog dejstva (malformacija udova i visoka stopa smrtnosti novorođenčadi). Ovakve posledice dovele su do razvoja novih propisa o kontroli razvoja i upotrebe lekova. Antiinflamatorna svojstva talidomida su bazirana na sposobnosti leka da smanji sekreciju TNF i vezivanje leukocita za endotel (usled čega je moguć porast broja leukocita u perifernoj krvi). Upotrebljava se u lečenju Kronove bolesti, sarkoidoze, RA, afti u Behčetovoj bolesti (Behçet) i kao terapija u odbacivanju transplantata. Osim toga koristi se i da bi se sprečila kaheksija u određenim bolestima koje su rezultat prevelikog oslobađanja TNF (tzv. „wasting syndrome“ u HIV infekciji, kaheksija povezana sa tumorima itd.).

Dapson predstavlja antibakterijski lek značajan u lečenju lepre kao i prevenciji pneumonije izazvane *Pneumocystis jirovecii* koja je česta kod pacijenata obolelih od AIDS-a. Pored smanjenja pokretljivosti, adhezivnosti i hemotakse polimorfonukleara, dapson inhibira aktivnost mijeloperoksidaze i na taj način smanjuje zapaljenje u različitim inflamatornim bolestima. Ovaj efekat je iskorišćen za lečenje pojedinih autoimunskih i inflamatornih kožnih bolesti (bulozni pemfigoid i dermatitis herpetiformis-Duhring).

Retinoidi i vitamin D putem odgovarajućih signalnih puteva dovode do smanjenja proliferacije limfocita, indukcije apoptoze, smanjenja Th1 i Th17 odgovora, povećanja Th2 odgovora, inhibicije COX, itd. Retinoidi se primenjuju u terapiji akni i psorijazi, a vitamin D našao je primenu u psorijaznom artritisu, SLE, RA i MS.

Mitoksantron je prevashodno antineoplastični agens koji remeti sintezu i reparaciju DNK molekula delujući na enzim topoizomerazu tip II. Koristi se u terapiji pojedinih tumora i leukemija. Primenjuje se za lečenje pacijenata sa pojedinim formama MS jer je pokazano da smanjuje aktivnost hronično progresivnih formi bolesti (usporava progresiju bolesti).

Hlorokin se koristi u lečenju i prevenciji malarije ali takođe pripada i grupi antireumatskih lekova koji modifikuju bolest (tzv. *disease-modifying antirheumatic drugs*) pri čemu utiče na inhibiciju proliferacije limfocita, inhibiciju fosfolipaze A2, prezentaciju antigena, oslobađanje lizosomalnih enzima i reaktivnih kiseoničnih vrsta od strane makrofaga kao i produkciju IL-1.

Fingolimod je lek koji se vezuje za receptor sfingozin-1-fosfata pri čemu onemogućava izlazak efektor-skih limfocita iz limfnog čvora i najčešće se koristi u terapiji MS.

Intravenski imunoglobulini

Intravenski imunoglobulini (**IVIG**) se dobijaju preradom imunoglobulina plazme velikog broja dobrovoljnih davalaca krvi i sadrže u najvećoj meri polivalentni IgG. Mogu da se koriste za lečenje pacijenata sa različitim formama imunodeficijencije (prevashodno onih sa deficitom imunoglobulina) ali i u lečenju pacijenata sa autoimunskim bolestima. Glavni mehanizmi dejstva IVIG u autoimunskim bolestima su stvaranje imunskih kompleksa sa (auto)antitelima koji angažovanjem FcγRIIB (CD32) molekula na autoreaktivnim B-limfocitima smanjuju produkciju autoantitela, a angažovanjem drugih Fc receptora smanjuju prezentaciju antigena koju vrše antigen-prezentujuće ćelije. IVIG se koristi u lečenju pacijenata sa idiopatskom trombocitopenijskom purpustom, pemfigusom, dermatomiozitisom i određenim demijelizirajućim bolestima, kao što su sindrom Gijan-Bare (Guillan-Barré) i MS. IVIG se koristi i u lečenju toksične epidermalne nekrolize ali u tom slučaju izgleda da najznačajniju ulogu u povoljnom efektu koji IVIG iskazuje kod ovih pacijenata imaju antitela prisutna u krvi donora koja ometaju Fas-FasL interakcije.

Biološka terapija

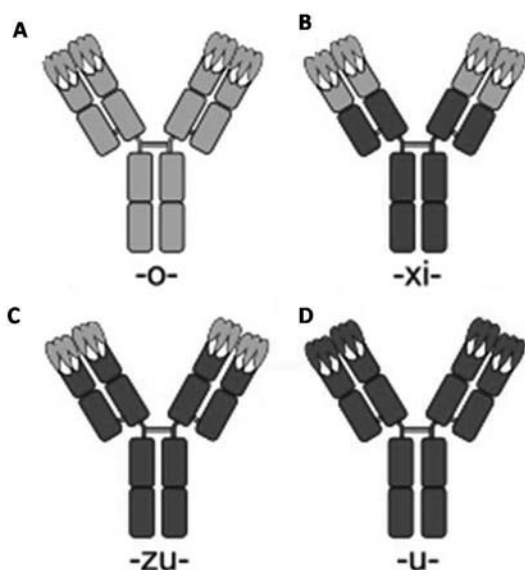
Biološka terapija je poseban vid lečenja pojedinih bolesti koji podrazumeva upotrebu proteinskih i drugih molekula prirodno prisutnih u krvi živih organizama ili pak sintetisanih u laboratorijskim uslovima pomoću tehnika molekularne biologije. Biološkom terapijom može se suprimirati ili stimulisati imunski sistem kao pomoć organizmu u borbi protiv autoimunskih bolesti, tumora, infekcija i drugih bolesti. Biološka terapija uključuje primenu citokina i monoklonskih antitela, a danas je u nekim stanjima kao što su imunodeficijencije u upotrebi i genska terapija.

Rekombinantni proteini**Interferoni (IFN) tip I**

Interferoni predstavljaju grupu signalnih proteina produkovanih od strane ćelija imunskog sistema u odgovoru na prisustvo patogena (virusa, bakterija i parazita) ili maligno transformisanih ćelija. Na osnovu karakteristika receptora preko kojih prenose signale ovi molekuli su podeljeni na tri tipa, pri čemu u pogledu imunosupresije važnu ulogu imaju interferoni tip I, a posebno **IFN- β** . IFN- β predstavlja grupu srodnih molekula od kojih su najvažniji IFN- β -1a, i IFN- β -1b. Tačni mehanizmi njihovog dejstva nisu u potpunosti razjašnjeni ali se smatra da dovode do smanjenja ekspresije MHC molekula II klase, smanjenja produkcije proinflamatornih citokina i nastanka Th17 ćelija, a utiču i na kostimulaciju kroz pojačavanje ekspresije CTLA-4 i smanjenja ekspresije CD28 molekula. Primenjuju se kao lekovi prve linije u terapiji relapsno-remitentnog oblika MS pri čemu je moguće da se deo povoljnog efekta IFN- β u lečenju može pripisati smanjenju propustljivosti krvno-moždane barijere. Za razliku od IFN- β , **IFN- α** se uglavnom primenjuje u lečenju virusnih bolesti (npr. HCV infekcije) zbog snažnog antivirusnog dejstva i stimulacije CTL odgovora, kao i u terapiji malignih tumora (videti stimulacija imunskog odgovora).

Monoklonska antitela**Nomenklatura monoklonskih antitela**

Izuzetan istraživački napor doveo je do identifikacije ćelija i velikog broja molekula uključenih u patogenezu različitih bolesti. Terapija **monoklonskim antitelima** (engl. **monoclonal antibodies - mAb**) podrazumeva upotrebu **laboratorijski sintetisanih** antitela sa **specifičnošću za samo jedan odgovarajući antigen** kojima se deluje na komponente (ćelije i molekule) značajne za razvoj i tok bolesti. Tako se na primer mAb mogu vezivati za površinu maligno transformisane ćelije (koja eksprimira jedinstvene markere za koje je mAb specifično) i pokrenuti njeno uništavanje različitim imunskim mehanizmima. Sa druge strane vezivanje mAb za specifične receptore i aktiviranje odgovarajućih signalnih puteva može direktno dovesti do ćelijske smrti (apoptoze). Tokom razvoja mAb sukcesivno su oformljena četiri tipa koja su se razlikovala po svom poreklu i to: mišja, himerična, humanizovana i humana mAb. **Mišja monoklonska antitela** dobijena su tehnologijom stvaranja hibridoma koja je detaljnije opisana u ranijem poglavlju priručnika (Monoklonska antitela, IV nedelja). Međutim razlika između mišjeg i humanog imunskog sistema onemogućila je dalju kliničku primenu većine antitela, pre svega zbog slabe indukcije citotoksičnosti i formiranja imunskih kompleksa nakon ponovne aplikacije usled stvaranja anti-mišjih antitela od strane pacijenta. Zbog toga su neželjene reakcije bile česte, a ponekad su bile praćene i stanjem šoka. U nomenklaturi mišja antitela dobila su karakteristični sufiks **-omab** (Slika 6). Smanjenje imunogenosti mišjih antitela sa jedne strane i povećanje imunološke efikasnosti sa druge, omogućeno je sintezom himeričnih i humanizovanih antitela. **Himerična monoklonska antitela** sadrže varijabilne regione mišjih antitela fuzionisanih sa konstantnim regionima

**Slika 6. Vrste monoklonskih antitela:**

- A) mišja
- B) himerična
- C) humanizovana
- D) humana

humanih antitela. Ovakva antitela su oko 65% humana što doprinosi smanjenju imunogenosti kao i povećanju njihovog serumskog poluživota. **Humanizovana monoklonska antitela** nastaju ubacivanjem hipervarijabilnih regiona mišjeg antitela u varijabilne domene antitela čoveka. Ova antitela su oko 95% humana. U nomenklaturi himerična i humanizovana antitela imaju sufikse *-ximab* odnosno *-zumab* (infliksimab, baziliksimumab, daklizumab, omalizumab). **Humana monoklonska antitela** dobijaju se transferom humanog genoma u genom miša, nakon čega se ovakvi *transgeni* miševi vakcinišu protiv određenog antigena. Humana monoklonska antitela u nomenklaturi imaju sufiks *-umab* (adalimumab).

Danas su monoklonska antitela našla primenu u lečenju velikog broja bolesti kao što su različite vrste tumora, autoimunske i inflamatorne bolesti posredovane imunskim odgovorom. Još uvek su aktuelna brojna istraživanja sa ciljem identifikacije novih molekula značajnih u razvoju i patogenezi određenih stanja, posebno tumora na koje bi se potencijalno usmerila terapija monoklonskim antitelima. U narednom odeljku pomenućemo samo neke od mAb sa najčešćom terapijskom primenom.

Monoklonska antitela koja vrše depleciju ćelija

Određena monoklonska antitela svoje efekte iskazuju tako što dovode do uništavanja pojedinih tipova ćelija. Takva antitela su npr. anti CD3 koja se sve više koriste umesto konjskog antitimidocitnog globulina ili anti CD20 antitela.

Anti-CD3 monoklonska antitela predstavljaju antitela koja se vezuju za membranski CD3 receptor na površini T-limfocita. Naime, T-limfociti prepoznaju antigene pomoću TCR-a koji za adekvatno funkcionisanje zahteva različite pridružene molekule od kojih je jedan CD3. CD3 sprovodi signal koji omogućava proliferaciju T-limfocita i interakciju sa antigenom. Monoklonska antitela se vezuju za pomenuti kompleks na površini cirkulišućih T-limfocita dovodeći do apoptoze. Zbog ovakvog mehanizma delovanja prvo mišje monoklonsko antitelo odobreno za primenu u kliničke svrhe 1986. godine (**muromonab-CD3**), koristilo se u terapiji akutnog odbacivanja transplantata. Određena monoklonska antitela sa istim mehanizmom dejstva danas se ispituju u lečenju Kronove bolesti, ulceroznog kolitisa i dijabetes melitusa tip 1.

Anti-CD20 monoklonska antitela (Rituximab, Ofatumumab) su usmerena na CD20, koji je u značajnoj meri iskazan na površini većine B-limfocita (uključujući i neke prekursore koji se javljaju tokom diferencijacije B-limfocita) sa izuzetkom diferencijovanih plazma ćelija. Funkcija mu je nedovoljno proučena ali se smatra da može imati ulogu u protoku Ca^{2+} jona kroz ćelijsku membranu čime se održava adekvatna unutarćelijska koncentracija ovih jona, od značaja za aktivaciju B-limfocita. **Rituximab** (himerično mAb), vezujući se za CD20 molekul preko svog Fc fragmenta, učestvuje u ćelijskoj citotoksičnosti posredovanoj antitelima (ADCC) kao i citotoksičnosti posredovanoj sistemom komplemента. Ovo antitelo takođe vrši nishodnu regulaciju B-ćelijskog receptora i indukuje apoptozu CD20⁺ ćelija. Koristi se u terapiji bolesti koje karakteriše povećanje broja B-ćelija ili njihova disfunkcija kao što su limfomi i leukemije. Pogodan je i u terapiji izvesnih autoimunskih bolesti (autoimunska hemolitička anemija, idiopatska trombocitopenijska purpura, RA). **Ofatumumab** je humano monoklonsko antitelo sa istim mehanizmom delovanja.

