

Sümük iliyində B və T-limfositlərin yetişməsi. Bu prosesin pozğunluğu zamanı yaranan patologiyalar.

1. İmmun sistemin orqanları
2. B-limfositlərin ontogenezi
3. B-limfositlərin xarakteristikası
4. T-limfositlərin ontogenezi
5. T-limfositlərin xarakteristikası
6. B və T-limfositlərin çatışmazlığı ilə bağlı

patologiyalar

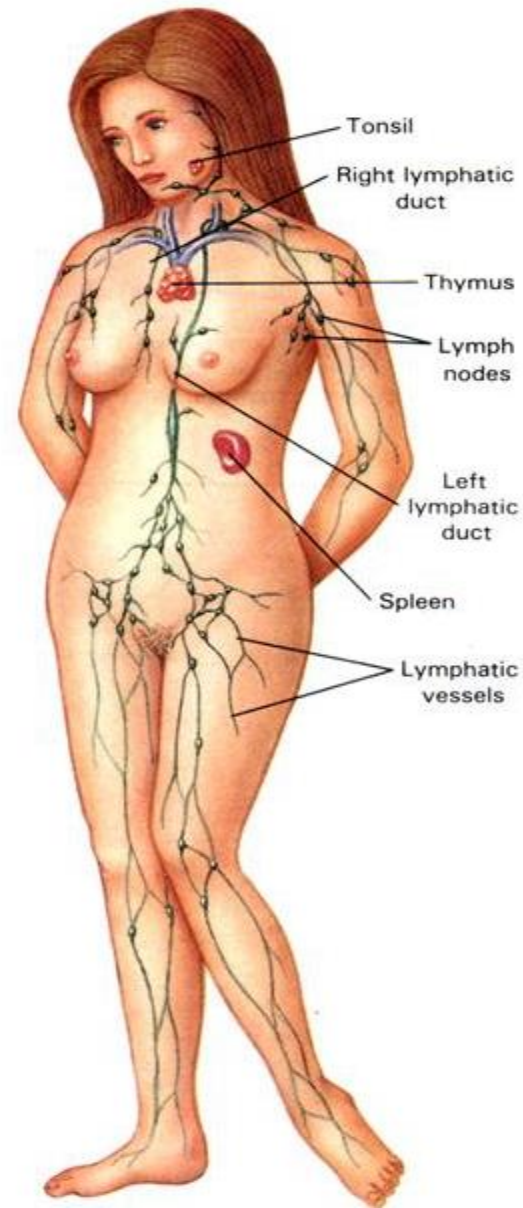
► İmmun sistemin strukturu

► **İmmun sistemi** –bu bütün limfoid orqanların cəmidir və limfoid hüceyrələrdə, timus vəzidə, dalaqda, limfatik düyündə, Peyer yastıqcıqlarında və s. yığılan, immunitetin əsas orqanı olan sümük iliği və periferik qanın limfositlərindən ibarətdir.

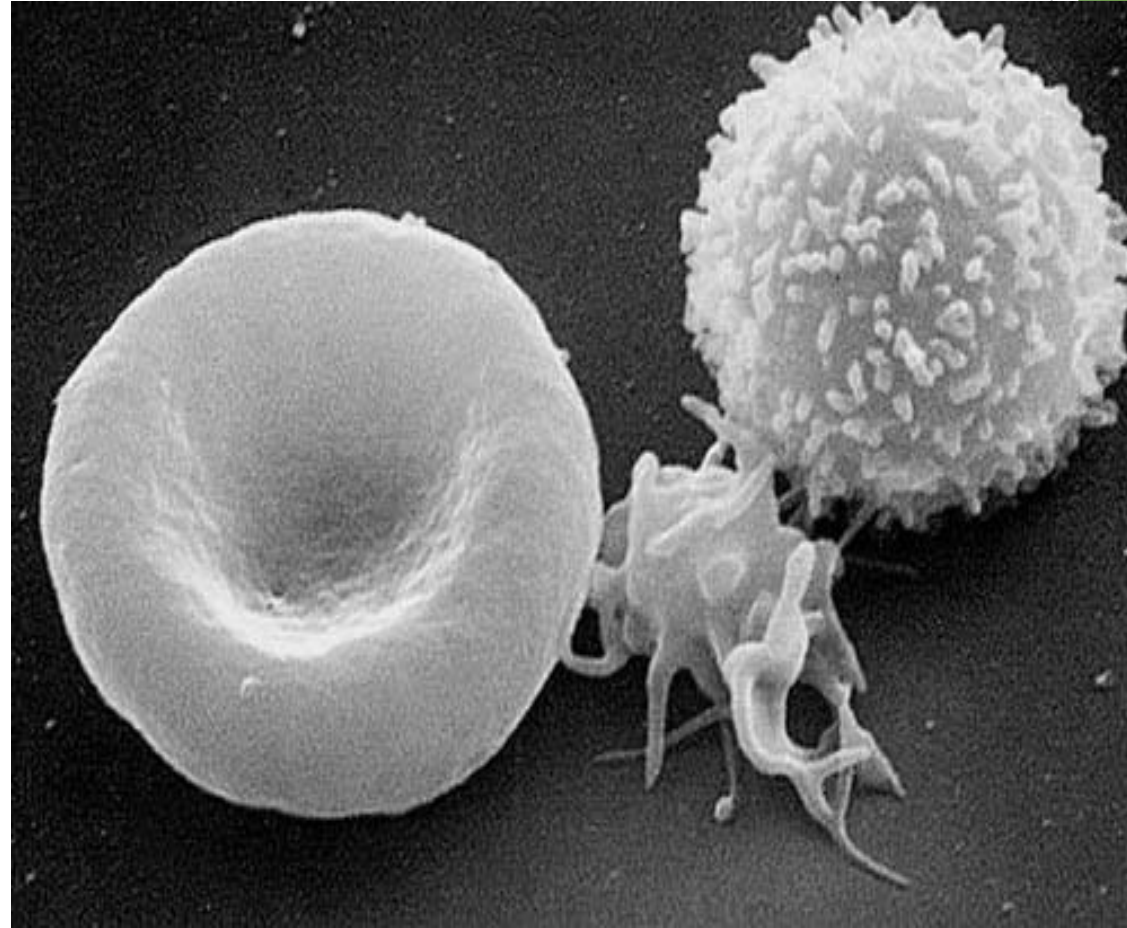
► **İmmun sistemin orqanları mərkəzi və periferik orqanlara bölünür.**

► Mərkəzi orqanları - antigenin təsiri olmadan limfositlərin yarandığı limfopoez orqanları(sümük iliği, timus)

► Periferik orqanları - limfatik düyünlər və dalaq.



Postnatal dövrdə qaraciyər hemopoez və eləcə də limfopoez funksiyalarından tamamilə məhrum olur. Bu dövrdən başlayaraq qanyaradıcı toxumanın polipotent kök hüceyrələri və limfositlərin sələfləri ancaq sümük iliyində əmələ gəlir.

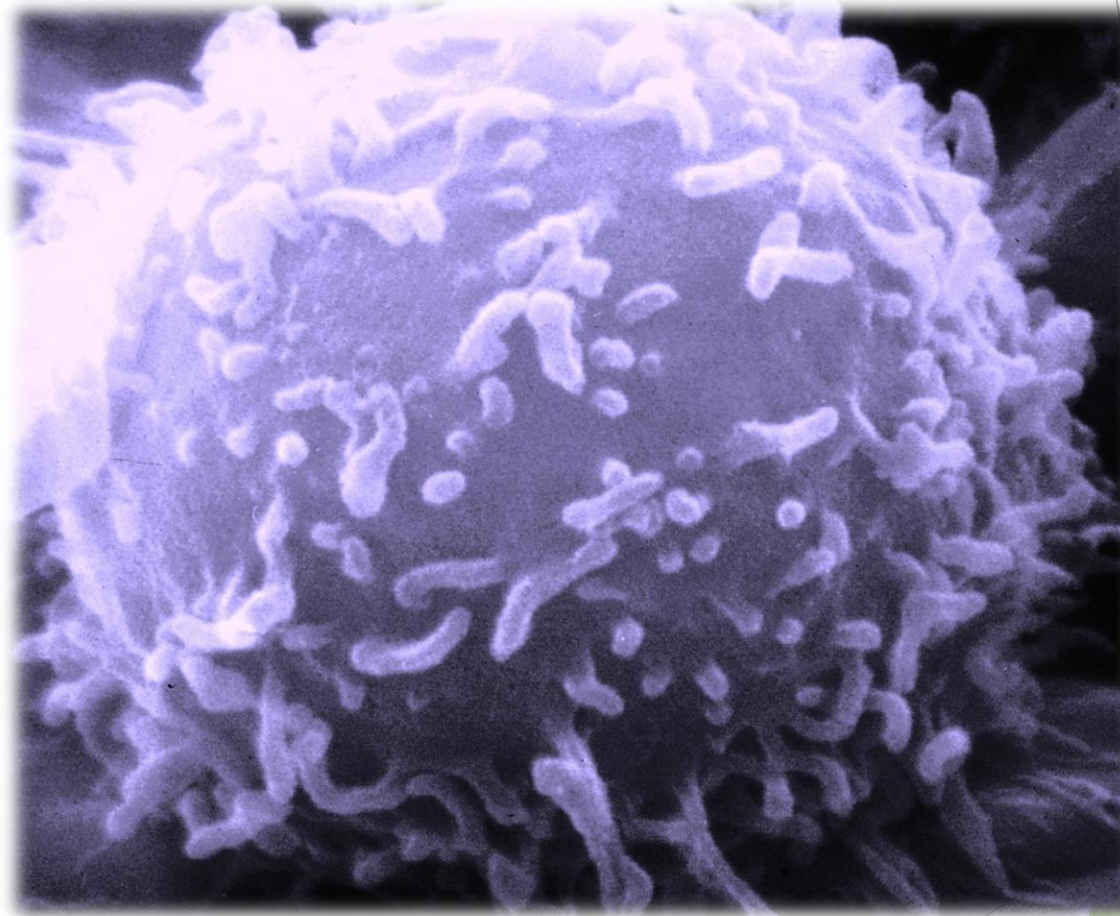


Eritrosit, trombosit və leykosit
Scanning electron microscop



İşıq mikroskopunda rənglənmiş bir limfosit

Limfositlər orqanizmdə spesifik immun reaksiyaların formalaşmasında əsas rol oynayan hüceyrələrdir. Onlar makrofaqlarla birlikdə orqanizmdə genetik yad maddələrin tanınması və eleminasiyası üçün vacib olan immun cavabın əsas fenomenlərini - əkscisimlərin sintezini və sensibilizasiya olunmuş limfositlərin formalaşmasını təmin edirlər.

