

אימונולוגיה – דו"ח מעבדה

מעבדה מס' 1:

סקיטה בנוף ובע"פ:

פירוי נוסבן או אנטיגן

מעבדה מס' 2:

נוסבנים פמולטואטינים

ופמולטינים

261040220/1	מסי קבוצה
ד"ר סיגל כורם	שם המרצה
22.12.06	תאריך המעבדה

## מעבדה מס' 1- שקיעה בנוזל ובג'ל: זיהוי נוגדן או אנטיגן

### חלק א': קביעת היחס האופטימאלי (OP) במערכת אנטיגן-נוגדן

#### מטרת הניסוי:

קביעה כמותית למחצה של היחס האופטימאלי במערכת האנטיגן-נוגדן BSA-Anti BSA

#### עיקרון הניסוי:

כאשר נוגדן המכיל לפחות שני אזורי קישור לאנטיגן נקשר לאנטיגן המכיל לפחות שני אפיטופים, נוצרים קומפלקסים, מבנה קומפלקסים אלו, גודלם ומסילותם תלויים ביחסים הכמותיים של האנטיגן והנוגדן בתמיסה, ביחס מסוים הנקרא היחס האופטימאלי (Optimal Proportion) כמות המשקע שנוצר יהיה מקסימאלי. לכל מערכת של אנטיגן-נוגדן יחס אופטימאלי האופייני לה ומחושב על פי היחס בין ריכוזי התמיסות של האנטיגן והנוגדן.

הניסוי כפי שמבוצע בדרך זו הינו ניסוי כמותי למחצה וזו מפני שנעשה שימוש באנטי סרום, ריכוז הנוגדן באנטי סרום אינו ידוע, על מנת לבצע ניסוי כמותי לחלוטין ניתן להשתמש בתמיסה בה ריכוז הנוגדן ידוע או לבדוק את ריכוז הנוגדן באנטי סרום.

#### הביקורת בניסוי:

מבחנה מס' 8 המכילה Borat saline ואת תמיסת האנטי סרום בנפחים שווים לשאר המבחנות, משמשת כבקרה שלילית המראה לנו כי אין יצירת משקע כאשר אין מערכת נוגדן-אנטיגן, כלומר בין המרכיבים השונים באנטי סרום וב-Borat saline.

#### תוצאות:

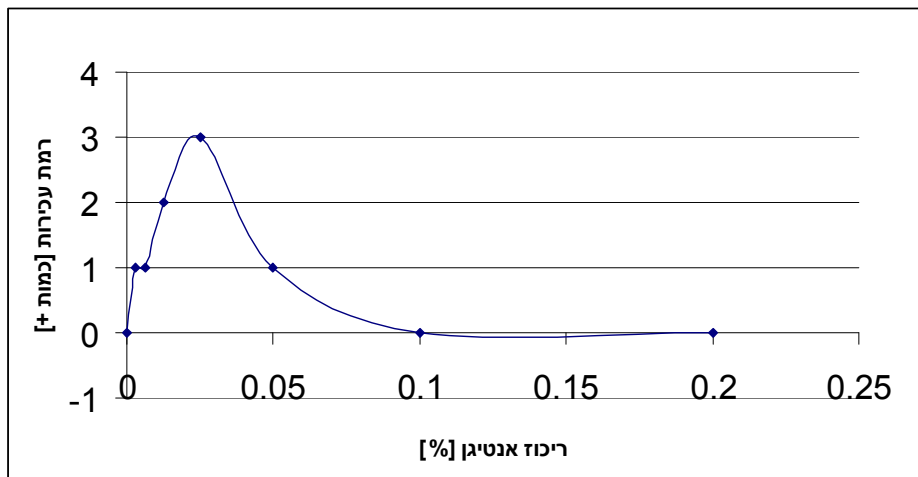
### טבלה מס' 1-ריכוז תוצאות הניסוי

מס' מבחנה	1	2	3	4	5	6	7	8
ריכוז האנטיגן [%]	0.2	0.1	0.05	0.025	0.0125	$6.25 \times 10^{-3}$	$3.125 \times 10^{-3}$	0
תוצאה	-	-	+	+,+,+	+,+	+	+	-

#### \*התוצאות נלקחו מאיתי ועודד

מקרא:

- מינוס מציין כי לא נראה משקע
- פלוס מציין כי נראה משקע, כמות פלוסים גדולה יותר מציינת על משקע גדול יותר.