Monoklonska antitela koja interferiraju sa funkcijom ćelija

Neka monoklonska antitela svoje efekte iskazuju tako što ometaju funkcionisanje pojedinih ćelija. Takva antitela su npr. anti-CD25 ili anti-VLA-4 antitelo.

Anti-CD25 monoklonska antitela (anti-IL-2R α) su usmerena na CD25 molekul koji predstavlja α lanac receptora IL-2, transmembranskog proteina koji ulazi u sastav visoko-afinitetnog receptora za IL-2 na aktiviranim T-limfocitima. Preko ovog receptora se prenose signali neophodni za rast, proliferaciju i diferencijaciju T-limfocita kao i za stimulaciju produkcije antitela od strane B-limfocita. **Baziliksimumab** je monoklonsko antitelo na α lanac receptora IL-2 koje se najčešće upotrebljava u sprečavanju odbacivanja kalema posebno kod transplantacije bubrega. **Daklizumab** kao i prethodni lek, smanjuje opasnost akutnog odbacivanja bubrega bez povećanja incidencije oportunističkih infekcija.

Anti-VLA-4 monoklonsko antitelo (Natalizumab) predstavlja prvi sintetisani lek klase selektivnih inhibitora adhezivnih molekula. Radi se o humanizovanom monoklonskom antitelu na α -4 integrin koje onemogućava izlazak ćelija imunskog sistema iz krvnih sudova do ciljnih organa u kojima se odvija zapaljenjski proces. Konkretno u MS, lezije centralnog nervnog sistema posledica su inflamacije uzrokovane prolaskom T-limfocita kroz krvno-moždanu barijeru. Natalizumab redukuje prolazak T-limfocita i migraciju

leukocita u parenhim mozga. Treba napomenuti da ovo monoklonsko antitelo nije lek prvog izbora u terapiji MS zbog retkog ali izuzetno teškog neželjenog dejstva, progresivne multifokalne leukoencefalopatije. Pored navedenog, ovaj lek se primenjuje i u terapiji hronične inflamacije creva koja uzrokuje Kronovu bolest.

Agensi koji vrše neutralizaciju proinflamatornih citokina i njihovih receptora

TNF inhibitori vrše supresiju odgovora na proinflamatorni citokin TNF koji je deo zapaljenjskog procesa (funkcija detaljnije opisana u poglavlju Citokini). Ovaj citokin ima značaj u brojnim autoimunskim bolestima (RA, ankilozirajući spondilitis, psorijaza) i inflamatornim bolestima posredovanim imunskim sistemom. Štetno dejstvo TNF, odnosno zapaljenja u ovim bolestima neutrališe se terapijom anti-TNF antitelima kao što su **infliksimab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab**. Solubilni receptori za TNF fuzionisani sa Fc fragmentom Ig (npr. **etanercept**) su alternativa u neutralizaciji ovog proinflamatornog citokina.

Anti-IL-1 i anti-IL-6 agensi. Neutralizacija ovih proinflamatornih citokina najčešća je u terapiji autoinflamatornih bolesti i RA različitim agensima kao što je anakinra (rekombinantni IL-1 receptor antagonist) i canakinumab (anti-IL-1 β monoklonsko antitelo). **Tocilizumab** je prvo odobreno antitelo za neutralizaciju IL-6 (vezuje se za interleukin-6 receptor) i koristi se za lečenje RA i optičkog neuritisa.

Anti-IL-12/23 (p40) monoklonska antitelo (Ustekinumab) predstavlja humano monoklonsko antitelo koje prepoznaje p40 molekul, zajedničku komponentu IL-12 i IL-23, čija je uloga da ometa aktivaciju zapaljenjskog odgovora organizma kroz suzbijanje dejstva ovih citokina. Primenjuje se u terapiji psorijaznog artritisa i Kronove bolesti.

Genska terapija

Koncept genske terapije pojavio se sedamdestih godina prošlog veka identifikacijom genetskih defekata odgovornih za pojavu naslednih bolesti. Genska terapija predstavlja novi terapijski pristup i može biti definisana kao tretman bolesti zamenom ili dopunom gena koji je odsutan ili nefunkcionalan, što dovodi do razvoja bolesti. U najvećem broju slučajeva u genom se ubacuje funkcionalna kopija gena da bi se prevazišao štetan efekat nefunkcionalnog gena. Genska terapija se može podeliti na više načina u zavisnosti od ćelijske mete, terapijskog cilja i načina primene (*in vivo* - putem vektora i *ex vivo* - izolovanjem ćelija koje se genetski modifikuju). Genska terapija primenjuje se za lečenje različitih formi teških kombinovanih imunodeficiencija (tzv. *SCID – severe combined immunodeficiency*).

Antigen-specifična imunoterapija

Predstavlja jedan od načina lečenja reakcija na uobičajeno neškodljive antigene kao što su alergije na polen, venome insekata, pojedine namirnice itd. Može se primenjivati kao **subkutana imunoterapija** (engl. *Subcutaneous immunotherapy*, SCIT) koja podrazumeva kontinuiranu, potkožnu primenu rastućih doza određenog alergena (počev od izuzetno niske doze). Po sličnom principu ali mnogo komfornijem za pacijenta razvijena je i **sublingvalna imunoterapija** (engl. *Sublingual immunotherapy*, SLIT) gde se pomoću tablete alergen postepeno oslobađa u usnoj duplji. Mehanizmi dejstva ovako primenjene terapije podrazumevaju promenu konteksta prezentacije antigena uz **nastanak alergen specifičnih Th1 ćelija i Treg kao i povećanje koncentracije IgG4 i IgA, a smanjenje** sekrecije citokina karakterističnih za Th2 imunski odgovor i **koncentracije IgE antitela. Ove promene imunske reaktivnosti na alergene korelišu sa kliničkim poboljšanjem.** Važno je napomenuti da ovaj vid terapije treba sprovoditi u adekvatno opremljenim medicinskim ustanovama zbog mogućnosti pojave neželjenih efekata, odnosno alergijskih reakcija.

Predavanje: Principi stimulacije imunskog sistema.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**
1. načine stimulacije imunskog odgovora.
2. principe imunoterapije malignih bolesti.

Seminar: Imunski odgovor na tumore. Antigeni tumora. Imunski mehanizmi odbacivanja tumora. Izbegavanje imunskog odgovora od strane tumora. Imunološki pristupi u terapiji malignih tumora.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**
1. da postoji imunski nadzor koji uključuje odgovor urođene i stečene imunosti na tumore i da u tome učestvuju celularne i humoralne komponente imunskog odgovora.
2. šta su to tumor-specifični i tumor-asocirani antigeni.
3. na koji način T-limfociti, NK ćelije, antitela i fagociti prepoznaju maligne ćelije i na koji način ih ubijaju.
4. mehanizme kojim tumori izbegavaju imunski odgovor.
5. značaj i mogućnosti imunoterapije tumora i strategije u pravljenju antitumorskih vakcina.

Pitanja za ulazne testove

1. Kako urođena i stečena imunost prepoznaje ćelije malignih tumora i koji su najvažniji tumorski antigeni?
2. Koji mehanizmi imunskog sistema dovode do uništavanja ćelija malignih tumora?
3. Kako tumori izbegavaju imunski odgovor?
4. Pasivna imunoterapija malignih tumora (princip i primeri).
5. Na koji način se može stimulisati imunski odgovor na maligne tumore?

PRINCIPI IMUNOSTIMULACIJE

Stimulacija imunskog odgovora

Imunoterapija tumora

Lečenje malignih bolesti citokinima

Lečenje malignih bolesti monoklonskim antitelima

Lečenje malignih bolesti transferom ćelija

„Klasična“ vakcinacija

Stimulacija imunskog odgovora

Stimulacija imunskog odgovora se vrši kada imunski odgovor ne može dovoljno snažno i pravovremeno da odgovori na pretnju koja narušava homeostazu. Ovo se može postići unošenjem različitih molekula, ćelija i tkiva u organizam.

Imunoterapija tumora

Lečenje malignih bolesti citokinima

Za stimulaciju imunskog odgovora mogu da se koriste i rekombinantni citokini. **IFN- α 2a** se koristi za lečenje pojedinih leukemija a **IFN- α 2b** za lečenje pojedinih leukemija i limfoma, Kaposi sarkoma, multiplog mijeloma i malignog melanoma. **IL-2** se koristi za lečenje metastaza malignog melanoma i karcinoma bubrega. **G-CSF** i **GM-CSF** se koriste da pomognu rekonstituciju imunskog sistema nakon transplantacije kostne srži, i za indukciju granulopoeze nakon hemioterapije. **IFN- γ 1b** se koristi za lečenje hronične granulomatozne bolesti.

Lečenje malignih bolesti monoklonskim antitelima

Monoklonska antitela se sve više koriste za lečenje malignih tumora i leukemija. Monoklonska antitela mogu da budu usmerena protiv molekula koji su prisutni na ćelijama tumora i učestvuju u kontroli rasta ili imunskog odgovor na tumore (Tabela 4). Ova antitela mogu da ometaju funkcionisanje pojedinih molekula na površini ćelija tumora ili imunskog sistema (EGFR ili CTLA4) ili da indukuju lizu ćelija tumora (Rituximab).

Tabela 4: Antitela koja se koriste za lečenje malignih bolesti

Antigen	Antitelo	Klinička primena
VEGF	Bevacizumab	Karcinom jajnika, karcinom bubrega, kolorektalni karcinom, pojedini oblici karcinoma dojke
EGFR	Cetuximab	Skvamozni karcinom glave i vrata, metastatski kolorektalni karcinom
ERBB2 (HER2/neu)	Herceptin	Metastatski Her2 ⁺ karcinom dojke
CD20	Rituximab	Non-Hoćkinov limfom
CD52	Alemtuzumab	Hronična limfocitna leukemija
CTLA4	Ipilimumab	Metastatski melanom

Lečenje malignih bolesti transferom ćelija

Terapija malignih bolesti zasnovana na transferu ćelija se sprovodi već više decenija unazad. Terapija dendritskim ćelijama koje su prethodno kultivisane sa ćelijama tumora dala je rezultate u lečenju malignog melanoma tako što je indukovala odgovor CD8⁺ ćelija specifičnih za antigene tumora (npr. MART-1). Pored dendritskih ćelija i efektorske ćelije mogu da se koriste za lečenje tumora. **NK ćelije** kultivisane sa dodatkom IL-2 i umnožene *in vitro* koriste se u lečenju mijeloidnih leukemija. Poseban uspeh se postiže ukoliko postoje razlike u genima koji kodiraju KIR molekule između primaoca i NK ćelija koje dobija. Preliminarni rezultati ukazuju na efikasnost ovakvih NK ćelija i u lečenju solidnih tumora (npr. melanoma i karcinoma bubrega). Infiltrirajući **T-limfociti** umnoženi *in vitro* su se pokazali efikasni u lečenju malignog melanoma. **Genetski modifikovani T-limfociti** koji pored endogenog TCR iskazuju i transgene receptore specifične za MART-1 peptide u sklopu HLAA*0201 su pokazali efikasnost u lečenju melanoma kod pacijenata koji su nosioci HLA

A*0201 alela. Druga mogućnost je korišćenje himeričnih T-limfocita koji umesto transgenog TCR iskazuju receptore stvorene genetskim inženjeringom koji se sastoje od proteinskih lanaca koji čine vezno mesto za molekul protiv koga su ove ćelije usmerene i koji su fuzionisani sa CD28 molekulom i ζ lancem. Na taj način se gubi MHC restrikcija antitumorskog odgovora.

„Klasična“ vakcinacija

Aktivnom imunizacijom protiv određenih virusa se prevenira se nastanak nekih tumora (npr. hepatocelularni karcinom koji nastaje nakon infekcije HBV ili karcinom cerviksa koji je posledica HPV infekcije).

Predavanje: Primarne (kongenitalne) imunodeficijencije.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta je to imunodeficijencija i da ispričaju koje su kliničke posledice nedovoljnog imunskog odgovora.
2. podelu primarnih imunodeficijencija i upoznati su sa njihovom učestalošću.
3. da navedu primere deficijenca usled defekata u sazrevanju T-limfocita, B-limfocita, kao i kombinovanih imunodeficijencija i da objasne koje su njihove kliničke posledice.
4. koji su poremećaji funkcionisanja limfocita i umeju da objasne imunodeficijenciju usled prekida CD40 signalizacije i deficijenca adhezivnih molekula.
5. koje su deficijenca komponenti komplemanta, i ćelija urođene imunosti.