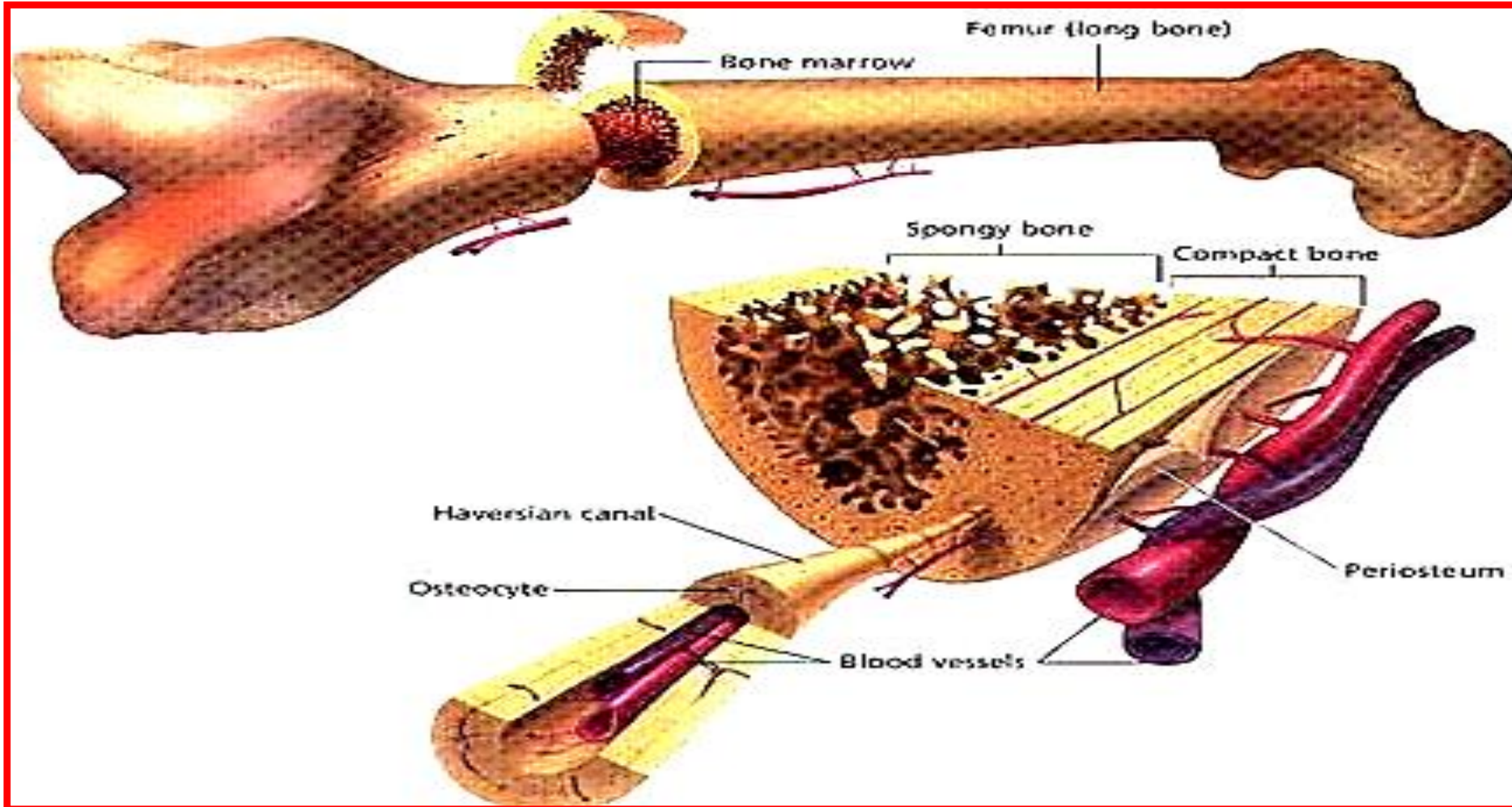


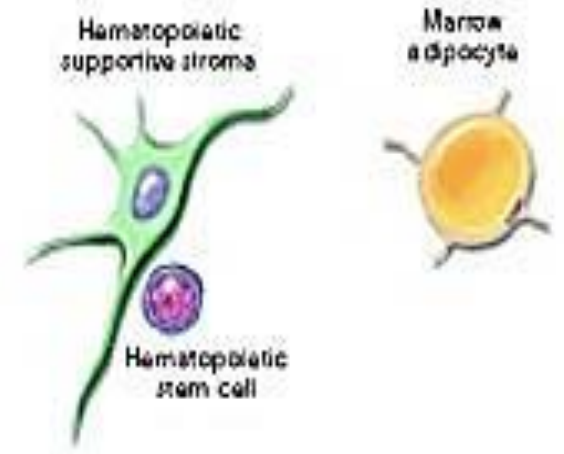
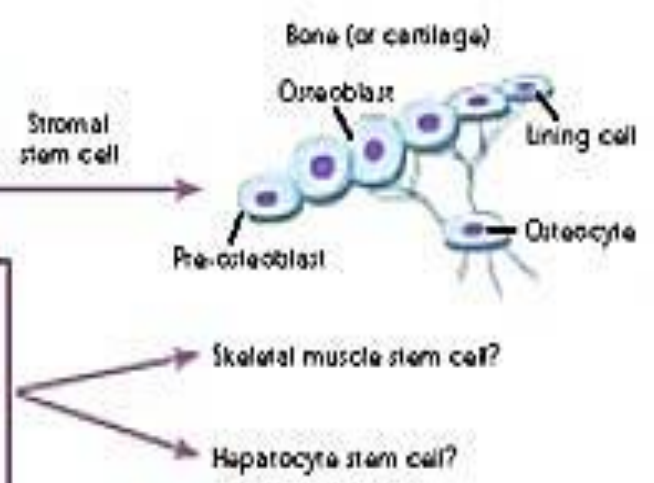
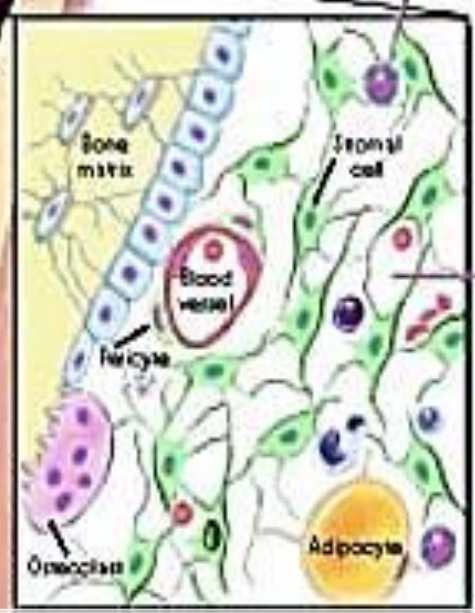
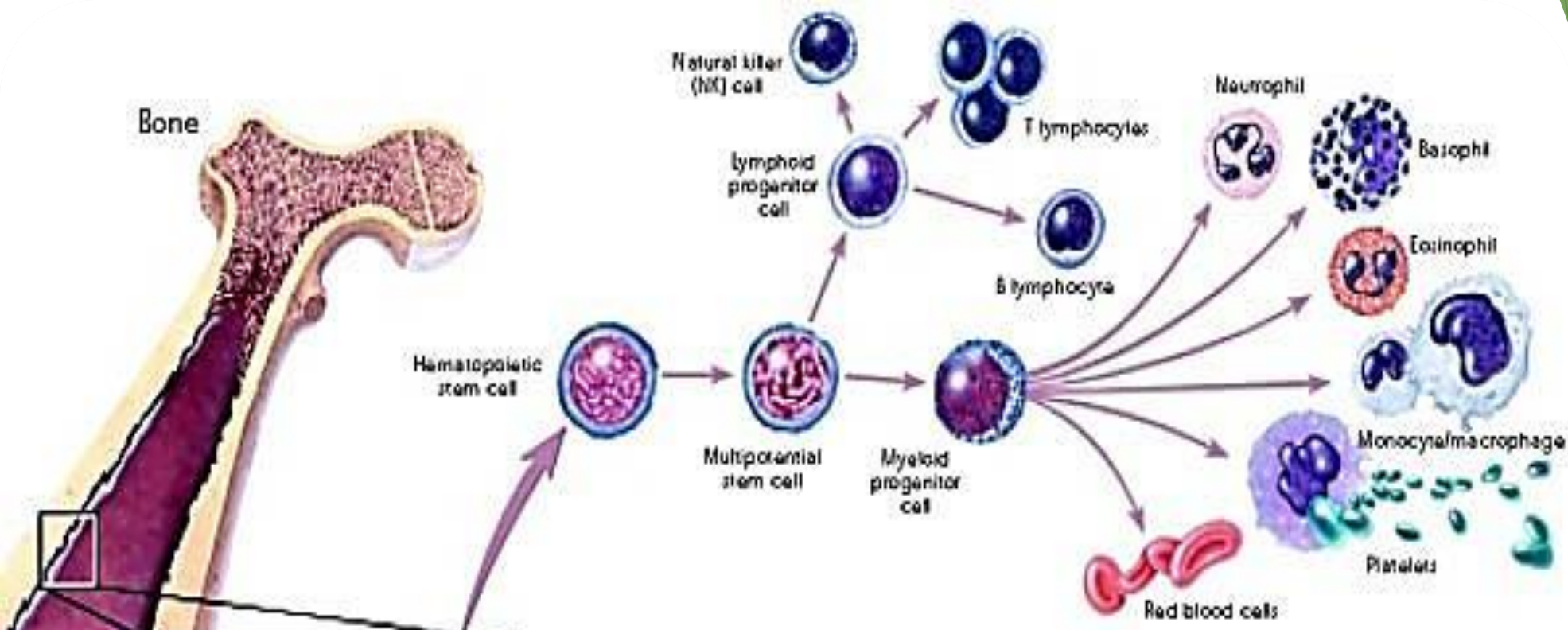
Limfosit.Scanning electron microscope

Qanyaradıcı sütun hüceyrə limfositlərin yetişməsində və onların periferik qana ötürülməsində əsas rol oynayır. Yetişmiş limfositlərin 50-60%-i timusda differensə olub T-limfositə çevrilir, qalan limfositlər isə qanla sümük iliyinə daxil olur və burada 3 növ hüceyrələr yetişir:

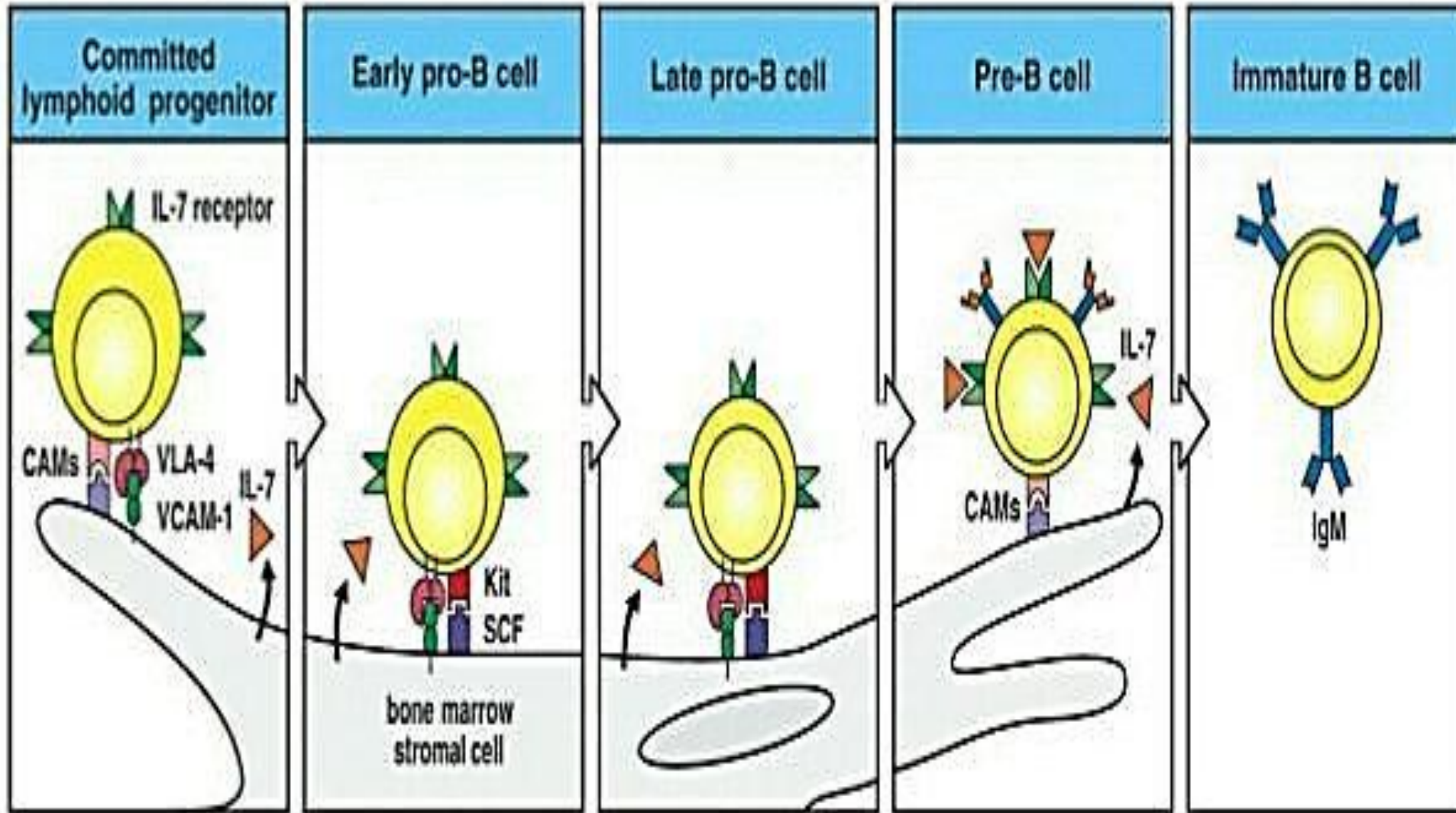
- 1)B-limfosit
- 2)NK-normal killerlər
- 3)DH-dendrit hüceyrələr