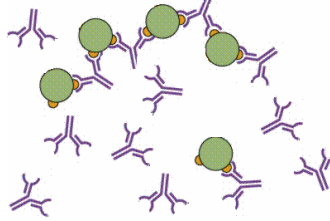


### גרף מס' 1-כימות העכירות המושפעת מריכוז משתנה של אנטיגן

ניתן להבחין בשלושה אזורים:

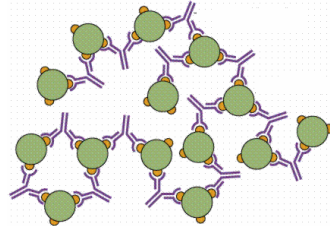
- אזור ראשון בו הנוגדן בעודף, מפני שהנוגדנים בעודף אין מספיק אנטיגנים כדי ליצור צברים גדולים על ידי crosslinking.

#### תמונה מס' 1



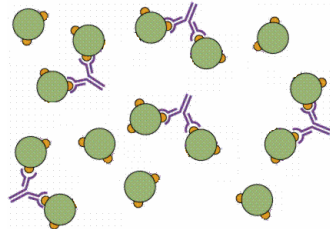
- אזור שני בו היחס בין ריכוז הנוגדן והאנטיגן הוא אופטימאלי, אזור שיווי משקל בו כמויות וגודל הצברים הנוצרים הינם מקסימאליים.

#### תמונה מס' 2



- אזור שלישי, בו האנטיגן בעודף, במקרה זה מולקולות האנטיגן שונות נקשרות לאתרי הקישור על הנוגדנים, אנטיגן אחד לכל אתר קישור, ועקב כך לא נוצר ה-crosslinking

#### תמונה מס' 3



#### מסקנה:

המשקע המרבי התקבל בריכוז 0.025% של האנטיגן ולכן, מפני שהמבחן הינו חצי כמותי היחס האופטימאלי עבור מערכת זו הינו בריכוז הנוגדן באנטי סרום וריכוז של 0.025% של האנטיגן.

#### תשובה לשאלה בחוברת

כאשר משווים בין שני אנטי סרום שונים, ניתן לומר כי לאנטי סרום מסוים טיטר גבוה יותר כאשר נראה שיקוע מרבי במבחנה בעלת מיהול גבוה יותר של האנטי סרום, הטיטר הינו פונקציה של ריכוז ופעילות הנוגדן, במבחנה בעלת מיהול גדול ריכוז הנוגדן הינו נמוך, ככל שריכוז הנוגדן נמוך יותר במבחנה בעלת השיקוע המרבי כך טיטר הנוגדן גדול יותר, במקרה שמוצג בשאלה ל-Anti BSA2 טיטר גבוה יותר.

מפני שההפרש הוא בשתי מבחנות והמיהולים הם מיהולים כפולים, הטיטר של Anti BSA2 גדול פי 4 משל Anti BSA1.

## חלק ב': מבחן הטבעת (Ring test)

### מטרת הניסוי:

קביעה איכותית של נוכחות נוגדנים נגד אלבומין מסרום פרה. (BSA-Bovine serum albumin), באנטי סרום של ארנבת אשר חוסנה כנגד BSA

### עיקרון הניסוי:

עקרון ניסוי זה זהה לניסוי בחלק א' אך בעוד שבחלק א' נוצר משקע השקע לתחתית המבחנה, בניסוי זה יצרנו שתי פאזות נפרדות, בצורה זו במבחנה מתאימה בה יש קישור של נוגדן-אנטיגן נוצר משקע בצורת טבעת בין שתי הפאזות.