Seminar: Imunski odgovor na transplantirana tkiva. Transplantacioni antigeni. Indukcija imunskog odgovora i mehanizmi odbacivanja kalema. Prevencija i tretman odbacivanja kalema. Primena laboratorijskih metoda u pripremi za transplantaciju i praćenju pacijenata posle izvršene transplantacije.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. šta je to transplantacija ćelija, tkiva i organa, znaju šta sve može da se transplantira, kao i kakve vrste transplantacija postoje.
2. šta su to transplantacioni antigeni, razumeju koncepte direktnog i indirektnog prepoznavanja MHC molekula i mehanizme odgovora imunskog sistema na transplantacione antigene.
3. mehanizme hiperakutnog, akutnog vaskularnog i celularnog, kao i hroničnog odbacivanja kalema.
4. specifičnost transplantacije kostne srži.
5. na koji se način vrši pretransplantaciona obrada pacijenata i razumeju principe HLA tipizacije i unakrsnog testa slaganja, kao i njihov značaj za alogenu transplantaciju.
6. principe lečenja odbacivanja kalema.

Pitanja za ulazne testove

1. Opišite po jednu primarnu imunodeficijenciju urođene i adaptivne imunosti (po izboru).
2. Koji su transplantacioni antigeni i na koji način se prepoznaju?
3. Opišite tipove odbacivanja kalema (uzroci i mehanizmi).
4. Principi prevencije i terapije odbacivanja kalema.
5. Transplantacija ćelija krvi i matičnih ćelija hematopoeze.

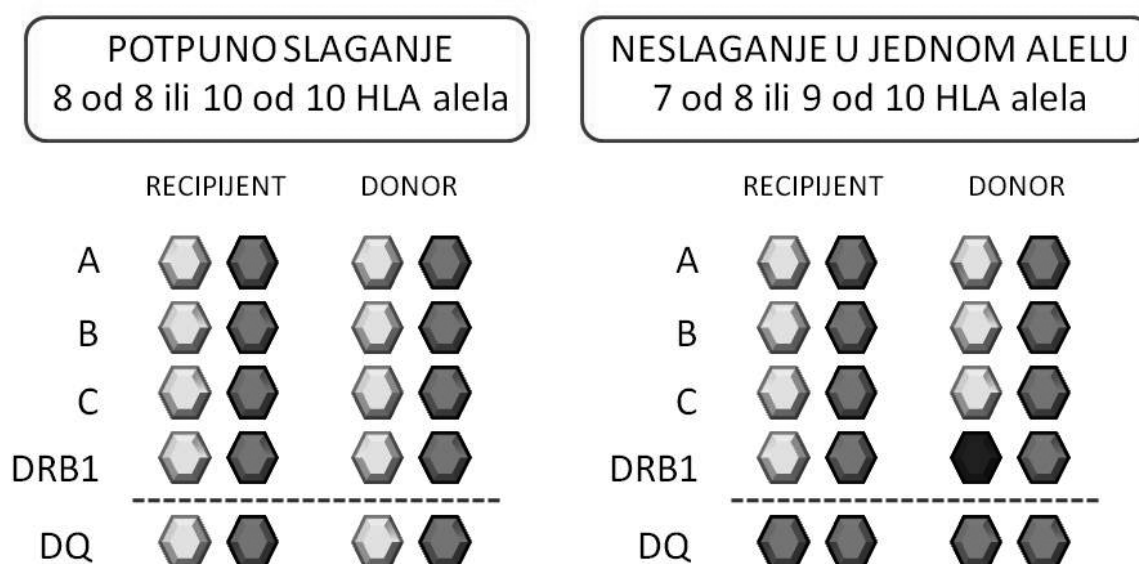
Laboratorijska obrada pacijenata pre transplantacije

U slučaju postojanja jasnih indikacija za sprovođenje transplantacije tkiva i organa, pacijent prolazi kroz niz procedura koje će omogućiti njegovo priključivanje nacionalnoj listi osoba koje čekaju transplantaciju. U zavisnosti od toga koji organ ili tkivo treba da se presadi, obrada, priprema i zahtevi za kompatibilnost tkiva se razlikuju (npr. zahtevi za podudarnost tkiva su strožiji kada se transplantira bubreg nego kada se transplantira kornea, a još su strožiji kada se transplantira kostna srž u odnosu na presađivanje bubrega). Po pravilu, tokom pripreme za transplantaciju, kod pacijenta se sprovodi:

- određivanje krvne grupe i Rh faktora
- HLA tipizacija
- određivanje prisustva postojećih, odnosno prethodno formiranih antitela

HLA tipizacija se obavlja da bi se odredilo koje HLA alele poseduje pacijent radi usklađivanja njegovih HLA alela sa HLA alelima potencijalnog davaoca, a u cilju smanjenja mogućnosti odbacivanja kalema. Savremene tehnologije u pripremi za transplantaciju koriste **serološke i molekularne metode** detektovanja HLA antigena davaoca i primaoca. Tokom HLA tipizacije, posebna pažnja se posvećuje ispitivanju slaganja u **HLA-A**, **HLA-B** i **HLA-DR** lokusima koji su veoma polimorfni u populaciji, a nekada i HLA C i HLA DQ lokusima (Slika 7).

Slika 7. Slaganje u HLA lokusima primaoca (recipijenta) i davaoca (donora)



Postojeća, tj. **prethodno formirana antitela** prisutna su zbog prethodne senzibilizacije primaoca na aloantigene tokom:

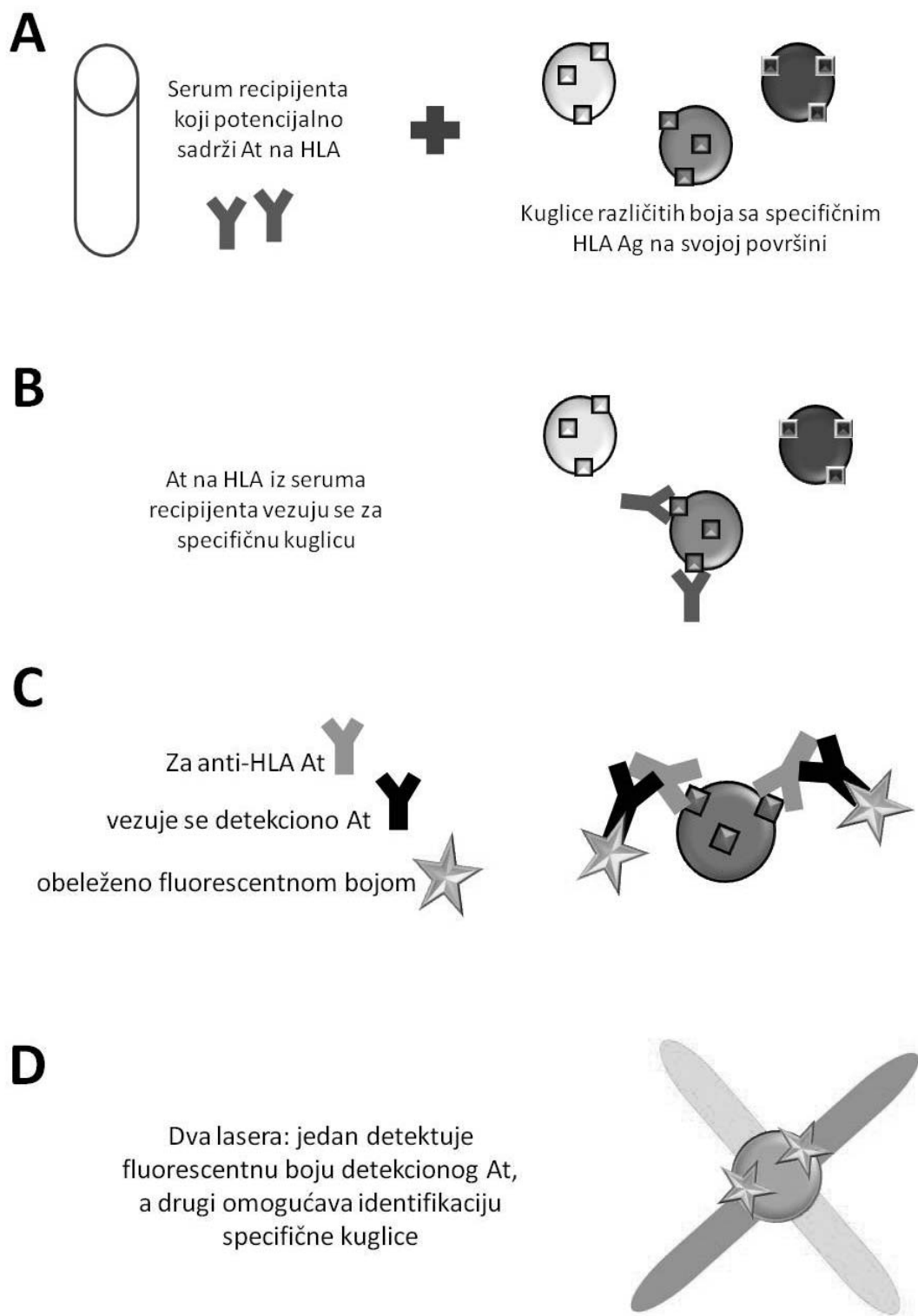
- ponavljanih **transfuzija** krvi
- prethodnih **transplantacija** organa
- višestrukih **trudnoća** kod žena

Ova antitela se detektuju pomoću **testa panel-reaktivnih antitela** (*engl.* panel-reactive antibody test, **PRA test**). PRA test obuhvata testiranje seruma potencijalnog primaoca na panelu od 40-60 različitih davalaca koji su reprezentativni uzorak davalaca organa u datoj populaciji (Slika 8). Na ovaj način se ispituje u kojoj meri je pacijent, potencijalni primaoc organa, senzibilisan na antigene koji su česti u populaciji kojoj on pripada. Ova analiza se ponavlja 1-2 puta godišnje dok pacijent čeka na transplantaciju.

U slučaju kada se pojavi dostupan kadaverični organ za transplantaciju (npr. bubreg) od donora za kojeg je utvrđeno da je bio zdrav, pored ispitivanja da li je davaoc bio zaražen virusima hepatitisa B ili C i HIV-om i da li je bolovao od sifilisa, određuju se krvna grupa i Rh faktor i vrši se HLA tipizacija. Po obavljenim analizama, kontaktiraju se pacijenti (6-8) sa liste čekanja na osnovu strogo utvrđenih kriterijuma (koji se prvenstveno odnose na kompatibilnost sa dostupnim kadaveričnim bubregom). Sa liste se biraju oni pacijenti koji imaju:

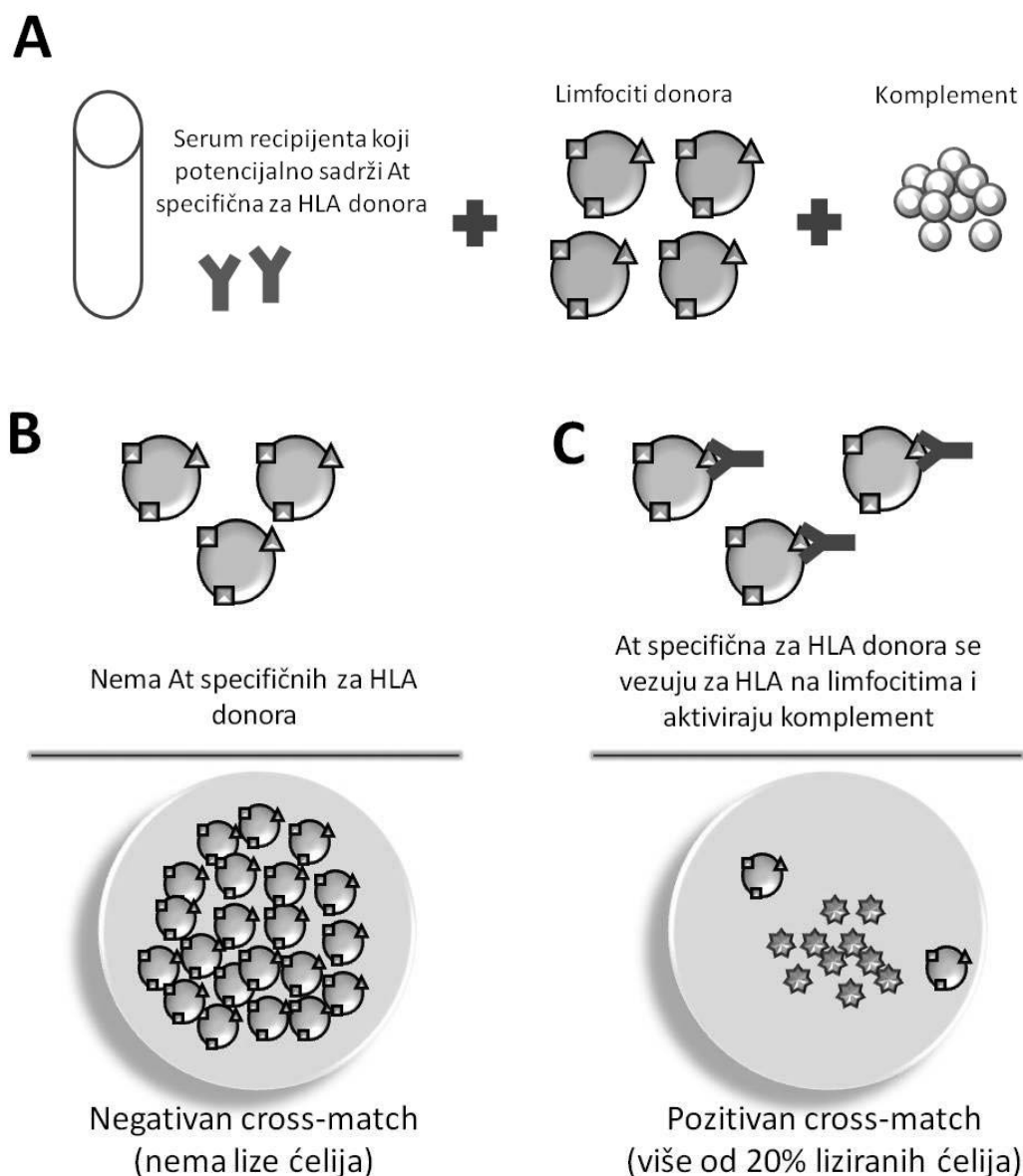
- podudarnu **krvnu grupu** i Rh faktor sa davaocem
- visoku podudarnost HLA molekula sa davaocem