Sümük iliği

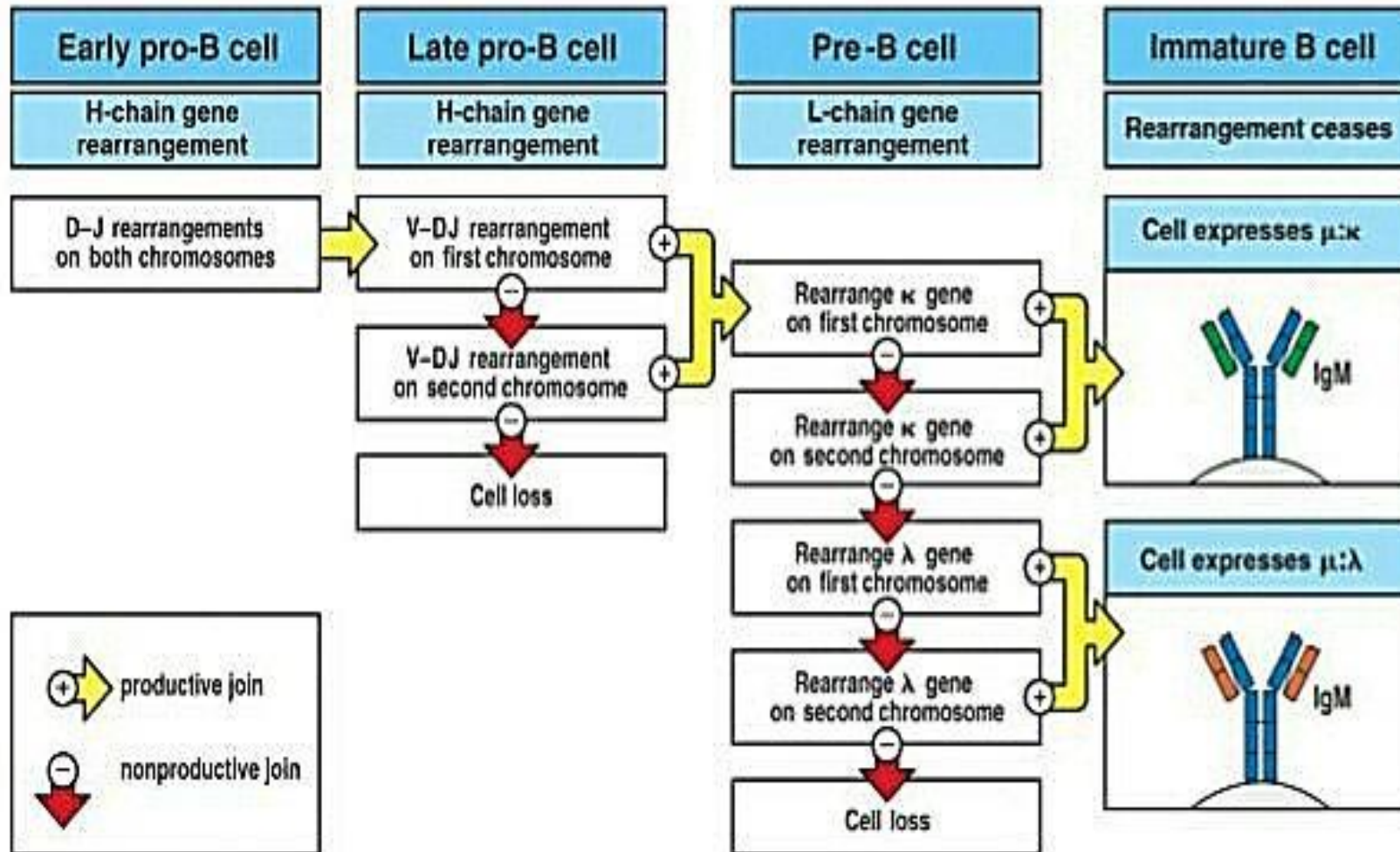




Sümük iliynin stromal hüceyrələri



B hüceyrələrinin inkişafı



B-limfositin ontogenezi

Dölün bətin daxili inkişafının 8-9 həftəsində qaraciyərin hemopatik toxumasında B-limfositlərin inkişaf edəcəyi hüceyrələr müəyyən olunur. Sonrada davamı sümük iliyində başlayır. B-hüceyrələrin burada inkişafı sona çatır və

İki formaya bölünür:

- ***B-limfositlərin antigendənəsaslı differensasiyası*** (sümük iliği) sümük iliyindən çıxdıqdan sonra B-hüceyrələr limfoid orqanların follikullarında: dalaq, udlaq həlqəsi və s. toplanır. Limfa düyününün follikullarında, B-limfositlərdən əlavə dendrit hüceyrələr, makrofaqlar və T-helperlər olur.
- ***B-limfositlərin antigendənəsaslı olmayan differensasiyası*** (immun sistemin periferik orqanları) 1. Antigen stimulyasiyasının təsirindən, bu antigenə həssas B-limfositlər rüşeym follikulunun daxilində və ya follikulyar mərkəzdə formalaşır. Blast tipli iri hüceyrədən ibarətdir-sentroblastlar və geniş nüvəli kiçik hüceyrə-sentrositlər. Antigenin follikulyar mərkəzinə düşən qeyri-həssas limfositlər isə apoptoza uğrayır.

B limfositlərin differensasiyası

B-limfositlər blast şəklində qırmızı sümük iliyyində yaranır, differensasiyası isə limfa düyünlərində və bütün B-limfositlərdən asılı zonalarda (B zonalarda) gedir. Differensasiya bir necə mərhələdə baş verir:

- İmmunoglobulinlərin biosintezini təmin edən molekulyar genetik aparatın inkişafı.
- Gen molekullarının ekspressiyası - hüceyrə daxilində immunoglobulin reseptorlarından siqnalların çatdırılması.
- Genlərin membran molekullarına ekspressiyası - B-limfositlərin digər hüceyrələrlə, xüsusən də T-limfositlər və follikulyar dendrit hüceyrələrlə qarşılıqlı əlaqəsi. Bu molekullara CD40, ƏHK II, CD45 və boy amilləri olan İL-4, İL-2 aiddir.
- B limfositlərin effektiv fəaliyyət göstərmələri üçün membran reseptorları olan CD19, CD20 və CD21 ekspressiyası.

B-hüceyrələrin tipləri

- ▶ **B1-limfositlər** - T-asılı olmayan antigenlərə cavab verir, əksicisimlərin sintezində T-limfositlərin köməyinə ehtiyacı olmur, IgM sinif əksicisimlər sintez. B- hüceyrə yaddaşı əmələ gəlmir.
- ▶ **B2-limfositlər** - isə yalnız T-asılı olan antigenlərə cavab verir, T-limfositlərin köməyi ilə müxtəlif sinif əksicisimlər sintez olunur. B- hüceyrə yaddaşı əmələ gəlir.
- ▶ **B-supressorlar** - bu əksicisimlərin sintezini, effektiv T-limfositlərin funksiyasını tormozlayan yetişməmiş limfositlər kateqoriyasıdır(pre- B). Əsas rast gəlmə yeri –sümük ili yidir.
- ▶ **B helperlər** – onların mitogenlərini aktivləşdirən, T-limfositlərə kömək edir.

B-1 limfositlər

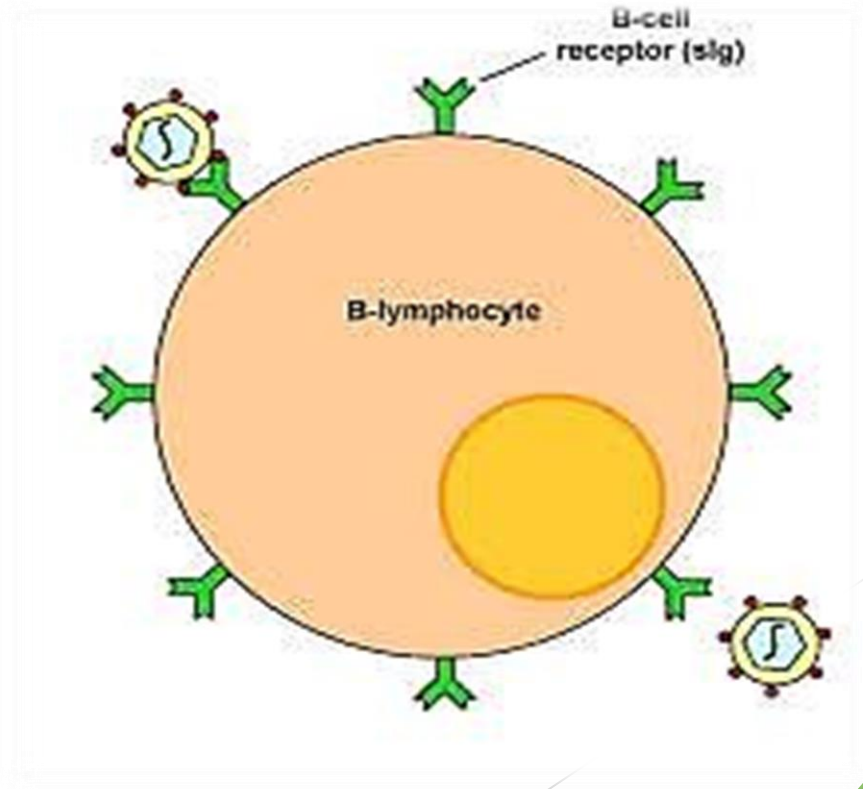
İmmun sistemin filo və ontogenezinə ilkin yaranan B1-limfositlərdir. Onlar dəri və selikli qişalarda yerləşir, əsasən İgM əksicisimləri sintez edirlər.

B-1 limfositlər son zamanlar leykozların diaqnostikasında mühüm rol oynadığına görə daha yaxşı öyrənilməyə başlamışdır. B-1 limfositlərin səthində B-2 limfositlərdə olmayan membran CD5+markeri yerləşir. Bu marker həmçinin T-limfositlər tərəfindən də ekspressiya olunur.

B-1 limfositlər qanyaradıcı toxumadan ayrıldıqdan sonra hələ embrional dövrdən öz anatomik zonaları hesab olunan qarın və plevral boşluqlara yığılırlar. B-1 limfositlər B-2 limfositlərdən antigen tanıtma qabiliyyətinə görə daha üstün sayılır, çünki onların əksicisim sintez etməsi daha intensiv olur.