### מערכת הניסוי:

#### טבלה מס' 2- מערכת ניסוי מבחן הטבעת

מבחנה	תוספת א'	תוספת ב'
1	200 ul אנטי BSA	200 ul BSA 0.05%
2	200 ul נסיוב נורמאלי של ארנבת (NRS)	200 ul BSA 0.05%
3	200 ul אנטי BSA	200 ul Borate saline
4	200 ul נסיוב נורמאלי של ארנבת (NRS)	200 ul Borate saline

### הביקורות בניסוי:

1. מבחנה 2 משמשת כבקרה שלילית, מכילה חלבון BSA ונסיוב נורמאלי מארנבת, נועדה לבדוק אם יש נוגדנים ל- BSA בסרום ארנבת שלא עברה חיסון, ניתן להניח כי הנסיוב אינו מכיל נוגדנים כנגד BSA ולכן לא נצפה להיווצרות משקע.
2. מבחנה 3 משמשת כבקרה שלילית, מכילה נסיוב ארנבת שעברה תהליך חיסון ו-Borate saline, נועדה לבדוק האם נוצר משקע בין מרכיבי האנטי סרום והבופר השונים, לא נצפה להיווצרות משקע.
3. מבחנה 4 משמשת כבקרה שלילית, מכילה נסיוב מארנבת שלא עברה חיסון ו-Borate saline. נועדה לבדוק האם נוצר משקע בין מרכיבי ה-NRS והבופר השונים, לא נצפה להיווצרות משקע.

### תוצאות:

במבחנה מס' 1 נוצר משקע בצורת טבעת בין פאזת האנטיגן (anti serum) ופאזת הנוגדן, צבעה לבן ועכור, בשאר המבחנות לא נראתה פעילות.

### מסקנה:

על פי מבחנות הביקורת השונות ראינו כי אין פעילות בין מרכיבי האנטי סרום או ה-NRS עם הבופר, כמו כן ראינו כי NRS אינו מכיל אנטיגנים כנגד BSA. הפעילות היחידה התרחשה במבחנה מס' 1 ולכן ניתן להסיק ואף לקבוע כי האנטי סרום של ארנבת אשר חוסנה כנגד BSA אכן מכיל נוגדנים כנגד BSA.

## חלק ג': שיטת Ouchterlony - דיפוזיה כפולה בג'ל

### מטרות הניסוי:

1. בדיקת זהות או דמיון חלקי בין אנטיגנים.
2. בדיקת המספר המינימאלי של מערכות נוגדן אנטיגן.
3. קביעה כמותית למחצה של היחס האופטימאלי במערכת האנטיגן-נוגדן BSA-Anti BSA.

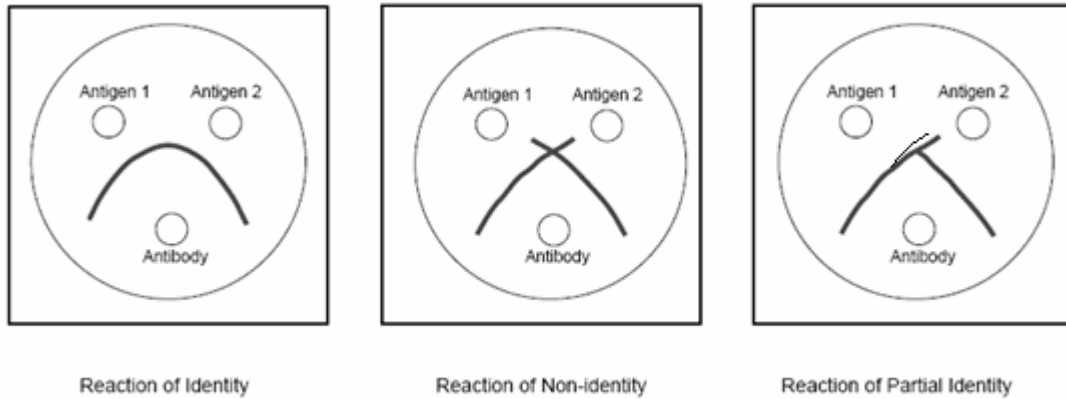
### עיקרון הניסוי:

אחת השיטות לזיהוי נוגדנים ספציפיים כנגד אנטיגנים מבוססת על העובדה שכתוצאה מתגובת אנטיגן נוגדן נוצרת הצמחה (Precipitation), ההצמחה מתרחשת כאשר נוצר תצמיד אנטיגן - נוגדן שיכול לשקוע. גודל התצמיד נקבע על ידי מספר האתרים האנטיגנים שהנוגדנים מכירים. כאשר רוצים לקבוע כמות לא ידועה של נוגדן, מגיבים אותו עם כמויות משתנות של אנטיגן, על פי הגרף שמתאר את הקשר בין כמות התצמיד לבין כמות האנטיגן המוסף, אפשר לדעת מהי כמות הנוגדן בדגימה. באופן מעשי, לנפח נתון של דגימת נוגדנים, מוסיפים כמויות עולות של אנטיגן שהנוגדן מכיר. בשלב הראשון, כמות הנוגדנים גדולה יותר מכמות האנטיגן. שלב זה נקרא antibody-excess zone. עם העלייה בכמות האנטיגן המוספת, עולה גם מידת ההצמחה, עד שמגיעים ליחס אופטימאלי. שלב זה נקרא equivalence zone. מעבר לנקודה זו, כמות האנטיגן המוספת תהיה גדולה מכמות הנוגדן, שהוא בכמות קבועה לאורך כל הריאקציה. לכן, מידת ההצמחה תרד ככל שנמשיך להוסיף אנטיגן (כיון שכל הנוגדנים שבתמיסה מצויים במצב של תצמיד). שלב זה נקרא antigen-excess zone.

### השימוש ביכולת של אנטיגן – נוגדן ליצור צימות כדי לאפיין נוגדנים לא ידועים

השיטה מבוססת על העובדה שתמיסות יכולות לעבור בדיפוזיה באגר. בצלחת פטרי עם אגר, יוצרים בארות (גומות) ובהן שמים תמיסות של אנטיגנים ידועים ותמיסה של נוגדנים שאותם רוצים לאפיין. תמיסות האנטיגנים והנוגדנים נעות בדיפוזיה בתוך האגר ובמקום שבו מתרחשת תגובה ספציפית בין אנטיגן לנוגדן, נוצרת הצמחה, ההצמחה מתבטאת באגר בפס השקעה (precipitation). את הפס הזה ניתן לראות בברור על מצע האגר. המגיבים עוברים בדיפוזיה מהבארות לכל הכוונים, ובמקום שיש הכרות בין האנטיגנים לנוגדן, נוצרת הצמחה, ביחסי אנטיגן-נוגדן שווים בכמותם. זיהוי של אתר אחד על האנטיגן על ידי הנוגדן יוצר פס השקעה אחד. ככל שיש יותר אתרים לאותו אנטיגן המזוהים ע"י תמיסת הנוגדנים, ייווצרו יותר פסי השקעה, כמספר הזהויות.

### איור מס' 1 – תוצאות אפשריות בדיפוזה כפולה בג'ל



#### תגובה של זהות מוחלטת

מוגדרת כאשר לשני אנטיגנים יש אתרים זהים, אותם הנוגדנים מכירים. ולכן, אם בשתי בארות סמוכות נשים שני אנטיגנים כאלה, ייווצר פס השקעה משותף לשני האנטיגנים עם הנוגדן (איור שמאלי).

#### תגובה של חוסר זהות

מוגדרת כאשר לשני אנטיגנים אין בכלל אתרים משותפים.

תגובה כזאת תיראה על האגר כפסי השקעה בלתי תלויים זה בזה, (איור אמצעי).

#### תגובה של זהות חלקית

מוגדרת כאשר יש לפחות אתר אנטיגני אחד זהה בשני האנטיגנים. למשל, באנטיגן אחד יש אתר A ובאנטיגן השני יש אתר A וגם אתר B. הנוגדן מכיר את שני האתרים, כלומר כנגד אנטיגן אחד יוצר פס הצמחה אחד וכנגד האנטיגן השני יוצרו שני פסי הצמחה (איור ימני).