(nastavak na strani 64)



Slika 8. PRA test. Serum primaoca (recipijenta) koji potencijalno sadrži anti-HLA antitela (Anti-HLA At) se dodaje mešavini sintetičkih kuglica različitih boja, pri čemu je svaka kuglica obložena različitim antigenom. Dakle, svaka kuglica je određene boje i obložena određenim HLA antigenom (A). Ako su prisutna anti-HLA At u serumu recipijenta, ova At će se vezati za odgovarajući HLA Ag/kuglicu (B). Potom se za vezano anti-HLA At vezuje detekciono At obeleženo fluorescentnom bojom (C). Upotrebom lasera može se ispitati prisustvo fluorescentne boje na površini svake jedinstvene kuglice (D). Na taj način se određuje profil anti-HLA At recipijenta i poredi se sa HLA potencijalnog davaoca (donora).

Tada se vrši i serološko testiranje potencijalnih primalaca na prisustvo postojećih, odnosno prethodno formiranih antitela na HLA (a potencijalno i druge) molekule davaoca, odnosno **test unakrsnog slaganja** (*engl. cross-match test*). Ovim ispitivanjem se eliminišu primaoci koji imaju preformirana antitela na antigene davaoca, jer takva antitela izazivaju hiperakutno odbacivanje presađenog organa. „Cross-match“ test se obavlja tako što se mononuklearne ćelije krvi potencijalnog davaoca testiraju u prisustvu seruma primaoca organa. Ukoliko serum primaoca sadrži antitela na aloantigene davaoca dolazi do lize ćelije davaoca posredstvom komplementa, što predstavlja pozitivnu reakciju i kontraindikaciju za transplantaciju (Slika 9).^[1]



Slika 9. „Cross-match“ test. Serum primaoca (recipijenta) koji potencijalno sadrži At specifična za HLA davaoca (donora) dodaje se T ili B-limfocitima donora, zajedno sa komplementom (A). Ako At specifična za HLA donora nisu prisutna, neće doći do lize ćelija i rezultat testa će biti negativan (B). Ako se At specifična za HLA donora vežu za limfocite i aktiviraju sistem komplementa klasičnim putem, ćelije će biti lizirane, a rezultat testa je slabo, srednje ili jako pozitivan, u zavisnosti od procenta liziranih ćelija(C).

Literatura:

1. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology* 2011;16:125-33.

Predavanje: Sekundarne (stečene) imunodeficijencije.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. uzroke stečenih imunodeficijencija.
2. u kojim situacijama dolazi do jatrogenih imunodeficijencija i umeju da objasne zbog čega primena hemioterapije, zračenja organizma, imunosupresivne terapije i splenektomija dovode do imunodeficijencija.
3. kako maligne bolesti dovode do imunodeficijencije.
4. da infekcije različitim virusima mogu da dovedu do imunodeficijencije.
5. da objasne mehanizme nastanka imunodeficijencije u HIV infekciji.

Seminar: Principi imunoprofilakse infektivnih bolesti. Pasivna imunizacija. Vakcine.

Ishod: **Studenti znaju/razumeju:**

1. i mogu da navedu načine imunizacije i da svaki način imunizacije potkrepe odgovarajućim primerom.
2. prednosti i nedostatke aktivne i pasivne imunizacije.
3. da objasne značaj što je moguće šireg obuhvata populacije vakcinama za eradikaciju i kontrolu pojedinih infektivnih bolesti na nekoliko primera. Studentima je jasan pojam kolektivnog imuniteta.
4. prednosti i nedostatke imunizacije živim vakcinama i umeju da navedu primere živih vakcina.
5. prednosti i nedostatke imunizacije inaktivisanim vakcinama i umeju da navedu primere inaktivisanih vakcina.
6. prednosti i nedostatke imunizacije subjediničnim vakcinama i umeju da navedu primere subjediničnih vakcina.
7. princip funkcionisanja imunizacije konjugovanim vakcinama i umeju da navedu primere konjugovanih vakcina.
8. šta su to polivalentne/kombinovane vakcine i umeju da navedu primere.
9. kakve su perspektive u razvoju vakcina.

Pitanja za ulazne testove (za grupe koje su zbog praznika gubile termine)

1. Zbog čega dolazi do imunodeficijencije u HIV infekciji i AIDS-u?
2. U kojim slučajevima (osim HIV infekcije) nastaju sekundarne imunodeficijencije?
3. Navedite princip i tipove preparata koji se koriste za veštačku pasivnu imunizaciju.
4. Žive i mrtve vakcine: na koji način se dobijaju i kako deluju (navesti po jedan primer)?
5. Subjedinične i konjugovane vakcine: na koji način se dobijaju i kako deluju (navesti po jedan primer)?

PRINCIPI IMUNOPROFILAKSE INFEKTIVNIH BOLESTI

Vrste imunizacije

Pasivna imunizacija

Humani imunoglobulini

Životinjski serumi

Monoklonska antitela

Aktivna imunizacija (vakcinacija)

Principi vakcinacije

Tipovi vakcina, njihove osobine i mehanizam delovanja

Pristupi u pravljenju novih vakcina

Pod **profilaksom infektivnih bolesti** podrazumevaju se postupci preduzeti pre ili neposredno po izlaganju čoveka infektivnom agensu ili njegovom produktu sa ciljem da se spreči uspostavljanje infekcije i razvoj bolesti. **Imunoprofilaksa** predstavlja najznačajniji vid profilakse infektivnih bolesti i bazira se na principu **imunizacije** ljudi. Cilj imunizacije je da imunizovana osoba stekne **imunitet (imunost)**, tj. stanje otpornosti na infekciju nekim patogenom koje traje određeno, kraće ili duže vreme (idealno doživotno). Imunizacija može da bude prirodna i veštačka. **Prirodna imunizacija** se dešava spontano, bez ciljane ljudske aktivnosti i može da bude **aktivna**, kao što je imunost koja ostaje kod pojedinca posle infekcije, ili **pasivna**, posredovana antitelima koje prolaze placentu (IgG) ili se sekretuju u mleko (prevashodno IgA) kojom majka štiti svoje dete u toku trudnoće i tokom prvih meseci života od svih bolesti koje je preležala ili protiv kojih je vakcinisana. Sa druge strane, **veštačka imunizacija** nastaje kao rezultat određenih medicinskih postupaka čiji je cilj da se razvije imunost pojedinca na neku infektivnu bolest. I ova imunost može da se indukuje **aktivno**, vakcinacijom, putem izlaganja pojedinca određenom patogenu ili njegovoj komponenti, odnosno produktu (obično izmenjenom), ili **pasivno**, davanjem antitela specifičnih za taj patogen, njegovu komponentu ili produkt. U daljem tekstu biće detaljnije opisane pasivna i aktivna veštačka imunizacija.

PASIVNA IMUNIZACIJA

Pasivna veštačka imunizacija podrazumeva **davanje imunoglobulina (antitela)** određenoj osobi. S obzirom da tretirana osoba dobija već formirana antitela, ovakav tretman ima brzo, skoro **trenutno dejstvo**, ali ostavlja **kratkotrajan imunitet** od nekoliko nedelja, do maksimalno nekoliko meseci (uslovljen je poluživotom samih imunoglobulina, koji se kreće od nekoliko dana za većinu izotipova do oko 3 nedelje za IgG).

Pasivna imunizacija se koristi u **profilaktičke svrhe**, na primer, da zaštiti osobe sa oslabljenom funkcijom imunskog sistema (prevremeno rođena deca ili osobe sa deficijencijom humoralne imunosti). Takođe, pasivna imunizacija se ponekad koristi u profilaktičke svrhe i kod imunokompetentnih osoba da spreči razvoj bolesti u slučaju kada je ta osoba bila izložena određenom infektivnom agensu, npr. virusu hepatitisa B (HBV) (kod novorođene dece u slučaju kada su majke inficirane HBV ili kod osoba koje se uoble iglom kontaminiranom krvlju sa HBV), ili virusu besnila (kod osoba koje je ušla potencijalno inficirana životinja). Sa druge strane, zahvaljujući brzom dejstvu datih imunoglobulina, pasivna imunizacija se ponekad koristi i **terapijski** sa ciljem da se poboljša klinička slika bolesti i često predstavlja terapijsku metodu koja spašava život. Na primer, ona se koristi kod nekih bolesti posredovanih toksinima, kao što su difterija i botulizam, ili u slučaju izlaganja čoveka otrovu neke životinje (npr., prilikom ujeda zmije otrovnice).

Pasivna imunizacija se najčešće obavlja humanim imunoglobulinima, ali se ponekad koriste i životinjski serumi i monoklonska antitela.

1) **Imunoglobulini humanog porekla.** Oni se dobijaju izdvajanjem iz plazme velikog broja davalaca krvi, sadrže prevashodno IgG i primenjuju se intravenski ili intramuskularno, a ponekad i subkutano. U zavisnosti od načina dobijanja i namene razlikujemo dve grupe preparata:

- **Humani serumski imunoglobulini** (nazivaju se još i **gamaglobulini** ili **intravenski imunoglobulini, IVIG**) sadrže antitela različitih specifičnosti koja su obuhvaćena u normalnom repertoaru antitela odraslih osoba. Oni se dobijaju od velikog broja (često više hiljada) nasumično izabranih davalaca čime se obezbeđuje prisustvo antitela protiv većine uobičajenih patogena. Ovi preparati se koriste

u profilaksi infektivnih bolesti kod osoba sa poremećenom produkcijom antitela (osobe sa hipogamaglobulinemijom ili agamaglobulinemijom). Takođe, oni se ponekad koriste za prevenciju određenih infektivnih bolesti (npr., malih boginja, hepatitisa A, rubele u prvom trimestru trudnoće itd.) u slučajevima kada za te bolesti ne postoje ili nisu dostupni preparati sa visokim titrom antitela. Pored prevencije infektivnih bolesti, intravenski imunoglobulini (IVIG) se sve više koriste i u terapiji mnogih autoimunskih i drugih bolesti (npr. kod autoimunske, odnosno idiopatske trombocitopenijske purpure).

- **Imunoglobulini visokog titra** (ponekad se nazivaju i **specifični** ili **hiperimuni globulini**) se koriste u prevenciji ili terapiji jedne određene infektivne bolesti, jer sadrže visok titar antitela specifičnih za patogen koji izaziva tu bolest. Oni se dobijaju izdvajanjem iz plazme samo seropozitivnih ljudi, tj. onih koji su ili vakcinisani ili su nedavno preležali tu bolest. Ovakvi preparati postoje za hepatitis B, tetanus, besnilo, respiratorni sincicijalni virus (RSV), varicelu i još neke druge izazivače odnosno bolesti.
- 2) **Životinjski serumi.** Za pasivnu imunizaciju se ponekad koriste i životinjska antitela u vidu seruma. Životinjski serumi se dobijaju imunizacijom životinja (obično konja) određenim antigenom, najčešće toksinom (takvi serumi se zovu **antiserumi** ili **antitoksini**). Njihova primena je rizičnija od davanja humanih imunoglobulina, pošto životinjski proteini indukuju snažan humoralni odgovor kod imunizovane osobe, što može da dovede do formiranja imunskih kompleksa u cirkulaciji i serumske bolesti (III tip preosetljivosti). Zbog toga se uvek, kada je to moguće, koriste humani preparati. Ipak, nekada nije moguće ili nije praktično dobiti humane imunoglobuline (npr., protiv botulinskog toksina ili otrova zmijske), te se konjski antiserumi i danas koriste u terapiji botulizma ili nakon ujeda zmijske otrovnice.
- 3) **Monoklonska antitela.** U profilaksi ili terapiji pojedinih infektivnih bolesti mogu da se koriste i monoklonska antitela. Na primer, ona se koriste za prevenciju infekcija izazvanih respiratornim sincicijalnim virusom (RSV) kod pretermeno rođene dece. Ipak, monoklonska antitela se danas mnogo češće koriste u terapiji nekih autoimunskih i hroničnih zapaljenskih bolesti.