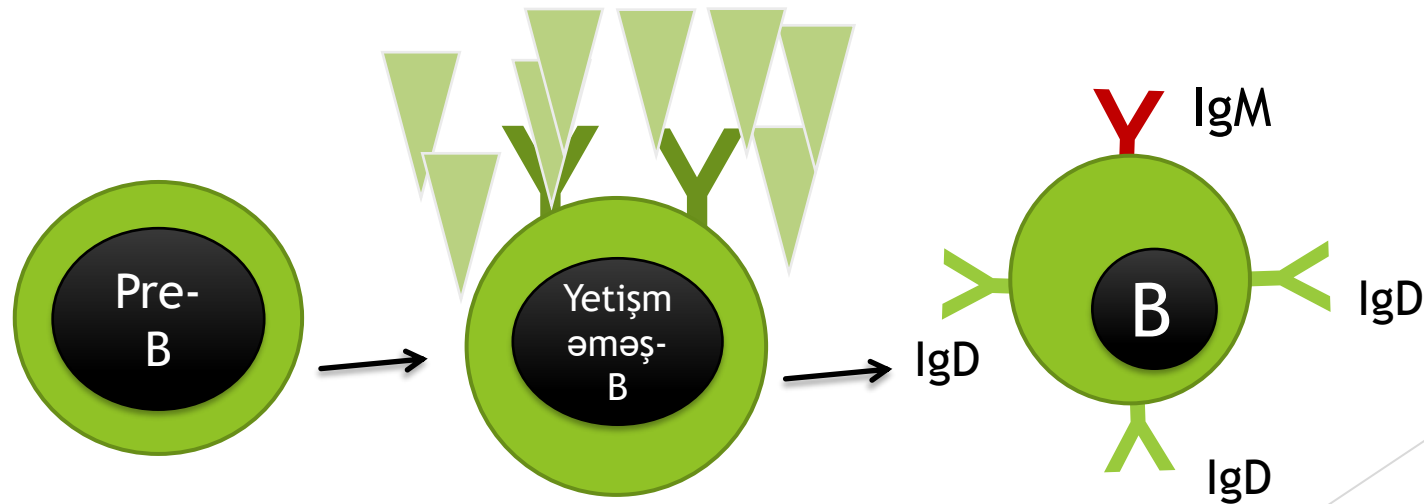
B-2 limfositlər

- ▶ B-2 limfositlərin sintez etdikləri immunqlobulinlər, səthində çoxlu sayda antigen tanıdan molekulları olduğuna görə B-1 limfositlərdən fərqlənirlər. Onlar embriogenezin erkən dövrlərində ilk əvvəl qaraciyərdə, sonra isə sümük iliyində, yetişmə prosesini isə konkret olaraq periferik limfoid orqanların follikullarında həyata keçirirlər.



B2-limfositlər plazmatik hüceyrələrə çevrilərək, müxtəlif sinif əksicimlər sintez edə bilirlər. Onlar tərəfindən sintez olunan immunqlobulinlərin spesifikliyi orqanizmə daxil olmuş AG-in səciyyəvi reseptorlarına müvafiq olur. Plazmatik hüceyrələr İgM, İgA, İgE və İgG sintez edirlər. İgD əksicimciklər adətən B-limfositlərin səthi reseptoru kimi fəaliyyət göstərirlər.

Beləliklə, B-limfositlər sümük iliği və limfoid orqanlarda yetişmə və differensiasiya prosesindən sonra immun səlahiyyətli hüceyrə funksiyasını qazanır.



B-2 limfositlərin limfopoezi

Ümumi polipotent limfoid sələf hüceyrə



Erkən pro B-hüceyrə



Son pro B-hüceyrə



Böyük pro B-hüceyrə



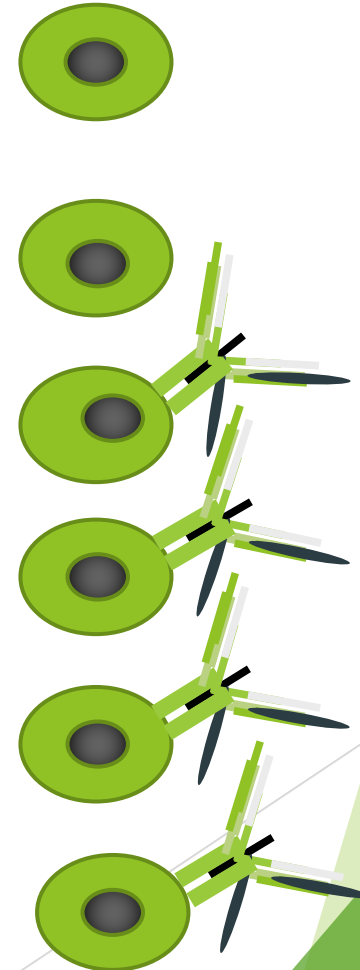
Kiçik pro B-hüceyrə



Yetişməmiş B- hüceyrə



Yetişmiş qeyri immun B hüceyrə



B-limfopoezi-1

► Antigenənasılı diffrensasiya mərhələsi:

1. Antigen stimulyasiyasının təsirindən (antigen follikula qan axını, limfadan düşür və makrofaqa çatır) bu antigenə həssas B-hüceyrə follikulun mərkəzində formalaşır.

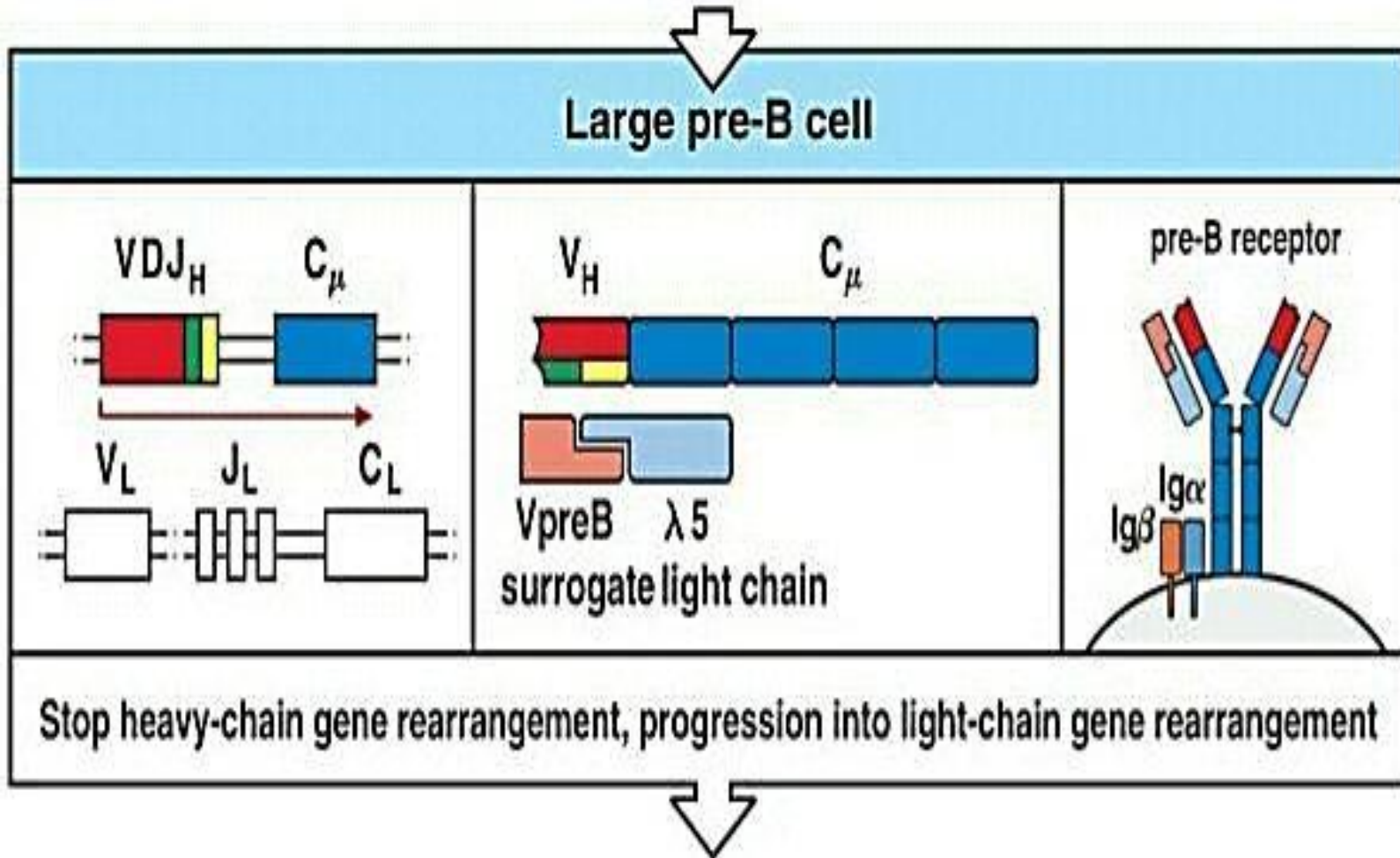
Blast tipli iri hüceyrələrdən-sentroblastlardan və genişlənmiş nüvəyə malik kiçik hüceyrə-sentrositlərdən ibarətdir. Follikulyar mərkəzə düşən antigenə həssas olmayan limfositlər apoptoza uğrayır.

B-limfopoez-2

► Antigendən asılı differensasiya mərhələsi:

2. Sonra follikulyar mərkəzdən sentrisitlər, aktiv proliferasiya edən immunoblastların yarandığı ətrafdakı follikulyar mərkəzin mantin zonasına miqrasiya edir.

3. İmmunoblastların bölünməsi nəticəsində mantin zonada saxlanan plazmatik hüceyrə və yaddaş hüceyrəsi əmələ gəlir. Plazmatik hüceyrələrin çox hissəsi əksicismlərin əmələ gəlməsini yerinə yetirdiyi sümük iliyində yerləşir.

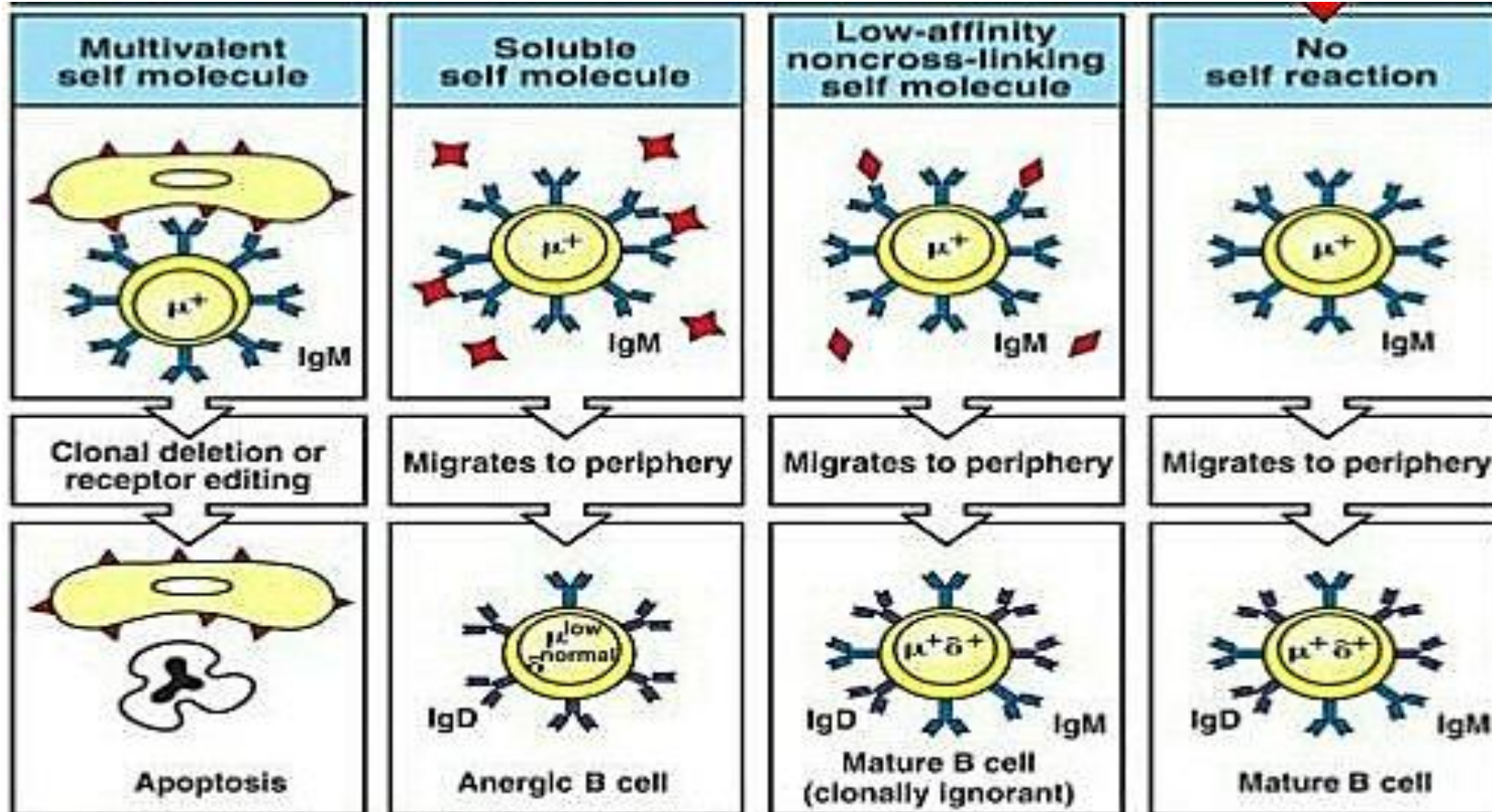


Ağır zəncirin genlərinin reoranjimanı dayanır, yüngül zəncirin genlərinin reoranjimanı proqressiya edir