#### מערכת הניסוי:

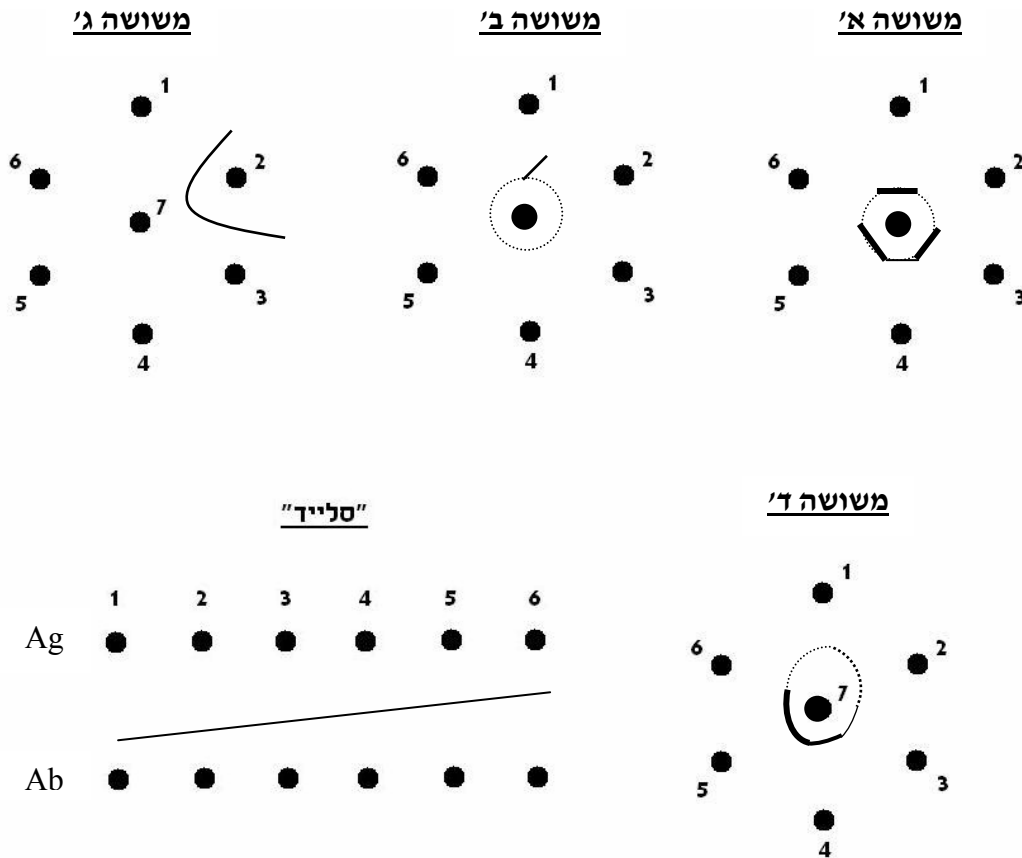
#### טבלה מס' 3- מערכת ניסוי דיפוזה כפולה בג'ל

חור מס'	משושה א'	משושה ב'	משושה ג'
1	BSA 0.05%	SSA 0.05%	Anti BS
2	SSA 0.05%	GSA 0.05%	Anti BSA
3	BSA 0.05%	ESA 0.05%	BS
4	HSA 0.05%	PSA 0.05%	Anti BS
5	BSA 0.05%	HSA 0.05%	Anti BSA
6	GSA 0.05%	BSA 0.05%	BS
7	Anti BSA	Anti BSA	BSA

משושה ד' מכיל בחורים 1-6 BSA במהולים כפולים החל מריכוז 0.5% בחור מס' 1 ועד ריכוז  $1.5625 \times 10^{-3}$  % בחור מס' 6, חור מס' 7 מכיל anti BSA.

"סלייד" המכיל בחורים 1-6 של שורה BSA A במהולים כפולים החל מריכוז 0.5% בחור מס' 1 ועד ריכוז  $1.5625 \times 10^{-3}$  % בחור מס' 6, בנוסף מכיל בחורים 1-6 של שורה anti BSA B בנפח וריכוז קבוע.

הביקורת בניסוי: anti BS הינו סרום המכיל מספר רב של נוגדנים כנגד BS שהם מגוון חלבונים שונים הנמצאים בסרום הפרה, במשושה ג' אנחנו בודקים את מספר המערכות המינימאלי של אנטיגן נוגדן (המספר הוא מינימאלי מפני שלעיתים קשה להבחין האם המשקע הנוצר הינו פס אחד הנוצר ממערכת אחת של אנטיגן ונוגדן או מספר קווים אשר נוצרו ממערכות שונות) ולכן ניתן להסתכל על משושה ג' כעל ביקורת חיובית אשר מאשרת לנו את האינטראקציה בין אנטיגנים שונים לחלבונים שונים ולאינטראקציה של anti BSA ו-BSA בפרט.