AKTIVNA IMUNIZACIJA (VAKCINACIJA)

Principi vakcinacije

Vakcinacija predstavlja vid veštačke imunizacije ljudi sa ciljem da se kod njih **aktivno** indukuje protektivni imunski odgovor na određeni patogen i spreči razvoj bolesti u slučaju kasnijeg izlaganja čoveka tom patogenu. Termin **vakcina** vodi poreklo od latinske reči *vacca* (krava), s obzirom da je prva zabeležena uspešna vakcinacija protiv variole (velikih boginja) sprovedena virusom kravljih boginja, tzv. virusom vakcinije (Edward Jenner, 1796). Od tada do danas je razvijen veći broj vakcina i program vakcinacije na svetskom nivou doveo je do iskorenjavanja (eradicacije) velikih boginja i drastičnog smanjenja incidence mnogih drugih infektivnih bolesti, naročito u razvijenim zemljama, što predstavlja jedno od najvećih dostignuća u imunologiji i medicini uopšte. Nažalost, povremeni prekidi u programima vakcinacije u sredinama sa izraženim društvenim i ratnim sukobima, kao i rastući anti-vakcinalni pokret na globalnom nivou sa posledičnim smanjenim obuhvatom vakcinisane dece u mnogim zemljama, doveli su do ponovne pojave nekih infektivnih bolesti u pojedinim regionima (npr. malih boginja), što predstavlja konstantnu pretnju za javno zdravlje u čitavom svetu danas.

Vakcinacija se bazira na principu izlaganja pojedinca patogenu ili nekom njegovom delu ili produktu (npr., toksinu), obično izmenjenom tako da može da izazove imunski odgovor kod vakcinisane osobe, ali ne i bolest. Cilj ovakvog postupka je da se **indukuje stečeni imunski odgovor** na određeni patogen (ili njegov produkt) i da se stvori **imunološka memorija** na njih kroz indukciju dugoživećih plazma ćelija i memorijskih T- i B-limfocita. Pošto je za razvoj imunološke memorije neophodno vreme, vakcine **nisu efikasne odmah** po davanju (za razliku od imunoglobulina koji imaju trenutno dejstvo), ali je **imunitet** koji indukuju **dugotrajan** (obično traje godinama, nekad i doživotno). Većina savremenih vakcina ostvaruje svoju zaštitu prevashodno kroz indukciju **T-zavisnog humoralnog odgovora**, odnosno produkciju **visokoafinitetnih antitela**. Ona deluju protektivno tako što direktno neutrališu patogene inhibirajući njihovo vezivanje za ćelije domaćina ili pokreću neke od odbrambenih efektorskih mehanizama, kao što je na primer aktivacija komplementa. Sa druge strane, većina vakcina ne indukuje snažan odgovor CD8⁺ citotoksičnih T-limfocita (CTL), verovatno zbog toga što se egzoge-

ni proteini, koji u ćelije dospevaju iz spoljašnje sredine, ne prezentuju efikasno u sklopu MHC molekula I klase. Ipak, neke vakcine (prevažadno žive virusne vakcine) mogu pored humoralnog da indukuju i dobar **citotoksičan odgovor**, dok neke druge vakcine (npr. polisaharidne vakcine protiv pneumokoka i meningokoka) deluju tako što indukuju **T-nezavisni humoralni odgovor** na polisaharidne antigene bakterijske kapsule.

Vakcine se, po pravilu, daju **profilaktički**, pre izlaganja čoveka infektivnom agensu prirodnim putem (vakcinacija se najčešće obavlja u najranijem životnom dobu), ali kod bolesti koje imaju dugu inkubaciju moguće je i njihovo davanje nakon ekspozicije (npr. vakcina protiv besnila može da spreči bolest i ako se da neposredno posle ujeda inficirane životinje). Takođe postekspoziciono davanje vakcine može da bude efikasno ako se primeni zajedno sa specifičnim imunoglobulinima (npr. nakon uboda na iglu kontaminiranu krvlju sa virusom hepatitisa B). Što se tiče načina davanja, najveći broj vakcina se daje **parenteralno**, u vidu injekcija, ali postoje i vakcine koje se daju **preko mukoze** digestivnog (npr. **oralne vakcine** protiv poliomijelitisa i rotavirusa) ili respiratornog trakta (npr., **nazalna vakcina** protiv influence). Prednost oralnih i nazalnih vakcina u odnosu na klasične je u tome što imitiraju prirodan put infekcije i dovode do produkcije mukoznih IgA koji mogu da neutrališu patogene već na ulaznim vratima u organizam.

Svaka vakcina, da bi bila kvalitetna i mogla masovno da se upotrebljava, treba da ispuni **određene uslove** (Tabela 5). Pre svega, ona treba da bude efikasna (da kod velike većine vakcinisanih osoba indukuje protektivan imunski odgovor) i bezbedna (ne sme da dovede do oboljevanja ili teških neželjenih dejstava). Dobra vakcina bi trebalo da pored humoralne indukuje i celularnu imunost, tj. da aktivira citotoksične T-limfocite, što je naročito važno za intracelularne patogene. Takođe, važno je da vakcina indukuje dugotrajn imunitet, čime se izbegava ili smanjuje na najmanju moguću meru potreba za njenom ponovnom primenom. Konačno, vakcina treba da ispuni i neke praktične zahteve: da je stabilna (da može lakše da se transportuje i duže da traje), da se lako primenjuje (prednost oralnog i nazalnog davanja u odnosu na injekcije), da nije skupa i sl.

Tabela 5: Osobine koje treba da poseduje kvalitetna vakcina

Osobina	Razlog/Objašnjenje
Sigurnost	Vakcina ne sme da dovede do obolevanja i težih neželjenih dejstava
Efikasnost zaštite	Vakcina mora da štiti od obolevanja usled infekcije patogenom
Dugotrajnost zaštite	Zaštita mora da traje godinama nakon vakcinacije
Indukcija nastanka neutrališućih antitela	Važno za sprečavanje uspostavljanja infekcije i neutralizaciju štetnog dejstva toksina
Indukcija citotoksičnog odgovora	Intracelularni patogeni se mnogo efikasnije eliminišu pomoću citotoksičnih T-limfocita
Praktičnost	Niska cena, stabilna, lako se primenjuje (npr., oralna vakcina) itd.

Generalno gledano, vakcine koje sadrže samo jedan ili nekoliko antigena patogena (npr. subjedinične vakcine) su ređe praćene neželjenim dejstvima u odnosu na vakcine koje sadrže cele patogene (žive i mrtve vakcine), ali one su manje imunogene, odnosno indukuju slabiji imunski odgovor. Taj nedostatak se u određenoj meri prevazilazi na dva načina: s jedne strane, većina vakcina se daje u većem broju doza tokom dužeg vremenskog perioda (**revakcinacije** ili tzv. „**Booster**“ doze), a s druge strane mnogim vakcinama se dodaju **adjuvansi** sa ciljem da se poveća njihova imunogenost. Smatra se da adjuvansi deluju tako što stimulišu urođenu imunost kroz nakupljanje antigen-prezentujućih ćelija, povećavanje ekspresije kostimulatora na njima i produkciju citokina, čime se stimuliše i stečeni imunski odgovor na antigene prisutne u vakcini. Adjuvansi mogu da imaju i neke neželjene efekte, pa tako, na primer, mogu da dovedu do inflamatornog odgovora na mestu inokulacije vakcine, ali su veoma retko povezani sa nekim ozbiljnijim neželjenim pojavama.

Konačno, vakcine ne samo da štiti vakcinisane osobe od određene infekcije i bolesti, već mogu da štite i osobe koje nisu dobile vakcinu pod uslovom da je većina ljudi u jednoj populaciji vakcinisana i taj fenomen se naziva **kolektivni imunitet** (engl. herd immunity). Kolektivni imunitet predstavlja vid indirektno zaštite od određene infektivne bolesti koji se dešava kada velika većina ljudi (obično oko 95% svih osoba u jednoj populaciji) biva vakcinisana i razvije otpornost na tu bolest, čime se smanjuje broj osetljivih osoba u pop-

ulaciji, smanjujući tako i mogućnost da te osetljive osobe budu izložene patogenu i razviju bolest što za rezultat ima prekid širenja infekcije i smanjenje incidence (a u jednom trenutku i potpuno nestajanje) bolesti u toj populaciji. Razvoj kolektivnog imuniteta je jedan od glavnih ciljeva programa masovne vakcinacije ljudi u jednoj populaciji.

Tipovi vakcina, njihove osobine i mehanizam delovanja

Na osnovu sastava i načina na koji se kod vakcinisane osobe indukuje imunitet, sve vakcine mogu da se podele u nekoliko grupa odnosno **tipova**, od kojih su najvažnije i najviše se koriste: žive, mrtve, subjedinične, konjugovane i kombinovane vakcine (Osobine najvažnijih vakcina prikazani su u Tabeli 6).

Tabela 6: Osobine najvažnijih vakcina

Tip vakcine	Primeri	Princip imunizacije	Oblik zaštite	Prednosti	Ograničenja
Živa (Atenuisana)	Morbili Zauške Rubela Varicela Poliomijelitis (Sejbinova) Tuberkuloza (BCG)	Oslabljeni (atenuisani) patogen	Produkcija antitela Celularni imunski odgovor	Sveobuhvatan imunski odgovor Dugotrajan imunitet	Nestabilnost Rizik kod davanja imunokompromitovanim bolesnicima
Mrtva (Inaktivisana)	Influenca Poliomijelitis (Salkova) Pertusis	Ceo ubijeni (inaktivisani) patogen	Produkcija antitela	Stabilnost Bezbednost	Slabija imunogenost (adjuvansi) Kraći imunitet (revakcinacije)
Subjedinična (Antigenska)	Difterija Tetanus	Izmenjeni toksin (toksoid)			
	HBV	Rekombinantni antigen (HBsAg)			
	Influenca	Prečišćeni antigeni (H i N)			
Konjugovana	Pneumokok Meningokok Haemophilus influenzae tip B	Polisaharid kapsule vezan za protein (toksoid)	Produkcija antitela (T-zavisni odgovor)		
Kombinovana (Polivalentna)	Pneumokok	Različiti serotipovi istog patogena	Kao kod pojedinačnih vakcina	Kao kod pojedinačnih vakcina	Kao kod pojedinačnih vakcina
	DTP MMR	Različiti patogeni		Veoma praktične	

BCG – Bacil „Calmette-Guerin“, atenuisani soj Mycobacterium bovis; HBV – Hepatitis B virus; HBsAg – površinski antigen HBV; H – Hemaglutinin; N – Neuraminidaza; DTP – Difterija, Tetanus, Pertusis; MMR – Morbili, Mumps, Rubela.

Žive vakcine

Žive vakcine (engl. *live vaccines*) su pripremljene od vijabilnih sojeva mikroorganizama sa ograničenim kapacitetom da indukuju infekciju i bolest kod ljudi. Takvi sojevi ili normalno inficiraju druge životinjske vrste (npr. krave u slučaju vakcine protiv velikih boginja) ili se dobijaju procesom smanjenja njihove virulencije, tj. atenuacije (tzv. atenuisani sojevi) pa se ove vakcine često zovu i **atenuisane vakcine**.

Atenuacija se najčešće sprovodi tako što se patogen duže vreme kultiviše *in vitro* u odsustvu imunskih mehanizama domaćina i pod uslovima različitim od onih koji vladaju u ljudskom organizmu (npr., na nižoj temperaturi ili u ćelijama životinjskih vrsta koje patogen normalno ne inficira), pri čemu on akumulira mutacije i adaptira se na takve uslove, a izgubi sposobnost da indukuje bolest kod čoveka kao njegovog prirodnog do-

maćina. Savremen način atenuacije se zasniva na genetskoj manipulaciji patogena sa ciljem da se kod njih izazovu mutacije gena za bitne faktore virulencije. Atenuisanim vakcinama pripada većina vakcina protiv virusnih oboljenja (npr., protiv zauški, malih boginja, rubele, ovčjih boginja ili poliomijelitisa-oralna Sejbinova vakcina) i pojedine vakcine protiv bakterijskih infekcija (prevashodno onih izazvanih intracelularnim bakterijama) kao što je na primer BCG (obično se kod nas izgovara „Be-Se-Že“) vakcina protiv tuberkuloze.

Poseban tip živih vakcina su vakcine dobijene **genetskom rekombinacijom** (tzv. resortiranjem) homologih segmenata genoma između srodnih virusa. Primer je vakcina za rotavirus dobijena genetskim resortiranjem humanog i bovinog (kravljeg) rotavirusa.