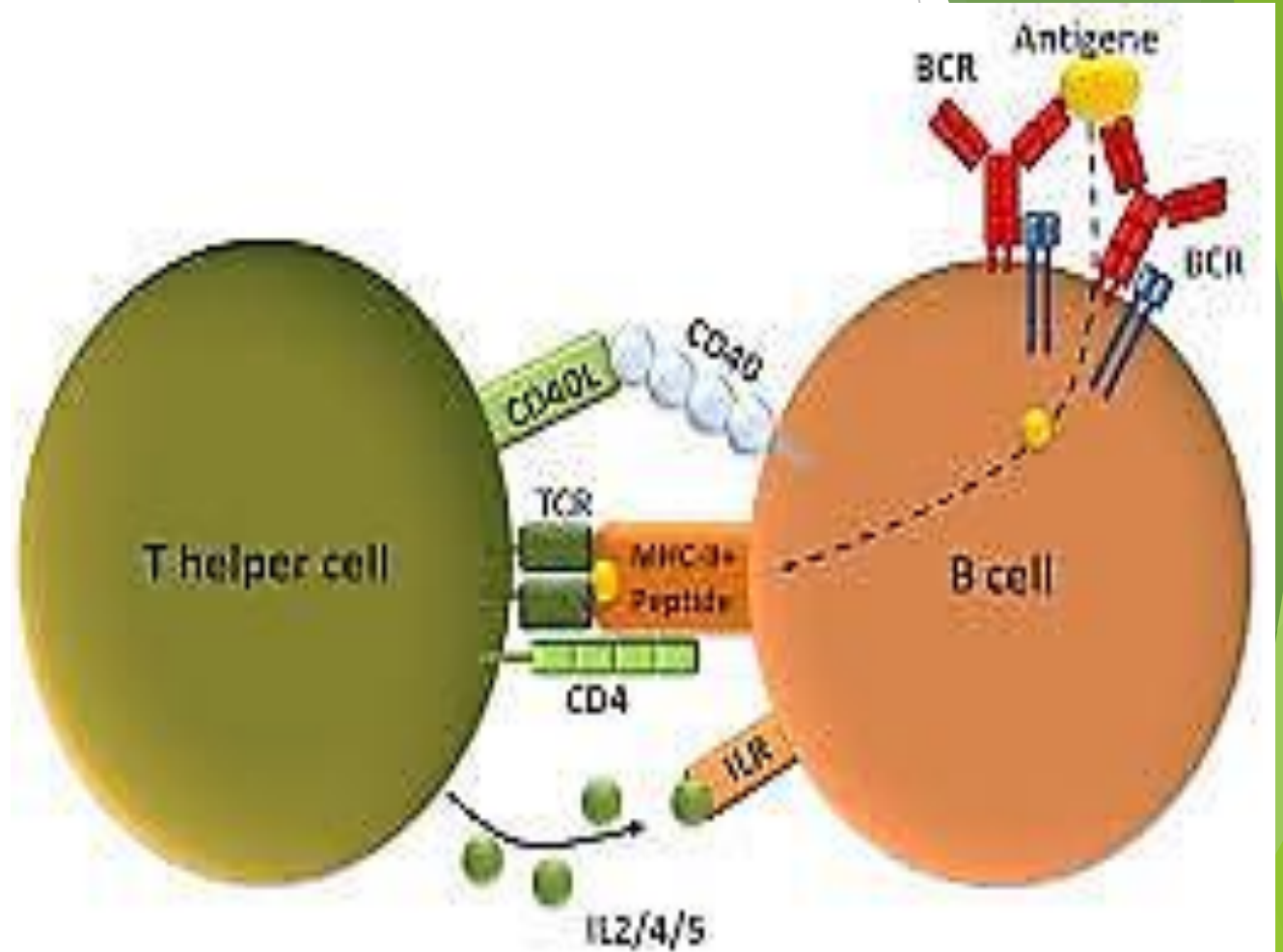
Yetişməmiş B hüceyrələrinin inaktivasiya və delesiyası



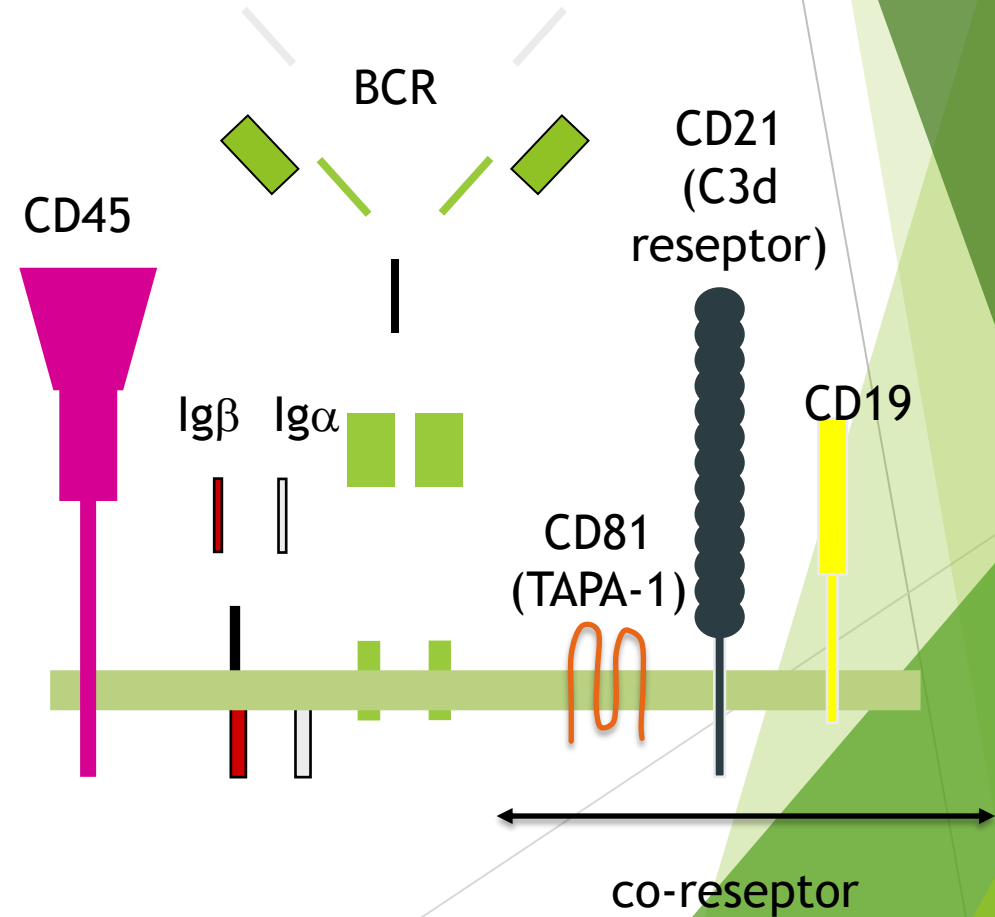
Yetişməmiş B hüceyrələr (sümük iliində)



Yetkin B limfosit mərhələsində əlavə olaraq hüceyrə səthində İgD molekulları ekspressiya olunurlar. Sonuncu hüceyrələrin səthində 50000-dən 100000-ə qədər İgM və İgD molekulları aşkar edilirlər. Qeyd etmək lazımdır ki, B limfosit reseptoru(BCR) dedikdə əsasən İgM molekulu nəzərdə tutulur. Bununla da B limfosit reseptorunun immunoqlobulin olması ilə digər limfositlərdən fərqlənir. Ancaq söhbət gedən reseptor vasitəsilə qəbul olunmuş siqnallar İgM molekulu ilə sıx əlaqədə olan İgα\İgβ vasitəsi ilə həyata keçirildiyindən göstərilən heterodimerlər BCR kompleksinə daxil edilirlər.



Qırmızı sümük iliyindən qan dövrənə daxil olan yetkin B limfositlər hələ qeyri-aktiv vəziyyətdə olurlar. Onların aktivləşməsi üçün vacib şərtlərdən biri, digər antigen-təqdim edən hüceyrələrdə olduğu kimi, ko-stimulyator rolunu oynayan CD40 molekullarının hüceyrə səthində ekspressiya olunmasıdır – ikinci siqnalın Th-rə çatdırılması üçün.



B hüceyrələri həyat tsikli

Sümük iliində B hüceyrələrin generasiyası



**Sümük iliində öz-özünə reaktivləşən B hüceyrələrin
eliminasiyası**



**İkincili limfoid toxumada B hüceyrələrin xarici antigenlər
tərəfindən aktivləşməsi**



**İkincili limfoid toxumada antitel sekresiya edən plazma və
yaddaş B hüceyrələrinə differensasiya**

B-limfositlərin fenotipləri

- **BCR**
- **CD19** – IgM yaranmasından əvvəl ekspressiya edən B-hüceyrələrin erkən markeridir.
- **CD20** – differensasiyanın gecikmiş zamanı ilə xarakterizə olunan B-hüceyrə markeri.
- **CD21** – Komplementin C3 komponenti və Epişteyn-Barr virusu üçün reseptor.
- **CD22** – Yetişmiş B-hüceyrə markeri.
- **CD23** – IgE üçün reseptor
- **CD40** – plazmatik hüceyrənin aktivləşməsi və differensasiyası nəticəsində. B-hüceyrənin T-limfositlərlə əlaqə yaradan reseptoru(CD40L liqandsı vasitəsilə).
- **MHC II sinif antigenlər**

B-hüceyrə tanıyıcı reseptor (BCR)

CD19 və CD20 kompleksində IgD və IgM membran formasından ibarətdir.

BCR funksiyaları:

- ✓ ATH-lə B-limfositlərin yetişməsi və proliferasiyası, aktivləşməsi antigenlə əlaqəsi.
- ✓ Hüceyrə daxilində antigenin endositozu, antigenin təkrarlanması, B-hüceyrənin səhtinə MHC II sinif molekulunun əvəzinə təkrarlanan antigen zülalının qayıtması.

Nəticə

Sümük iliği

B hüceyrələr yığımı açılır. Tolerantlıq induksiya edir.



Qan və ikincili limfoid toxuma

Əlavə tolerantlıq induksiyası. Özünə tolerant yetişməmiş B hüceyrələr və anergeziya etmiş B hüceyrələr.



Qeyri-positiv seçki: B hüceyrələrinin limfoid follikulalara daxil olması baş tutmur.

B hüceyrələrin 3 günlük müddətli yarım həyatları qalır.