**תוצאות :****מסקנות:****משושה מס' א' :**

לא התקבלו קווים מחוברים בכל המשושה. התקבלה הילה של משקע סביב הבאר המרכזית, ו-3 קווים מודגשים יותר של משקע בינה לבין בארות 1, 3, 5. כלומר הסרום של הארנבת מכיל נוגדנים עבור סרום אלבומין מכל הסוגים שהוצגו לו, והקווים המודגשים אכן מאמתים כי הארנבת מחוסנת בפני BSA (חורים 1, 3, 5). יש להניח כי סרום הארנבת הכיל נוגדנים פוליקלונליים שזיהו רצפים מסוימים בסרום אדם לכן התקבלה הילה של משקע בין חור 7 לחור 4, לכן קיים הבדל בין אלבומין פרה לאדם, אך עם זאת ישנם רצפים זהים בין האנטיגנים שהשתמרו באבולוציה מפני שראינו מספיק נוגדן נגד אלבומין פרה שהגיב עם אלבומין אדם. כמו כן עבור GSA ו-SSA ההילה שנוצרה ביניהם לבין הבאר המרכזית מעידה כי האנטי BSA מזהה אפיטופ זהה בפרה ובכבשה ובפרה ובעז, אך ישנם אפיטופים אחרים אותם מזהה האנטי הסרום עבור BSA שאינם קיימים בכבשה ובעז.

**משושה מס' ב' :**

אנטי BSA לא מזהה אפיטופ באלבומין חזיר וסוס. לפי חורים 1-2 ניתן לראות כי קיבלנו דרבן בין אלבומין כבשה לאלבומין עז (חור 2), אנו רואים כי המגוון האפיטופי אותו מזהה הסרום המחוסן (anti BSA) רב יותר עבור הכבשה מאשר עבור העז (כיוון והדרבן הנו עבור SSA) אך שוב, כנראה ישנם אפיטופים אחרים אותם מזהה האנטי הסרום עבור BSA שאינם קיימים בכבשה ובעז.

**משושה מס' ג' :**

ניתן לראות כי מקבלים פס עבה יותר ומעט רחוק יותר ליד באר 2 באזור שמול הבאריות שמכילות סרום BS (3). הסיבה לכך היא שבאזור זה האנטי סרום (anti BSA) "ראה" כמות גדולה יותר של אלבומין פרה שמקורו מלבד ה-BSA גם מה-BS שמכיל בין היתר גם אלבומין, ולכן נוצרו צברים רבים יותר וגדולים יותר בנקודת ה-OP. פס המשקע הולך ונהיה צר יותר וקרוב יותר ככל שמתקרבים לבאר 1 מכיוון שבאזורים אלו היה פחות אלבומין שמקורו רק מבארית 7.

משושה זה גם שימש לנו כבקרה על מנת לראות את גודל וכמות המשקע המתקבלים כתלות בריכוזי נוגדן ספציפי ואנטיגן מתאים לעומת אנטיסרום המכיל נוגדנים כנגד Ag שונים (anti BS) וסרום המכיל Ag שונים (BS). היינו מצפים לראות קו עקום דומה סביב באר 5, אך התוצאות לא תאמו את ציפיותינו.

**משושה מס' ד' :**

כאן התבלבלנו ושמנו את הריכוזים בצורה הפוכה כך שהריכוזים הולכים וקטנים מ-6 עד 1 ולא כפי שצינינו בטבלה מס' 3 :

משושה זה מייצג את התפלגות גודלי הקומפלקסים ומרחק נקודת ה-OP. ניתן לראות כי ככל שריכוז האנטיגן יורד פס השיקוע נהיה צר יותר וקרוב יותר לבארות המכילות את האנטיגן. הנוגדן בבאר 7 נע על פי מפל ריכוזים בצורה רדיאלית שווה לכל הכוונים, לכן לא ישפיע על מיקום ה-OP. כיוון שהתחלנו מהריכוז הגבוה ירדת הריכוז כפונקציה של המרחק תדרוש מרחק גדול יותר על מנת להגיע לריכוז ה-OP הנכון, לכן נמצא את המשקע רחוק יותר מבאר המוצא של האנטיגן באופן יחסי לבארות עם ריכוזי האנטיגן ההתחלתיים הנמוכים יותר. עובי המשקע משתנה אף הוא בהתאם לריכוז הנוגדן, אשר במהלך הפעוע יוצר גם הוא גרדיאנט ריכוזים כפונקציה של המרחק. לכן מול בארות בהן ריכוז האנטיגן גדול יותר ומקום יצירת המשקע הוא קרוב יותר לבארית הנוגדן ייווצרו קומפלקסים גדולים יותר ויצרו פס רחב יותר. ה-OP המתקבל הינו היחס בין ריכוז הנוגדן ב-Anti BSA לבין ריכוז ה-BSA בבאר מספר 5.