Žive vakcine indukuju **sveobuhvatan imunski odgovor** i to su jedine vakcine u upotrebi koje pored antitela mogu da indukuju i dobar celularni odgovor koji uključuje i citotoksične T-ćelije. Takođe, one ostavljaju **dugotrajan imunitet**, te se najčešće daju u jednoj ili dve doze. Većina ovih vakcina (sa izuzetkom BCG vakcine) se daju deci tek u drugoj godini života (sa revakcinacijom obično u 4-6. godini), s obzirom na imunološku nezrelost odojčeta i prisustvo majčinih antitela koja mogu da smanje imunogenost vakcine i inhibiraju imunski odgovor domaćina. Pored nesumnjivih prednosti, žive vakcine imaju i određena ograničenja: one su relativno **nestabilne**, posebno na višim temperaturama, čime je njihov transport i čuvanje komplikovano (naročito u tropskim krajevima), i iako su veoma **bezbedne**, postoji ipak **opasnost da izazovu bolest** kod ljudi sa neadekvatnom funkcijom imunskog sistema, te se stoga generalno ne daju imunokompromitovanim osobama ili trudnicama (kod njih se koriste inaktivisane i subjedinične vakcine, koje ne mogu da izazovu bolest, ali su nekad i manje efikasne).

Mrtve vakcine

Mrtve vakcine (engl. *killed vaccines*) se nazivaju još i **inaktivisane vakcine** i one sadrže cele mikroorganizme koji su ubijeni (inaktivisani) hemijskim putem (npr. formaldehidom) ili visokom temperaturom, pri čemu su očuvane njihove antigenske osobine i imunogenost. Ove vakcine se obično koriste za one bolesti čiji izazivači ne mogu uspešno da se atenuišu. Inaktivisane vakcine su **stabilne** i **bezbedne** (izuzev kod ljudi koji su alergični na pojedine komponente vakcine, npr. jaja), mada je danas tendencija da se ove vakcine, zbog veoma retkih ozbiljnih neželjenih komplikacija, zamenjuju subjediničnim vakcinama (kada one postoje). Sa druge strane, inaktivisane vakcine su **manje imunogene** od živih vakcina i indukuju prevashodno **produkciju antitela**, pa se zbog toga uvek daju u većem broju doza (česte revakcinacije) zajedno sa adjuvansima. Primeri ovih vakcina su bakterijske vakcine protiv velikog kašlja (pertusisa) i tifusa ili virusne protiv poliomijelitisa (inaktivisana Salkova vakcina), influence itd.

Subjedinične vakcine

Subjedinične vakcine se sastoje od pojedinih strukturnih komponenti mikroorganizama ili njihovih produkata (npr. toksina) koje kod vakcinisanih osoba mogu da izazovu protektivan imunski odgovor, pre svega tako što indukuju **produkciju neutrališućih antitela**. S obzirom da se sastoje od pojedinačnih antigena, ove vakcine se još zovu i **antigenske** i ponekad se svrstavaju u mrtve vakcine. Antigeni koji se nalaze u vakcinama dobijaju se iz patogena, **izolacijom i prečišćavanjem** njihovih produkata, ili što je sve češći slučaj, sintetičkim putem pomoću tehnike rekombinantne DNK (genetskim inženjeringom), kao **rekombinantni proteini** koje proizvode određene eukariotske ćelije (npr. ćelije kvasnica). Po pravilu se radi o **površinskim antigenima** (tipično proteinima) koji su važni za adherenciju virusa ili bakterija za ćelije domaćina ili antigenima polisaharidne kapsule kod inkapsuliranih bakterija. Primeri ovakvih vakcina su subjedinična vakcina protiv influence (koja sadrži hemaglutinin i neuraminidazu) i polisaharidne vakcine protiv pneumokoka i meningokoka.

U subjedinične vakcine spadaju i vakcine protiv bolesti koje su posredovane toksinima, kao što su tetanus i difterija. Ove vakcine ne sadrže bakterije izazivače, već samo **toksoide**, tj. inaktivisane bakterijske toksine koji su izmenjeni hemijskim putem tako da su izgubili toksičnost, ali su zadržali svoje antigenske osobine i imunogenost. Slična vakcina, tzv. acelularna vakcina protiv pertusisa sadrži i toksoid (izmenjeni pertusis toksin) i najmanje jedan površinski antigen izazivača velikog kašlja.

Poseban tip subjediničnih vakcina su vakcine protiv virusa hepatitisa B (HBV) i humanih papiloma virusa (HPV). U oba slučaja se radi o rekombinantnim virusnim proteinima (HbsAg za HBV i L1 protein za HPV), koji imaju tendenciju da se sponatno povezuju i formiraju **čestice nalik na viruse** (engl. virus-like particles, **VLP**)

koje nisu infektivne, ali se ponašaju kao virusne čestice i bivaju lakše preuzete i prezentovane T-limfocitima, te stoga imaju znatno veću imunogenost od pojedinačnih proteina virusa (ove vakcine čak mogu da izazovu i jači imunski odgovor od odgovora koji se javlja tokom spontane infekcije virusom u prirodi, kao što je slučaj kod vakcine protiv HPV).

Subjedinичne vakcine su **stabilne** i još **bezbednije** od inaktivisanih (naročito one koje sadrže rekombinantne proteine), ali zbog njihove **slabe imunogenosti** (koja je obično manja od odgovarajućih inaktivisanih vakcina), moraju da se daju u višestrukim dozama zajedno sa adjuvansima (pomenute HBV i HPV vakcine mogu da se daju i bez adjuvansa, s obzirom na njihovu povećanu imunogenost).

Konjugovane vakcine

Konjugovane vakcine su poseban tip savremenih subjedinичnih vakcina koje su razvijene tokom poslednjih 20-ak godina i predstavljaju direktan rezultat napretka imunologije i razumevanja mehanizama kojim pomoćnički T-limfociti stimulišu B-limfocite da produkuju visokoafinitetna antitela u okviru T-zavisnog humoralnog odgovora.

Radi se o vakcinama za inkapsulirane bakterije i to pneumokok, meningokok i Hemofilus influence (*Haemophilus influenzae*) tip B. Važan faktor virulencije ovih bakterija je kapsula koja se sastoji od polisaharida i koja ima antifagocitna svojstva. Glavni mehanizam odbrane protiv inkapsuliranih bakterija predstavlja T-nezavisan humoralni odgovor. Nažalost, mala deca do dve godine starosti i osobe bez slezine (npr. splenektomisane osobe) ne mogu da uspostave adekvatan humoralni odgovor na polisaharide i druge T-nezavisne antigene i imaju mnogo veći rizik da razviju teške infekcije izazvane ovim bakterijama, uključujući i meningitis i sepsu, koje imaju visoku smrtnost i ostavljaju teške posledice kod preživelih. Zbog toga postojeće subjedinичne, polisaharidne vakcine protiv ovih bakterija kod njih nisu dovoljno efikasne.

Ovaj nedostatak polisaharidnih vakcina je prevaziđen razvojem konjugovanih vakcina u kojima je **polisaharid kapsule** inkapsuliranih bakterija (kao T-nezavisan antigen) **vezan (konjugovan)** za neki protein koji predstavlja T-zavisni antigen. Kao protein se najčešće koristi **difterični toksoid**, s obzirom na činjenicu da mala deca odlično odgovaraju na taj antigen, a postoji i višedecenijsko iskustvo o njegovoj bezbednosti. Princip dejstva ovih vakcina je baziran na tome da je konjugacijom omogućeno da T-limfociti pomognu i onim B-limfocitima koji su specifični za polisaharide kapsule, a ne samo za difterični toksin (slično humoralnom odgovoru na kompleks haptena-nosač). Kao rezultat toga dolazi do indukcije imunološke memorije i **produkcije visokoafinitetnih antitela** (IgG) specifičnih za polisaharide kapsule koja mogu da spreče teške infekcije izazvane inkapsuliranim bakterijama. Konjugovane vakcine imaju iste osobine kao i subjedinичne, **bezbedne** su i daju se deci tokom prve godine života (3 do 4 doze) i splenektomisanim osobama, a najveće ograničenje im je **relativno visoka cena**.

Kombinovane vakcine

Kombinovane vakcine su vakcine koje sadrže **antigene različitih serotipova** jednog istog patogena ili veći broj antigena poreklom od **različitih patogena**. Primer za prvo su već pomenute vakcine protiv pneumokoka, bilo polisaharidna koja sadrži antigene 23 najčešća serotipa u populaciji, ili konjugovana koja sadrži antigene 10 ili 13 serotipova koji su najčešći uzročnici teških invazivnih infekcija kod dece. Primer za drugo su DTP vakcina (često se kod nas izgovara „Di-Te-Per“) protiv tetanusa, difterije i pertusisa ili kombinovana živa vakcina MMR protiv malih boginja (morčila), zauški (mumps) i rubele.

Kombinovane vakcine se još nazivaju i **polivalentne vakcine** (po analogiji sa vakcinama koje sadrže samo jedan antigen i nekad se nazivaju monovalentnim). Ove vakcine zadržavaju sve dobre osobine pojedinačnih vakcina i pokazano je da se njima indukuje protektivan imunski odgovor na svaku komponentu u vakcini (bilo da je atenuisani soj ili antigen) u približno istoj meri kao i kad se daju pojedinačne vakcine. Zbog toga su one **veoma praktične** (manje davanja, manji broj dolazaka kod lekara, manja ukupna cena itd.) i tendencija je da se vakcine koje se daju pedijatrijskoj populaciji sve više zamenjuju kombinovanim vakcinama protiv većeg broja patogena (nove vakcine sadrže i po pet ili više različitih patogena).

Pristupi u pravljenju novih vakcina

Iz svega navedenog jasno je da vakcine predstavljaju **najbolji i najefikasniji način borbe protiv infektivnih bolesti**. Ipak, i pored nesumnjive koristi od vakcina, njihov razvoj i primena skopčana je sa mnogim

poteškoćama i ograničenjima te uprkos intenzivnim istraživanjima do danas nisu napravljene efikasne vakcine za mnoge bolesti, uključujući AIDS ili malariju i druge parazitske infekcije (za sada ne postoji ni jedna odobrena vakcina protiv parazita). U nekim slučajevima nije ni realno očekivati da se napravi efikasna vakcina, s obzirom da ne ispunjavaju svi infektivni agensi uslove da budu dobri kandidati za razvoj vakcine, niti je pravljenje vakcine protiv njih uvek ekonomski opravdano. Tako na primer, poželjno je da infektivni agens bude antigenski stabilan i da postoji u jednom ili malom broju različitih serotipova, da antitela deluju protektivno i sprečavaju njegovo sistemsko širenje, da patogen nema onkogeni potencijal, da inficira isključivo ljude i da kod njih izaziva težu bolest. Sa druge strane, mnogi patogeni izazivaju hronične infekcije i uspostavljaju latenciju u organizmu (npr. herpes simpleks virus – HSV), antigenski su varijabilni (npr. HIV), postoje u mnogo serotipova (npr. rinovirusi) ili inficiraju, pored ljudi, i životinje (izazivači mnogih zoonoza), što sve veoma otežava pravljenje efikasne vakcine protiv bolesti koje izazivaju i sprečava njihovu eradikaciju.

Bez obzira na poteškoće, istraživanja na razvoju novih vakcina se nastavljaju nesmanjenim tempom. Takođe, pored već tradicionalnih pristupa u pravljenju vakcina (atenuacija i inaktivacija patogena, prečišćavanje imunodominantnih antigena patogena ili njihova produkcija u drugim ćelijama itd.), u sve većoj meri se koriste novi pristupi u dizajnu i pravljenju vakcina, koji podrazumevaju korišćenje informacionih sistema, rekombinantne tehnologije, nano čestica, lipozoma, dizajn i uvođenje novih potentnijih adjuvanasa i mnogo drugo. **Reverzna vakcinologija** predstavlja jedan od tih novih pristupa koji podrazumeva proučavanje genetskog materijala mikroorganizama korišćenjem **informacionih tehnologija** (*in silico*) kako bi se utvrdilo koji geni kodiraju ključne antigenske proteine nekog patogena, kao potencijalnih kandidata za vakcinu. Potom se ti geni ekspimiraju kao rekombinantni proteini, pa se sprovode *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se procenila njihova imunogenost i efikasnost odbrane usmerene na njih. Ovaj princip je iskorišćen u pravljenju vakcine protiv *Neisseria meningitidis* serotip B koja je nedavno napravljena i već je u upotrebi u mnogim zemljama. Vakcine u razvoju, koje još uvek nisu u upotrebi, ali mnogo obećavaju su hibridne i DNK vakcine. **Hibridne vakcine** podrazumevaju imunizaciju ljudi sa hibridnim virusima koji su dobijeni **ubacivanjem gena** za imunodominantne peptide antigena različitih patogena u **virusne „vektore“**, odnosno viruse koji mogu da inficiraju, ali ne i izazovu bolest kod čoveka (npr. virus vakcinije). Na taj način omogućena je prezentacija antigena patogena u sklopu MHC molekula I klase od strane inficiranih ćelija i aktivacija CD8⁺ T-limfocita kod vakcinisane osobe. **DNK vakcine** su bazirane na principu imunizacije ljudi **bakterijskim plazmidom** koji sadrži DNK za antigene patogena. Slično prethodnim vakcinama, antigen-prezentujuće ćelije domaćina mogu da ingestiraju te plazmide i produkuju i prezentuju antigene patogena u kompleksu sa MHC molekulima I klase. Stoga oba ova tipa vakcina mogu da kod imunizovane osobe, pored humoralne, indukuju i celularnu imunost (uključujući i citotoksične T-limfocite) koja je presudna u odbrani od infekcija izazvanih intracelularnim patogenima. Takođe, one pružaju mogućnost pravljenja polivalentnih vakcina, što ih čini potencijalno veoma praktičnim. Sa druge strane, njihova ograničenja su u tome što mehanizam njihovog dejstva i mogući neželjeni efekti još uvek nisu dovoljno ispitani (naročito u slučaju DNK vakcina), kao i što davanje virusnih vektora indukuje i imunski odgovor vakcinisane osobe na vektor, čime je onemogućeno njegovo ponovno korišćenje. I pored svojih nedostataka, ove vakcine imaju veliki potencijal i mnoge eksperimentalne vakcine bazirane na ovim principima se trenutno nalaze u fazi kliničkih ispitivanja.