Positiv seçki: B hüceyrələrinin limfoid follikulalara daxil olması uğurla baş tutur
Uzun müddət yaşamış yetişmiş təkrar dövriyyə edən saf B hüceyrələr (yarım həyatları 3-8 həftədir)



Antigenlər tərəfindən stimulyasiyası

Uzun müddət yaşamış yetişmiş yaddaş B hüceyrələri. Yüksək affinlikli İgG, İgA və ya İgE -ə ekspressiya edir.

B-limfositlərin immun sistemdə rolu

B-limfositlər orqanizmə düşmüş yad antigenlərin təsiri nəticəsində differensasiya edir ki, bu da onun bölünməsinə səbəb olur. O əvvəlcə öz əvvəlki sayını bərpa edir, yaranan digər B-limfositlər isə antigen əsasında yaddaş hüceyrələrinə çevrilir (B-yaddaş hüceyrələri) ki, bu da eyni antigenlə növbəti qarşılaşma zamanı daha tez cavab reaksiyasının törənməsinə kömək edir. Bir qrup hüceyrələr isə plazmatik hüceyrələrə çevrilirlər ki, bu plazmatik hüceyrələr antigenə qarşı əksicim sintez edirlər.

Həmin əksicimlərin sayı kifayət qədər olduqda plazmatik hüceyrələr əksicim sintez etmə prosesini dayandırır, bir müddətdən sonra isə məhv olurlar. Yaranan əksicimlər antigenlərlə birləşərək antigen-əksicim kompleksinin yaranmasına səbəb olurlar. B-limfositlərin belə aktivləşməsinə səbəb makrofaqın antigeni prezentasiya etməsi və interleykin-1 adlanan sitokini sintez etməsidir. Eyni zamanda B-limfositlərin proliferasiyasının T-helper hüceyrələrinin təsiri də vardır ki, bu da T-helper hüceyrəsinin interleykin (İL-4, İL-5 və İL-6) ifraz etməsidir.

B-limfosit sisteminin patologiyası

- B-limfositlərin anadangəlmə çatmamazlığı-Birincili immun çatışmazlıqlar (Bruton sindromu, IgA-nın selektiv defisiti, yenidoğulmuşların hipoqammaqlobunemiyası və s.)
- Leykoz və limfomanın yaranması ilə B-hüceyrənin nəzarətsiz proliferasiyası və bədxassəli transformasiyası(sümük iliyyədə plazmatik hüceyrə klonunun proliferasiyası, monoklonal Ig sekresiyası).
- B-hüceyrə infeksiyalaşması (Epişteyin-Barr virusu).
- B-limfositlərin aktivləşməsi (autoimmun xəstəliklər).
- IgE sintez edən B-limfosit klonlarının aktivləşməsi(allergik xəstəliklər).
- Humoral tipli ikincili immun çatışmazlıq.

Bruton xəstəliyi

Bu xəstəlik yalnız oğlanlarda rast gəlinir. Xəstəlik anadan övladına X defektli xromosom daşıyan genlə resessiv yolla keçir. Bu Xq22 gen B-limfositlərin yetişməsində iştirak edir. İlk yaşlardan uşaqlarda qram(+) və qram(-) infeksiyalar, irinli dəri infeksiyaları, tənəffüs və bağırsaq infeksiyaları, sepsis, meningit və parazitər xəstəliklərinə tutulma halları təkrarlanır. Aktiv vaksinasıya aparıldıqda, uşaqlarda uzun müddət selikli qısa ifrazatlarında virulentliyini qorumuş törədici müəyyən edilir.

Limfoid toxumanın böyüməsi müəyyən edilmir, limfa düyünlərinin histoloji müayinəsində rüşeym mərkəzlərinin və plazmatik hüceyrələrin azlığı qeyd olunur.

İmmunoqrammada: periferik qanda B-limfositlər tapılmır, sümük iliyində isə İgM-reseptorlu yetişməmiş B-limfositlər olur. Qan zərdabında İgM və İgA əksicisimcikləri olmur, İgG-nin miqdarı 5-10 dəfə azalır(40-100q/l). T-limfositlərin sayı və funksiyası adətən normal olur. Diaqnoz 3-4 yaşlarında qoyulur və xəstələr 20-25 il yaşayır, yanaşı infeksiyadan tələf olurlar.

Yenidoğulmuşlarda tranzitor immun çatışmazlığı

Uşaqlarda həyatlarının ilk illərində immun sistemin natamam inkişafı erkən yaşlarda fizioloji immundefisit vəziyyət yaradır. Yenidoğulmuşlarda qan zərdabında anadan plasenta vasitəsilə keçən İgG əksicisimləri 90% təşkil edir, öz immun sistemi isə yalnız 10% İgG sintez edir. Beləliklə, yenidoğulmuş uşaqların immun müdafiəsi ananın zərdabda dövr edən İgG və bətdaxili dövrün 6-7-ci ayından sintezi başlayan İgM əksicisimləri ilə yerinə yetirilir. Həyatın ilk 3 ayı ərzində anadan keçən İgG əksicisimləri təbii parçalanma prosesinə uğrayır, postnatal dövrdə İgG sintezi isə tədricən başlayır. Bu səbəbdən məhz 3-4 aylıq uşaqlarda İgG səviyyəsi kəskin azalmış olur və uşaqların infeksiyaya müqaviməti olmur.

Yenidoğulmuşun immun sisteminin normal inkişafında tərkibində qida elementləri, kininlər və hormonlar olan ana südünün rolu çox böyükdür. Bu komponentlərə prolaktin də daxildir. Dölün bir çox immunokompetent hüceyrələrində prolaktinə qarşı reseptor var. Prolaktinin bu reseptorla qarşılıqlı təsiri effektor hüceyrələrin aktivləşməsinə, limfositlərin yetişməsinə və funksiyasının güclənməsinə səbəb olur. Bu dövrdə ananın qida rasionunda vitaminlərin, mineral maddələrin, mikroelementlərin və antioksidantların çatışmaması yenidoğulmuşun immun sisteminin inkişafının pozulması ilə nəticələnə bilər.



B limfositlərin qanda təyini

Rozet əmələgətirmə, axın sitometriya və immunoflüoresensiya üsulları



B limfositlərin təyini

B limfositləri aşkarlamaq məqsədilə aşağıdakı metodlardan istifadə edilir:

- ▶ əkscisim və komplementlə işlənmiş eritrositlərlə rozet əmələgətirmə (EAC)
- ▶ siçan eritrositləri ilə spontan rozet əmələgətirmə
- ▶ monoklonal əkscisimlərlə axın sitometriya,
- ▶ monoklonal əkscisimlərlə fluoressensiya

Qanın götürülmə texnikası

- ▶ Periferik qan xəstədən səhər, ac qarına götürülmüşdür. Prosedurun əvvəlində əllər yumulmuş və antiseptik məhlulla işlənmişdir. Punksiya olunacaq nahiyə steriləşdirilərək xəstədən 2 ml qan alınır.
- ▶ Qanın laxtalanmaması və formalı elementlərinin təyini üçün antikoagulyant tərkibli (EDTA tərkibli) sınaq şüşəsinə 2 ml venoz qan əlavə olunur. Bu qandan qanın ümumi müayinəsi, limfositlərin fenotipləşməsi üçün istifadə edilir.



Aktiv limfositlərin təyini

- ▶ Heparinli qan plazmanın ayrılmasına qədər otaq temperaturunda saxlanılır. Götürülmüş qan 1 gün ərzində işlənilməlidir.
- ▶ 1:2 nisbətində (2ml:4 ml) uroqrafinin üzərinə plazma ehmalca, qat şəklində əlavə olunur.
- ▶ 20-25 dəq. 1500 dövr/dəqiqə sürətində sentrifuqada fırladılır.
- ▶ Əmələ gəlmiş ağ rəngli limfosit halqası pipetlə götürülüb digər sınaq şüşəsinə tökülür.
- ▶ Üzərinə 5 ml 0,9% NaCl əlavə edilib 10 dəq. 1500 dövr/dəq. sürətində sentrifuqada fırladılır.
- ▶ Üst hissə pipet vasitəsilə 2 ml maye saxlanılmaq şərti ilə götürülür.
- ▶ Proses 3 dəfə təkrarlanır.
- ▶ Axırncı yumadan sonra sınaq şüşəsində təqribən 0,5 ml (500 mkl) maye saxlanılır.
- ▶ Pipet ilə qarışdırılıb Qoryayev kamerasında leykositlərin sayılma qaydası ilə sayılır.



Əkscisim və komplementlə yüklənmiş eritrositlərlə rozet əmələgətirmə (EAC)

- ▶ B limfositlərin səthində onu T limfositdən fərqləndirən İgM reseptoru, komplementin C3 komponentinə və İgG-nin Fc fragmentinə qarşı reseptorlar var. bu xassədən istifadə etməklə Adətən əkscisim və komplementlə işlənmiş qoyun eritrositlərilə rozet əmələgətirmə (EAC) metodundan istifadə olunur. Bu zaman eritrositlər B limfositin C3 və Fc reseptorunu təyin edir.

Antizərdabın alınması

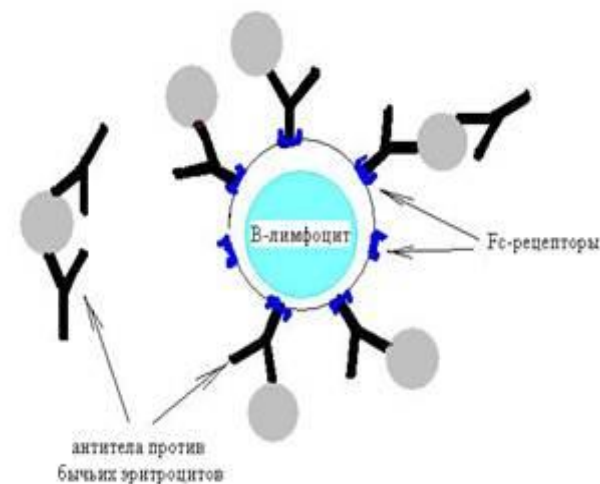
- ▶ Tərkibində eritrositlərə qarşı əksicisim olan antizərdab dovşanın buzov və ya qoyun eritrositləri ilə immunizasiyasından alınır. Bu məqsədlə 3-5 ml 50 % -li eritrosit kütləsi dovşanın qulaq venasından yeridilir. 4-6-cı gün dovşandan qan alınır, zərdab əldə edilir. Çünki, bu zaman əsasən İgM-in yüksək titri olan immun cavab formalaşır.
- ▶ Antizərdab inaktivləşdirilir və onun hemolitik və aqlütinasiya titri təyin edilir.
- ▶ Dovşanın hazır olan belə hemolitik zərdabını istifadə etmək olar.

Hemolitik sistemin hazırlanması

- ▶ Komplement kimi siçan zərdabından istifadə edilir. Damazlıq siçanların başları kəsilərək qanını sınaq şüşəsinə (s/ş) töküb, zərdab əldə edilir. Sonra insan eritrositləri ilə qarışdıraraq hemolitik sistemdə komplementin aktivliyi təyin edilir.
- ▶ Беспородных мышей декапитируют, кровь сливают в пробирку, получают сыворотку, которую затем сорбируют пулом человеческих эритроцитов и определяют активность комплемента в гемолитической системе.

Eritrositlərin sensibilizasiyası

- ▶ Bərabər miqdarda qoyun eritrositləri (1%) ilə subaqlütinasiya durulaşmasında istifadə edilən antizərdab (və ya dovşanın hemolitik zərdabı) qarışdırılır.
- ▶ Qarışıq 40 dəq. 37°C temperaturda inkubasiya edilir. Hər 10 dəq.-dən bir ehmalca qarışdırılır.
- ▶ 3 dəfə fosfat buferi ilə yuyulur, belə ki, 1500 dövr/dəq. 10 dəq. fırlat.
- ▶ Üst hissə atılır, qalan hissəyə əvvəlki miqdarda fosfat buferi və 1:10 nisbtində durulaşmış, tərkibində komplement olan siçan zərdabı əlavə edilir.
- ▶ Qarışıq 30 dəq. 37°C temperaturda inkubasiya edilir.
- ▶ Eritrositlər yenidən 3 dəfə yuyulur. Eritrositlərin aqlütinasiyası olmasın deyə 1000 dövr/dəq.də 5 dəq. fırladılır.
- ▶ 0,5%-li eritrosit suspenziyası hazırlayıb mikroskopda baxılır. (Əgər aqlütinasiya baş veribsə istifadəyə yararsızdır.)
- ▶ Əksicim və komplementlə yüklənmiş eritrositləri (EAC) 4-5 gün soyuducuda (4 °C) saxlamaq olar.



EAC limfositlərin təyin edilməsi

- ▶ 0,1 ml limfosit kütləsinə 0,1 ml sensibilizə olunmuş eritrosit əlavə edilir. Bu nisbətin ən uyğun variantı 20:1 dir.
- ▶ Qarışıq 30 dəq. 37°C temperaturda inkubasiya edilir.
- ▶ İnkubasiyadan sonra s/ş dərhal buzun içinə qoyulur.
- ▶ B limfositlər hesablanır.

Spontan rozet əmələgətirmə üsulu

- ▶ Limfosit populyasiyasınınin tədqiqi zamanı kifayət qədər informativ hesab edilən, klinik olaraq geniş istifadə olunan və daha ucuz başa gələn metod rozet əmələgətirmə üsuludur.
- ▶ Bu zaman B limfositlərin səthi antigenlərinin siçan eritrositləri ilə əlaqəyə girərək rozet əmələgətirmə xüsusiyyətindən istifadə edilir.

Lazım olan reaktivlər:

1. Teofilin məhlulu

- ▶ 10 mq quru teofilin+5,55 ml fizioloji məhlulla qarışdırıb, 20 dəq. 37⁰C-də termostatda saxlayırıq.

2. Qlütar aldehid (q.a.) məhlulu

- ▶ 0,1 ml q.a.+4,1 ml fizioloji məhlul

3. Veroqrafın məhlulu 36%-li

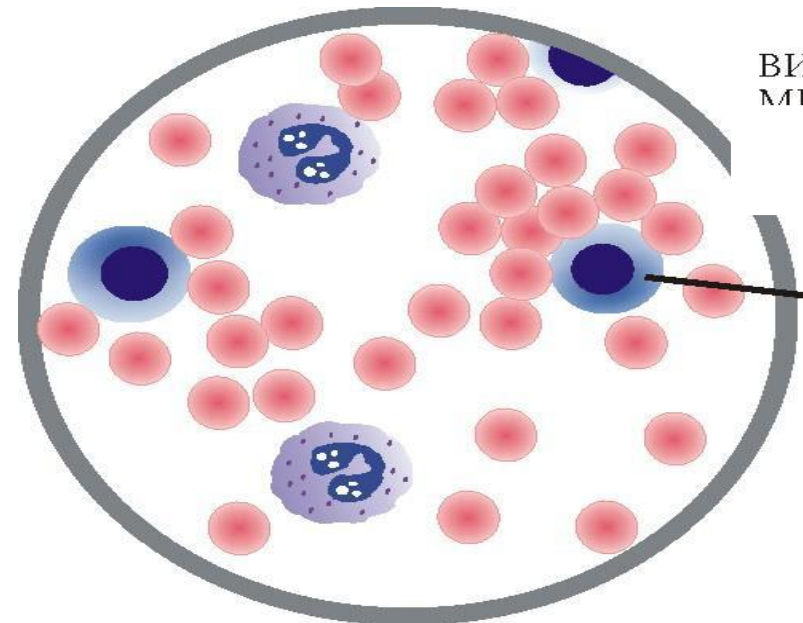
- ▶ 76%-li veroqrafından 20 ml + 21 ml dist.suyu
- ▶ 60%-li veroqrafından 20 ml + 16,57 ml dist.suyu

4. Fekol+Veroqrafın məhlulu

- ▶ 6300 mq quru fekol (əgər daşlaşmışsa 6500 mq) + 70ml qızdırılmış distillə suyu + 2,9 ml (36%-li) veroqrafın

Mərhələlər:

1. Siçan eritrositi asılqanının hazırlanması
2. İnsanın limfosit kütləsinin alınması
3. Rozetin əmələlə gəlməsi
4. Əşya şüşəsində yaxmanın hazırlanması
5. B limfositlərin mikroskopda hesablanması



Siçan eritrositi asılqanının hazırlanması:

- ▶ Ağ siçandan alınmış qan 2,7%-li E.D.T.A və ya 3,8%-li Na sitrat məhlulu ilə qarışdırılır ki, qan laxtalanmasın.
- ▶ Siçan eritrositləri reaksiyada işləmək məqsədilə fizioloji məhlulla yuyulur. Bunun üçün 0,5 ml siçan qanının üzərinə 1 ml fizioloji məhlul əlavə edilir, 5-10 dəq. müddətində 1500-2000 dövr/dəq sürətilə sentrifuqada fırladılır. Üst hissə atılır. Sınaq şüşəsində qalan qanın üzərinə fizioloji məhlul əlavə edilərək yenidən yuyulur. Proses 3 dəfə təkrarlanır.

İnsanın limfosit kütləsinin alınması

2 ədəd sınaq şüşəsi götürülür:

- ▶ I s/ş-1 ml fiz.məh.+1 ml heparinli qan
- ▶ II s/ş- 0,5 ml fekol+0,5 ml I s/ş-dən qan (şüşənin divarı ilə təbəqələşdirilir).
- ▶ 5 dəq. 1500 dövr/dəq sürətilə sentrifuqada fırladıırıq. Ağ halqa (**limfosit kütləsi**) əmələ gəlir.
- ▶ Üst hissə atılır. Ağ halqa ehmalca digər s/ş-nə tökülür + 2 ml fiz.məh.
- ▶ 5 dəq. 1500 dövr/dəq sürətilə sentrifuqada fırladıırıq (yuyuruq).
- ▶ Üst təbəqə atılır. Qalan 2 ml limfosit kütləsini 1 sutka saxlamaq olar.

İşin gedişi:

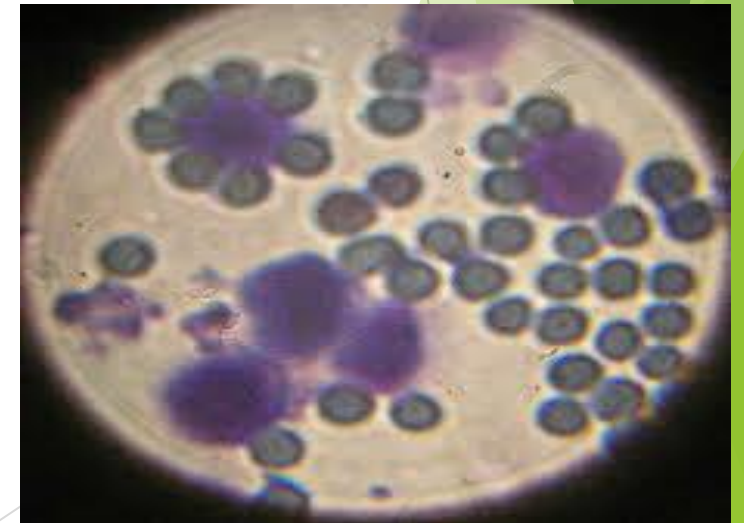
1. 0,1 ml limfosit kütləsi + 0,1 ml siçan qanı (eritrositi)
2. 5 dəq 1500 dövr/dəq. sentrifuqada fırladıırıq
3. 15 dəq soyuducuda saxlayırıq
4. 1-2 damcı qlütar aldehidi damcıladıırıq
5. 5 dəq. soyuducuda saxlayırıq
6. Üzərinə 3 dəfə çox (3 ml) fiz.məh. əlavə edirik
7. 5 dəq 1500 dövr/dəq. sentrifuqada fırladıırıq
8. Üst hissə atılır. s/ş-də qalan hissədən yaxma hazırlanır

Yaxmanın hazırlanması

- ▶ Əşya şüşəsinin üstünə tökülmüş limfosit qatı **quruyur.**
- ▶ Üzərinə spirt əlavə edilib **fiksasiya** olunur.
- ▶ 1:9 nisbətində hazırlanmış Romanovski-Ginza boyağı ilə 3-2 dəq. **rənglənilir.**

Hesablama

- ▶ Hazırlanmış yaxma işıq mikroskopunda immersiya yağı vasitəsilə təqdiq edilir. Görmə sahəsində B limfosit və ətrafında eritrositlər olan rozetlər hesablanır.
- ▶ Əgər B limfositin ətrafında 3 və daha artıq eritrosit varsa, bu limfosit aktiv (reseptora malik) hesab edilir.
- ▶ Mikroskopda 100-dək aktiv və q/aktiv B limfosit sayılır.
- ▶ Aktiv B limfositlərin sayı göstərici hesab edilir.
- ▶ Norma 25-35% -dir.



Leykositar hüceyrələrin fenotipləşməsi

- Leykositlər morfoloji, fenotipik və funksional xüsusiyyətlərinə görə bir-birindən fərqlənirlər. Fenotipik cəhətdən hər bir hüceyrə səthində yerləşən və ona xas olan reseptorlarla-markerlərlə seçilir.
- Müayinə zamanı əsas rol xüsusi markerlərə-CD markerlərə məxsusdur (Cluster of differentiation or Cluster of designation).
- Bu markerlər üçün sistemləşdirilmiş xüsusi təsnifat işlənilib hazırlanmışdır. CD-yə aid təsnifat ilk dəfə 1982-ci ildə Parisdə İnsan Leykositinin Differensasiya Antigeni haqqında keçirilən 1-ci Beynəlxalq Konfransda təklif olunmuşdur

Fenotipləşmənin əsas məqsədi

Hüceyrələrin fenotipləşməsi hüceyrə immunitetini təyin etmək üçün son dövrlərdə istifadə olunan ən müasir üsullardan biridir. Bu zaman hüceyrə səthindəki markerləri (CD+) təyin etməklə hüceyrələri və onların hansı subpopulyasiyaya aid olmasını asanlıqla müəyyən etmək olar. Periferik qanda eritrositlərin lizisini həyata keçirərək leykosit hüceyrələrin səthi reseptorları təyin edilir.

Axin sitometriya üsulu

- ▶ Monoklonal əkscisimlərin köməyi ilə periferik qan hüceyrələrinin müxtəlif subpopulyasiyasını ayırd etmək mümkündür. Periferik qan hüceyrələrinin fenotipləşməsini axın sitometriya üsulu ilə həyata keçirmək olar.
- ▶ Bu məqsədlə müayinələr Becton Dickinson firmasının reaktivlərindən istifadə etməklə FaxScan aparatında aparılır.