**КЛИНИЧКИ ЦЕНТАР
СРБИЈЕ**

Институт за инфективне и тропске болести
Београд, Пастерова 2
Служба за клиничку бактериологију,
паразитологију и вирусологију

СПРОВОДНИ ЛИСТ ВИРУСОЛОШКЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

ИДБ							
Број лаб. протокола							
Број историје							
Датум узимања							
Датум пријема							
	АМБ	СТЦ					
Београд							
Унутрашњост							

Одељење - установе која шаље материјал		Потпис лекара	
Презиме и име		Година рођења	
Дијагноза			
Претходна терапија			

Врста анализе		Резултати				Врста анализе		Резултат	
		Серум		Ликвор					Индекс
		IgM	IgG	IgM	IgG				
1.	HIV-1/2						21.	HBs-Ag	
2.	HIV-1, HIV-2, HTLV 1/II						22.	anti-HBs	
3.	HIV Ag (p24)						23.	HBe-Ag	
4.	CMV (Cytomegalovirus)						24.	anti-HBe	
5.	HSV-1 (Herpes-simplex tip 1)						25.	anti-HBc IgM - anti HBc IgM	
6.	HSV-2 (Herpes-simplex tip 2)						26.	anti HBc ukupni	
7.	VZV (Varicella zoster virus)						27.	anti-HAV IgM	
8.	EBV (Epstein-Barr-virus)						28.	anti-HAV ukupni	
9.	Mumps virus						29.	HDV-Ag	
10.	Morbilli virus						30.	anti-HDV IgM	
11.	Rubella virus						31.	anti-HDV ukupni	
12.	Adenovirus						32.	anti-HCV ukupni	
13.	Parainfluenza virus 1						33.	Helicobacter pylori	
14.	Parainfluenza virus 3						34.	Mycoplasma pneumoniae	
15.	Influenza virus tip A						35.	Paul Bunell Davidson	
16.	Influenza virus tip B						36.	Borrelia burgorferi (HA)	
17.	RSV (Respiratory syncytal virus)						37.	ROTALEX, ADENOLEX	
18.	Parovirus B19						38.	Изолација вируса	
19.	Borrelia burgdorferi						39.	Остало	
20.	WESTERN BLOT (HIV-1, HIV-2, HTLV I/II, HCV, Borrelia burgdorferi)	Резултати на полеђини							

Напомена:

КЦС-73-011-5

Потпис и факсимил

Датум издавања



KLINIČKI CENTAR
SRBIJE
CENTAR ZA MEDICINSKU BIOHEMIJU



ХИТНО
БГД АМБ
Ван БГД СТАЦ



УПУТ ЗА ЛАБОРАТОРИЈУ А

Презиме: _____
Име: _____
ЈМБГ: _____
Одељење: _____ Бр. протокола: _____ Шифра дијагнозе: _____
Лекар: _____ Датум: _____

факсимил

потпис

KRV	URIN
060011 ☐ Krvna slika (automat)*	720601 ☐ Fizičko-hemijski pregled
060014 ☐ Leukocitarna formula	720602 ☐ Sediment
060016 ☐ Retikuloцити	720603 ☐ Relativna gustina
060020 ☐ Sedimentacija eritrocita*	720609 ☐ Miogloblin
060061 ☐ Vreme krvarenja	720613 ☐ Melanin
060064 ☐ Protrombinsko vreme (PT)*	720614 ☐ Porfobilinogen
060077 ☐ Parc. tromboplastinsko vreme (PTT)*	720615 ☐ Bence-Jones proteini
060067 ☐ Trombinsko vreme*	720633 ☐ Alfa-amilaza
060110 ☐ Antitrombin III*	
060959 ☐ Plasminogen*	24-časovni urin ili u vremenskom intervalu
060165 ☐ D-dimer*	720651 ☐ Glukoza-kvantitativno
720510 ☐ Fibrinogen*	720652 ☐ Protein-kvantitativno
720151 ☐ Hemoglobin A _{1c} *	720619 ☐ Elektroforeza proteina
720101 ☐ Glukoza	050068 ☐ Imunofiksacija proteina
720102 ☐ Urea	720916 ☐ Albumin
720103 ☐ Kreatinin	720951 ☐ Imunoglobulin G
720104 ☐ Mokraćna kiselina	720953 ☐ Imunoglobulin A
720105 ☐ Bilirubin-ukupan	720952 ☐ Imunoglobulin M
720106 ☐ Bilirubin-direktan	720957 ☐ Transferin
720109 ☐ Ukupni proteini	050188 ☐ Beta ₂ -mikroglobulin
720108 ☐ Albumin	050188 ☐ Alfa ₁ -mikroglobulin
720110 ☐ Holesterol	720653 ☐ Urea
720111 ☐ HDL-holesterol	720654 ☐ Kreatinin
720112 ☐ LDL-holesterol	720655 ☐ Mokraćna kiselina
720113 ☐ Trigliceridi	720656 ☐ Osmolalitet
720911 ☐ Apolipoprotein A ₁	720657 ☐ Natrijum
720916 ☐ Apolipoprotein B	720658 ☐ Kalijum
720656 ☐ Osmolalitet	720132 ☐ Litijum
720657 ☐ Natrijum	720663 ☐ Hloridi
720658 ☐ Kalijum	720662 ☐ Kalcijum
720132 ☐ Litijum	720659 ☐ Neorganski fosfat
720663 ☐ Hloridi	720126 ☐ Ionizovani kalcijum*
720662 ☐ Kalcijum	720127 ☐ Magnezijum*
720659 ☐ Neorganski fosfat	720115 ☐ Laktat*
720126 ☐ Ionizovani kalcijum*	720128 ☐ Gvožđe*
720127 ☐ Magnezijum*	720129 ☐ TIBC
720115 ☐ Laktat*	720976 ☐ Feritin
720128 ☐ Gvožđe*	720130 ☐ Bakar
720129 ☐ TIBC	720131 ☐ Amonijum jona*
720976 ☐ Feritin	720133 ☐ Bikarbonati
720130 ☐ Bakar	720927 ☐ AST (GOT)
720131 ☐ Amonijum jona*	720928 ☐ ALT (GPT)
720133 ☐ Bikarbonati	720929 ☐ Alkalna fosfataza (ALP)
720927 ☐ AST (GOT)	720930 ☐ Gama-GT
720928 ☐ ALT (GPT)	
720929 ☐ Alkalna fosfataza (ALP)	
720930 ☐ Gama-GT	

* Za parametre štampane kurzivom potreban je antikoagulant, konzervans i sl. za koje se treba obratiti laboratoriji.

Медицински техничар

Лабораторијски техничар

Sve analize koje nisu markirane izводе se nefelometrijski

KLINIČKI CENTAR
SRBIJE

**ODELJENJE ZA ENDOKRINOLOŠKU
LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU**

HORMONSKA ISPITIVANJA

LB-

IDB					
BR. PROTOKOLA					
BR. ISTORIJE					
DATUM					

INSTITUT ZA ENDOKRINOLOGIJU, DIJABETES I BOLESTI METABOLIZMA

Prezime i ime				Matični broj	
Dijagnoza				Lekar	
Centar				Referentne vrednosti	
Šifra	Analiza	Vrednost	Jedinica		
550196 ☐	AFP (α_2 -FETOPROTEIN)	RIA	IU/mL		
040030 ☐	β HCG (β HUMANI HORIŖONSKI GONADOTROPIN)		mIU/mL IU/L		
550197 ☐	CEA (KARCINOEMBRIONALNI ANTIGEN)		ng/mL		
550042 ☐	CA 15-3 (KANCER ANTIGEN 15-3)		U/mL		
550035 ☐	CA 125		U/mL		
550034 ☐	CA 19-9 (KARBOHIDRATNI ANTIGEN 19-9)		U/mL		
Napomena:					

KCS 503001

Načelnik laboratorije

**KLINIČKI CENTAR
SRBIJE**

**ODELJENJE ZA ENDOKRINOLOŠKU
LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU**

HORMONSKA ISPITIVANJA

LB.

IOB								
BR. PROTOKOLA								
BR. ISTORIJE								
DATUM								

KLINIKA ZA ENDOKRINOLOGIJU, DIJABETES I BOLESTI METABOLIZMA

KLINIKA ZA ENDOKRINOLOGIJU, DIJABETES I BOLNICI VEŠTAČENJE				Matični broj	
Prezime i ime					
Dijagnoza				Lekar	
Centar		Referentne vrednosti			
Šifra	Analiza	Vrednost	Jedinica		
040037 ☐	T ₄	RIA	nmol/L	55 - 155	
040036 ☐	T ₃		nmol/L	1.2 - 3.0	
040001 ☐	TSH		mIU/L	0.3 - 5.5	
550190 ☐	FT ₄		ng/L	7 - 18	
550191 ☐	FT ₃		ng/L	2 - 4.25	
☐	sTSH		mIU/L	0.27 - 4.2	
550201 ☐	Tg		µg/L	DO 50	
040157 ☐	TG-AB		IU/ml	DO 70	
550202 ☐	TPO-AB		U/ml	DO 130	
040075 ☐	PTH		ng/L	0 - 80	
550194 ☐	NSE	ng/mL	4.7 - 14.7		
040150 ☐	KALCITONIN	RIA	ng/L	0 - 10	
☐	OSTEOKALCIN		ng/mL		
☐	β-Cross Laps		ng/mL		
550200 ☐	TR-AB		U/L	DO 1.5	
720989 ☐	TR ₃ NP		ng/mL		
720512 ☐	PRO-BNP		pg/mL		

Napomena:

Načelnik laboratorije

Spoj odgovarajuće parove



KLINIČKI CENTAR
SRBIJE

ODELJENJE ZA ENDOKRINOLOŠKU
LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU

HORMONSKA
ISPITIVANJA

LB-

IDB									
BR. PROTOKOLA									
BR. ISTORIJE									
DATUM									

KLINIKA ZA ENDOKRINOLOGIJU, DIJABETES I BOLESTI METABOLIZMA

Prezime i ime		Matični broj							
Dijagnoza		Lekar							
Centar		Referentne vrednosti							
Šifra	Analiza	Vrednost	Jedinica	Folikularna faza	Sredina ciklusa	Luteinska faza	Menopauza	Muškarci	
040072	☐ FSH		IU/L	2,5 - 15	12 - 50	2,5 - 15	40 - 200	2,5 - 15	
040033	☐ LH		IU/L	4 - 20	30 - 200	4 - 20	40 - 200	2,5 - 16	
040051	☐ LTH		mIU/L	151,5 - 757,5				121 - 545	
040156	☐ ESTRADIOL		pmol/L	105 - 217	416 - 1399	165 - 788	11 - 50	34 - 226	
040024	☐ PROGESTERON		nmol/L	0,3 - 3,8		7,95 - 92,2		0,3 - 1,9	
	17-OHPROGESTERON		nmol/L	0,303 - 2,42		0,82 - 8,78		0,94 - 6,57	
040050	☐ TESTOSTERON		nmol/L	0,3 - 3,0				8,2 - 34,8	
040077	☐ KORTIZOL		nmol/L	Jutro	131 - 642	Veče	61 - 429		
040074	☐ ACTH		ng/L	10 - 90					
040078	☐ ALDOSTERON		ng/L	Ležeći	42 - 201,5	Stojeći	97 - 626		
040154	☐ PRA		ng/ml/h	Mir	0,2 - 2,8	Napor	1,5 - 5,7		
040073	☐ HGH		mIU/L	0 - 28,5					
040021	☐ DHEA-S		μmol/L	Žene	1,9 - 10,5	Muškarci	5,4 - 9,1		
040032	☐ SHBG		nmol/L	Žene	18 - 87	Muškarci	9 - 54		
040076	☐ INSULIN		mIU/L	5 - 25					
550192	☐ INSULINSKA At		%	<8					
040052	☐ C-PEPTID		nmol/L	0,35 - 1,35					
	☐ HROMOGRANIN-A		ng/mL	19,4 - 98,1					
550198	☐ GASTRIN		mU/L	28 - 185					
	☐ IGF ₁								
040170	☐ ANDROSTENDION		ng/mL	Žene	0,02 - 2,26	Muškarci	0,26 - 2,34		
	☐ GAD-AB		U/mL	<1					
	☐ IA2-AB		U/mL	<1					
Naziv testa									
Vremena									
Analiza									
Napomena:									