FaxScan aparatının görünüşü

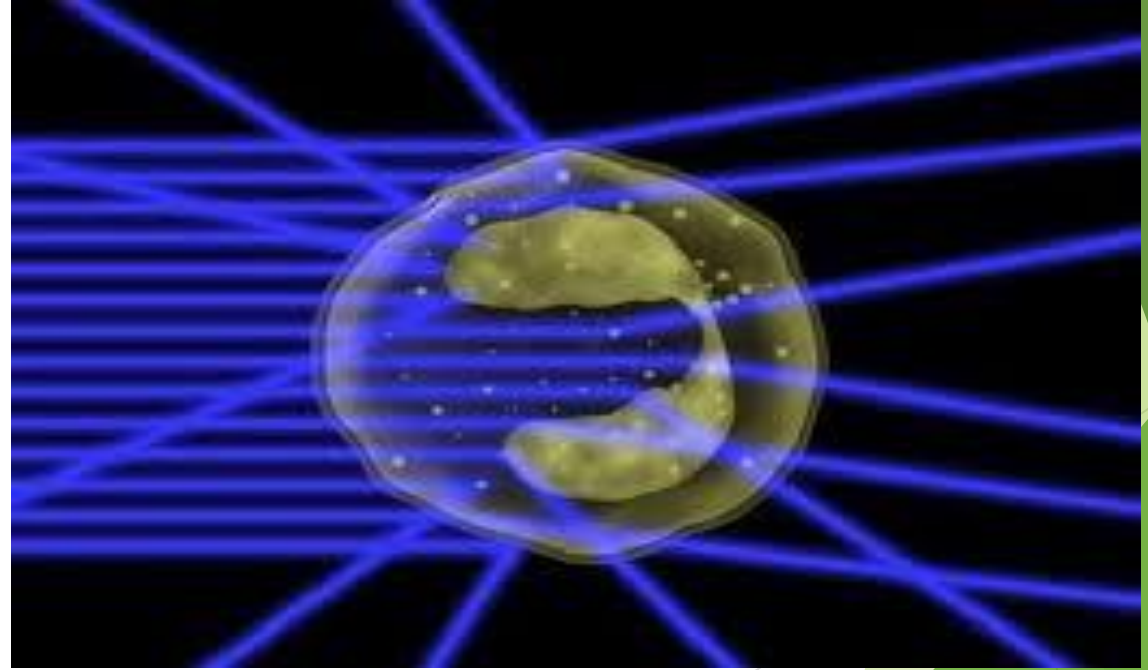
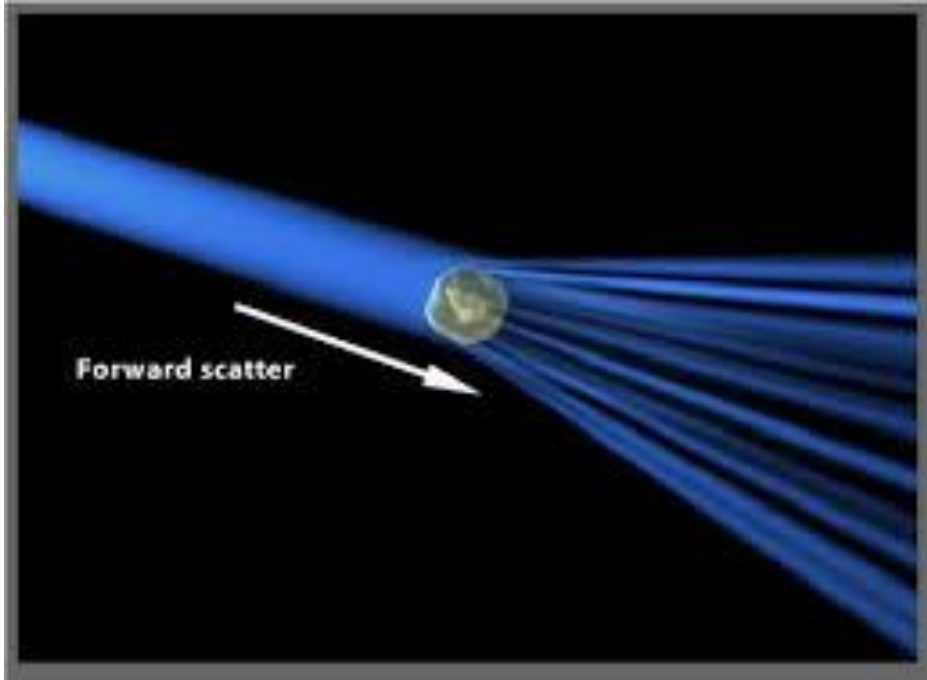


Prinsipi:

- ▶ Proses antigen-anticisim reaksiyasına əsaslanır. Hüceyrələrin spesifik antigeninə qarşı istifadə olunan əkscisimlər xüsusi flüorosentlə nişanlanır və axın sitometriya üsulu ilə təyin olunur. Belə xüsusi flürosensiya edən əkscisimlərlə və ya flürosent rəngləyicilərlə nişanlanmış hüceyrə suspenziyası maye axını şəklində, tək-tək fokuslaşmış arqon tərkibli işıq topası-lazer şüasından növbə ilə keçir.

Müəyyən dalğa uzunluğuna malik olan işıq (d.u.-488 nm) flüoroxrom ilə rəglənmiş hüceyrələri aktivləşdirir, oyadır. Axın sitimetriya üsulu zamanı iki rəngli flüotoxromdan istifadə olunur. Fluoresein izotiosiyanat ilə rənglənmiş limfositlər 515 nm dalğa uzunluğuna malik sarı-yaşıl işıq, fikoeritrin ilə rənglənmiş limfositlər isə 580 nm d.u.-lu işıq səpələyir. Hüceyrələrin maye şəklində lazer şüasından keçməsi zamanı işığın səpilməsi baş verir. Belə işıq səpilməsinin təyini üsulun əsas prinsipidir.

Lazer şüasının düz və səpilmiş görüntüsü



Lazer şüasının hüceyrələrdən səpiləsini xüsusi detektorlar qeydə alır. Rəngləyicilərin səpələdiyi işıq linza və güzgünün köməyi ilə yığılır. Işıq siqnalları qeydə alınıb, elektrik impulslarına çevrilir. Bu impulslar kompüter tərəfindən işlənilib saxlanılır. Işıq dispersiyasının dərəcəsi hüceyrələrin ölçüsü və quruluşu haqqında fikir yürütməyə əsas verir.

İşin gedişi

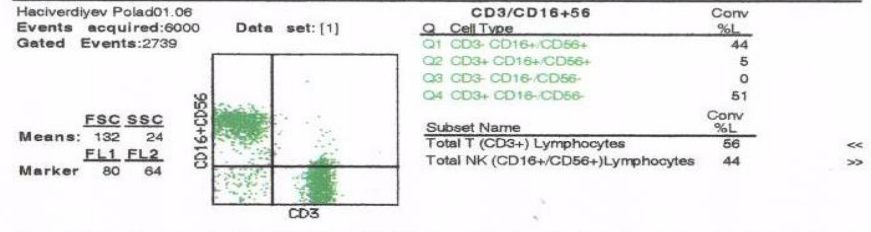
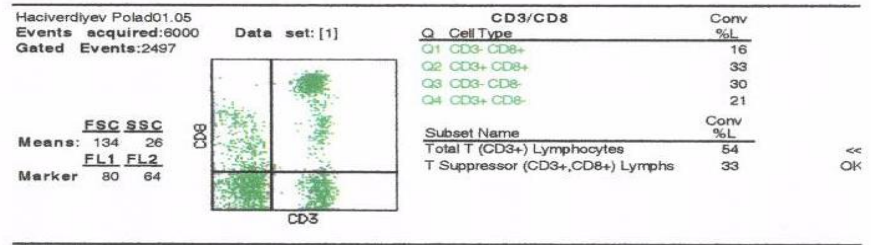
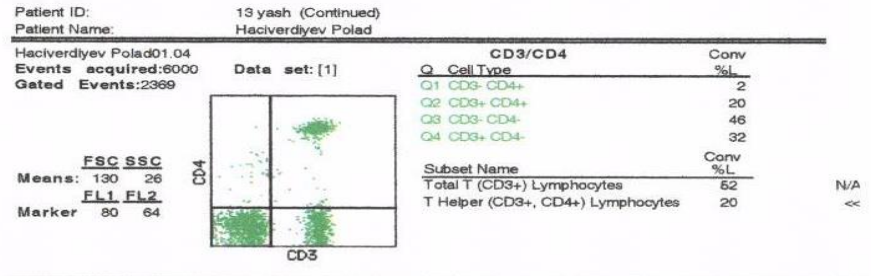
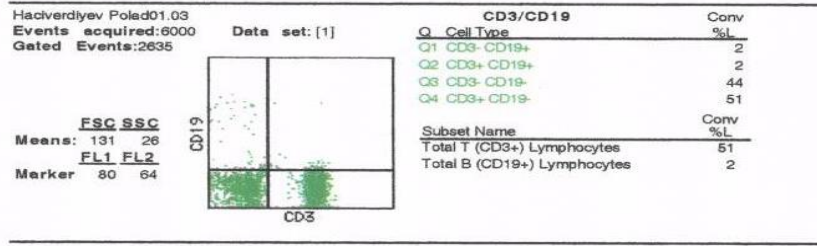
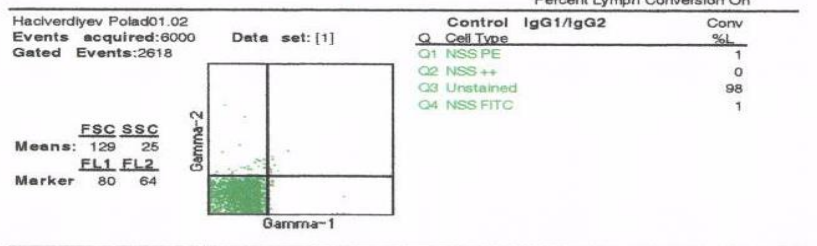
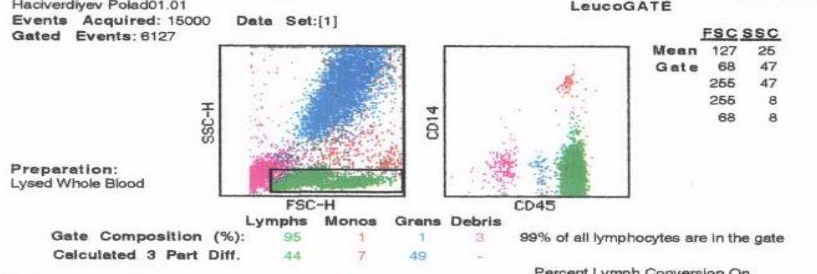
1. 100 mkl heparinli qan+10 mkl monoklonal əkscisimlər
2. 15 dəq. otaq temperaturunda, qaranlıqda inkubasiya
3. Eritrositləri lizisə uğratmaq üçün 2000 mkl məhlul əlavə olunur (3 saniyə vortex-qarışdırmaq)
4. 10 dəqiqə otaq temperaturunda, qaranlıqda inkubasiya
5. 5 dəqiqə 1500 dövr/dəqiqədə sentrifuqa
6. Üst maye boşaldılır
7. 2000 mkl yuyucu məhlul əlavə edilir
8. 5 dəqiqə 1500 dövr/dəqiqədə sentrifuqa
9. Üst maye boşaldılır
10. 500 mkl fiksasiyaedici məhlul əlavə edilir (3 saniyə vortex-qarışdırmaq)
11. 20 dəqiqə soyuducuda saxlamaq
12. FaxScan aparatında hüceyrələrin fenotipləşməsi

Axin sitometriya üsulu ilə alınan nəticənin təsviri.

**Azerbaijan Medical University
SimulSET Lab Report**

Director: _____ Cytometer: FACScan (81791)
 Operator: Iskenderova S Software: SimulSET v 3.1

Patient ID: 13 yash
 Patient Name: Haciverdiyev Polad
 Date Acquired: Wed, Mar 16, 2011 11:46
 Date Analyzed: Wed, Mar 16, 2011 11:47
 Panel Name: IMK-Lymphocyte



Tube Name/ Consistency	Subset Name/ Ck Name	Conv. Percent Lymphs
Average CD3	Total T (CD3+) Lymphocytes	53 <<
Sum of Cells	T + B + NK	99 OK
Ratio	T Lymph H/S CD3, CD4/CD3, CD8 Ratio	0.61 <<

Üsulun üstünlüyü

Müasir axın sitometriya üsulu ilə hüceyrələrin immunfenotipləşməsi sürətinə və dəqiqliyinə görə digər üsullardan daha əlverişlidir. Bu üsulun köməyi ilə hüceyrə səthində olan bir neçə antigeni eyni vaxtda təyin etmək olar. Müayinə materialı kimi qan, sümük iliği, limfa toxuması və digər toxumalardan istifadə oluna bilər.