Načelnik laboratorije

Spoj odgovarajuće parove



Imunološke i alergološke analize

Klinika za alergologiju i imunologiju / Laboratorija za alergologiju i imunologiju
Beograd, Koste Todorovića 2 / tel. 011 366 1111 / 011 366 1111 / email: kcsimunolab@kcs.rs

Prezime i ime		ID broj	JMBG
Dg.	Klinika / Odeljenje	Lekar	
Sistemske vaskulitise ☐ ANCA ☐ anti GBM ☐ krioglobulini ☐ CRP ☐ MPO-ANCA ☐ PR3-ANCA ☐ ANCA profil		Autoimunske bolesti štitne žlezde ☐ anti-TPO ☐ anti-Tg ☐ anti-TSH receptor	
Nefritički sindrom, RPGN ☐ ANCA ☐ GBM ☐ ANA ☐ ENA Screen ☐ krioglobulini ☐ C3 ☐ C4 ☐ ASTO ☐ ANCA panel ☐ anti C1q ☐ anti-dsDNA ☐ MPO-ANCA ☐ PR3-ANCA		Diabetes mellitus ☐ anti-ICA ☐ anti-GAD ☐ anti-IA2 ☐ anti-insulin	
SLE ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ ENA Screen ☐ C3 ☐ C4 ☐ dsDNA ☐ anti-histon ☐ anti-nukleozom ☐ C1q ☐ C2 ☐ Anti C1q ☐ Krioglobulini ☐ anti-SS-A/SS-B ☐ anti-Sm/RNP ☐ anti-ribosomalni P protein		Adisonova bolest, Gonadalna insuficijencija, Pluriglandularni autoimunski sindromi ☐ anti-adrenalna ☐ anti-ovarijalna ☐ anti-testikularna ☐ anti-paratiroidna ☐ anti-TPO ☐ anti-Tg ☐ APA ☐ anti-GAD ☐ anti-endomizijalna	
Antifosfolipidni sindrom ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ aCL ☐ anti-β2 GP I ☐ VDRL ☐ anti-protrombin		Coeliakia, Dermatitis herpetiformis ☐ anti-endomizijalna IgA/G ☐ IgA ☐ anti-transglutaminazna IgA/G ☐ anti-glijadin IgA/G	
Scleroderma ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ ENA Screen ☐ anti-Scl-70 ☐ anti-fibrilarin ☐ anti-centromera B ☐ anti-PM-Scl ☐ anti-RNA polimeraza		Perniciozna anemija ☐ anti-parijetalna ☐ anti-unutrašnji faktor	
Polimiositis / Dermatomyositis ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ ENA Screen ☐ anti-Jo ☐ anti-Mi ☐ anti-PM-Scl ☐ anti-sintetaze		Inflamatorne bolesti creva ☐ ANCA ☐ ANCA profil ☐ anti-Saccharomyces cerevisiae ☐ CRP	
Mešana bolest vezivnog tkiva ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ ENA Screen ☐ anti-U1 RNP ☐ RF		Opšti imunohemijski deo ☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ CIC ☐ ASTO ☐ CRP ☐ Haptoglobin ☐ α1 antitripsin ☐ RF ☐ C3 ☐ C4	
Nedefinisana bolest vezivnog tkiva ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ ENA Screen		Humoralne imunodeficijencije ☐ IgG ☐ IgA ☐ IgM ☐ IgG 1 ☐ IgG 2 ☐ IgG 3 ☐ IgG 4	
Reumatoidni artritis ☐ anti-keratinski ☐ anti-CCP ☐ RF ☐ ANA ☐ ANCA		Paraneoplastični neurološki sindromi ☐ anti-Yo ☐ anti-Hu ☐ anti-Ri ☐ anti-GAD	
Syndroma Sjögren ☐ ANA ☐ ENA Screen ☐ ANA HEp2 ☐ RF ☐ anti-SS-A ☐ anti-SS-B		Atopijske bolesti ☐ Eozinofili u komori ☐ IgE ukupan ☐ IgE panel alergena ☐ IgE grupa alergena ☐ Specifičan IgE po alergenu	
Primarna bilijarna ciroza ☐ AMA ☐ ANA HEp2 ☐ IgM ☐ AMA-M2 ☐ anti-Sp 100 ☐ anti-Gp 210 ☐ anti-lamin B receptor		Urtikarija i angioedem ☐ C4 ☐ C3 ☐ anti-C1q ☐ C1q ☐ C2 ☐ C1 inhibitor (kvantitativno)	
Autoimunske bolesti ☐ ANA ☐ ANA HEp2 ☐ AGMA ☐ ENA Screen ☐ anti-LKM ☐ ANCA ☐ anti-SLA/LP ☐ anti-LC1 ☐ IgG ☐ Krioglobulini		Kutani vaskulitisi ☐ krioglobulini ☐ anti-C1q ☐ ANA ☐ ENA ☐ ANCA ☐ C3 ☐ C4 ☐ C1q	
Cistična fibroza ☐ ANCA ☐ BPI-ANCA			

LEGENDA ☐ Screening testovi ☐ Analiza se radi nakon pozitivnog screening testa ili dogovora sa lekarom * - Hitne analize (za 24 h)
Sve analize se rade iz uzorka krvi bez antikoagulanasa. Krioglobulini se dostavljaju u laboratoriju na temperaturi od 37°C. Eozinofili u komori se rade iz krvi iz posta.

EIA ☐ IF ☐ Aglutinacija ☐ Nefelometrija/Turbidimetrija ☐ Imunoblot ☐ RID ☐ 12 - 004

Имунолошка лабораторија

Соба 2

Тел 011 206

УНИВЕРЗИТЕТСКА ДЕЧЈА КЛИНИКА

Тиршова 10, Београд



Имунофенотипизација лимфоцита периферне крви

Име и презиме:

Датум рођења:

Шаље:

Упутна дијагноза:

Број леукоцита:

Леукоцитна формула

Неутрофили

%

Еозинофили

%

Лимфоцити

%

Моноцити

%

Анализа извршена на популацији лимфоцита одређеној електронским граничником проточног цитометра на основу бочног расејања светлосног снопа и интензитета експресије молекула CD45.

Лимфоцитне популације (%)

Референтне вредности за узраст 5-10 год.

Б лимфоцити (CD19⁺)

%

10-31%

Т лимфоцити (CD3⁺)

%

55-78%

CD3⁺CD4⁺

%

27-53%

CD3⁺CD8⁺

%

19-34%

CD4 : CD8

0,9-2,6

CD3⁺CD4⁺CD8⁺

%

CD3⁺HLA-DR⁺

%

3-14%

CD3⁺TCRγδ⁺

%

<10%

НК ћелије (CD3⁺CD16⁺/CD56⁺)

%

4-26%

Апсолутни број лимфоцита

Референтна вредност за узраст 5-10 год.

x10⁹/L1,1-5,9 x10⁹/LЛимфоцитне популације (x10⁹/L)

Референтне вредности за узраст 5-10 год.

Б лимфоцити (CD19⁺)

0,2-1,6

Т лимфоцити (CD3⁺)

0,7-4,2

CD3⁺CD4⁺

0,3-2,0

CD3⁺CD8⁺

0,3-1,8

НК ћелије (CD3⁺CD16⁺/CD56⁺)

0,1-0,9

CD3⁺HLA-DR⁺ ћелије

0,05-0,7

ЗАКЉУЧАК

Анализу извршио

Начелник Службе хематологије и онкологије

Датум извођења анализе:

Број лабораторијског протокола:

Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Ime i prezime

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Ime i prezime

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Ime i prezime

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Ime i prezime

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____



Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____

Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____

Rezultat: Samoprocena ☐ Ocena studenta (P2P) ☐ _____ Ocena nastavnika/saradnika ☐ _____

Seminar/Vežba: _____ Ime i prezime _____

Pitanje br: _____ Grupa/Podgrupa: _____ Redni broj u prozivniku: _____

Odgovor: _____

Pitanja o predmetu IMUNOLOGIJA

1. Koju biste ukupnu ocenu dali predmetu i zašto?

Ukupna ocena: 5 6 7 8 9 10

2. Da li ste koristili za ovaj predmet...? (Ako je odgovor Da, ocenite koliko je taj izvor bio dostupan i koristan i dajte komentar kako bi mogao da se unapredi)

A	Zvanični udžbenik	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
B	Priručnik	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
C	Prezentacije	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
D	Video lekcije	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
E	Dodatni materijal koji je postavljen na sajtu fakulteta	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
F	Konsultacije sa nastavnicima	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
G	Pretraživanje interneta	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
H	Neautorizovan materijal iz „Jarca“ (ili drugih kopirnica)	Ne	Da	5	6	7	8	9	10
Komentar:									

3. Kako ocenjujete predmet u odnosu na...? (Molimo za vašu ocenu i komentar)

A	Pokrivenost ispitnih pitanja tokom nastave	5	6	7	8	9	10
B	Izbor tema za predavanja odnosno seminare	5	6	7	8	9	10
C	Brzinu prelaženja pojedinih metodskih jedinica	5	6	7	8	9	10
D	Ravnotežu između predavanja nastavnika i diskusije studenata	5	6	7	8	9	10
E	Davanje obaveštenja o datumima, zahtevima i pravilima predmeta	5	6	7	8	9	10
F	Korist od ulaznih testova za praćenje nastave	5	6	7	8	9	10
G	Korist od pripreme i polaganja kolokvijuma za praćenje nastave	5	6	7	8	9	10
H	Zahteva za angažovanje u pripremi i tokom nastave	5	6	7	8	9	10
I	Razumevanje i praktičnu primenjivost naučenog gradiva	5	6	7	8	9	10
Komentar:							

4. Izdvojte pojedine nastavne jedinice po sledećim kriterijumima: (Unesite odgovarajuće brojeve, pri čemu u svakoj rubrici možete da navedete više nastavnih jedinica)

- 1 Uvod u imunski sistem
- 2 Urođena imunost
- 3 Preuzimanje antigena i prezentacija antigena limfocitima
- 4 Prepoznavanje antigena u stečenoj imunosti
- 5 Celularni imunski odgovor
- 6 Citokini
- 7 Efektorski mehanizmi celularne imunosti
- 8 Humoralni imunski odgovor
- 9 Efektorski mehanizmi humoralne imunosti
- 10 Odbrana od infekcija
- 11 Antigen-antitelo reakcije
- 12 Imunološka tolerancija i autoimunost
- 13 Reakcije preosetljivosti
- 14 Imunski odgovor na tumore
- 15 Imunski odgovor na transplantirana tkiva
- 16 Imunodeficijencije
- 17 Principi imunoprofilakse infektivnih bolesti
- 18 Principi inhibicije imunskog odgovora
- 19 Principi stimulacije imunskog sistema
20. Evaluacije imunskog odgovora

Najteže:

Najlakše:

Najvažnije:

Najnepotrebneije:

Najzanimljivije:

Najdosadnije:

5. Kako biste kod vašeg nastavnika ocenili...? (Molimo za vašu ocenu i komentar)

A	Pripremljenost za nastavu	5	6	7	8	9	10
B	Jasnoću i koherentnost izlaganja	5	6	7	8	9	10
C	Entuzijazam	5	6	7	8	9	10
D	Spremnost da odgovori na pitanja	5	6	7	8	9	10
E	Odnos i ophođenje prema studentima	5	6	7	8	9	10
F	Usmeravanje diskusije	5	6	7	8	9	10
G	Dostupnost van vežbaonice	5	6	7	8	9	10
H	Način dodeljivanja nagradnih bodova	5	6	7	8	9	10
I	Tačnost započinjanja i završavanja predavanja/seminara/vežbi	5	6	7	8	9	10
J	Fleksibilnost u tolerisanju kašnjenja i neispunjavanja zadataka	5	6	7	8	9	10

Pohvala:

Kritika i/ili predlog za poboljšanje:

Ukupna ocena	5	6	7	8	9	10
---------------------	---	---	---	---	---	----

Pitanja o vama:

Pol Ž / M Godina upisa na fakultet_____ Prosek_____ Broj bodova na kolokvijumu_____

6. Dajte približne procenke (pojasnite ako želite):

- A. _____ Koliko često ste pohađali predavanja?
- B. _____ Koliko ste pročitali od predviđenih tekstova?
- C. _____ Koliko često ste bili potpuno spremni tokom nastave?
- D. _____ Koliki udeo vremena u odnosu na preporučeni ste posvetili savlađivanju nastave?

7. Da li ste se osećali slobodnim da postavljate pitanja, učestvujete u diskusijama, izražavate svoje ideje ili neslaganje sa nastavnikom ili grupom? **Ne / Da** (Ako je odgovor Ne, možete li da navedete razlog?)

8. Da li ste uočili neku izuzetnu prednost ili slabost u tome kako je predmet zamišljen i sproveden? **Ne / Da** (Ako je odgovor Da, pojasnite)

9. Sugestije/komentari kako bismo mogli da unapredimo ovaj predmet:

10. Koje pitanje nedostaje u ovoj anketi?