**משטה ה- "SLIDE" :**

כאן התוצאות מחזקות על מסקנותינו ממשושה מס' 4, ככל שריכוז האנטיגן יורד, המרחק שהוא עובר בדיפוזיה עד למפגש עם הנוגדן ויצירת תצמיד גדל, ניתן לראות ממש קו ליניארי (בקירוב טוב) שמעיד על המרחק כתלות בריכוז האנטיגן.

**מסקנות כלליות :**

מתוצאות הדרבן במשושה 2 ניתן לומר כי אלבומין עז וכבשה שמור אבולוציונית ומכיל אפיטופים זהים לכן נוכל לומר כי הם קרובים פילוגנטית. ישנה התאמה פילוגנטית חלקית בין פרה לעז וכבשה, לפי תוצאות המשושים 1, 2. לכן נניח כי פרה רחוקה יותר פילוגנטית מעז וכבשה. סוס וחזיר אינם קרובים פילוגנטית לפרה כיוון ולא נצפתה תגובה חיסונית עבור האלבומין שלהם. עבור אלבומין האדם הייתה תגובה עם האנטי סרום אך תגובה זו לא הייתה עבור אפיטופים דומים לאלו של פרה אנו מניחים כי באנטי סרום הארנבת היו נוגדנים המסוגלים לתת תגובה חיסונית עם אלבומין אדם. ניתן להניח כי אדם ופרה לא קרובים פילוגנטית. ממשושה 4 ומסלייד הבאריות המקבילות אנו מסיקים כי נקודת ה-OP אכן תלויה בריכוז אנטיגן מסוים ועוצמת התבטאותה תלויה בגרדיאנט הריכוזים של האנטיגן והנוגדן.



## מעבדה מס' 2 - נוגדנים המואגלוטינינים והמוליזינים

### מטרות הניסוי:

1. הכרות עם מערכת המשלים
2. התנסות בשיטות העבודה אגלוטינציה והמוליזה

### עיקרון הניסוי:

להבדיל ממעבדה מספר 1 במעבדה זו עבדנו עם כדוריות דם שהם אנטיגן תאי, כדוריות הדם אינן מסיסות בתמיסת העבודה שלנו ולכן לא ניתן להשתמש בשיטות העבודה בהן השתמשנו בניסוי מס' 1. בניסוי זה נעבוד בשתי שיטות, בשיטת האגלוטינציה נוצרים צברים של כדוריות דם על ידי קישורם לנוגדנים (cross linking), הצברים הנוצרים שוקעים לתחתית הכלי ונצמדים אליה, ניתן להבחין שהתרחשה הצמחה (אגלוטינציה) על ידי החזקת פלטת המיקרו טיטרציה בה השתמשנו בניסוי, בזוית, כאשר המשקע אינו "זורם" באופן חופשי בכוון השיפוע, התרחשה הצמחה. בשיטת ההמוליזה אנחנו מוסיפים לכל אחד מהבאריות בפלטה חלבוני משלים, נכחות של נוגדן אשר נקשר לכדורית דם יגרום להפעלת "קסקדת" תהליכים אשר יפעילו את מערכת המשלים בצורה הקלאסית, כדוריות דם כאלו יעבור "ליזיס", ניתן להבחין בבור אשר בו הפועל המשלים על ידי שינוי צבע התמיסה.

### תוצאות:

#### טבלה מס' 4: ריכוז תוצאות שיטת ההמואגלוטינציה

פקטור מיהול	0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.0078125	0.00390625	0.001953125		
עמודה שורה	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+,+,+	+,+	+,+									
B	+,+,+	+,+,+	+,+	+								
C												
D												
E												
F												

### מקרא:

+ - מצייין כי הייתה הצמחה של כדוריות הדם.  
 - תא ריק - מצייין כי לא הייתה פעילות.

- A : PBS + anti serum
  - B : DTT+ anti serum
  - C : PBS+NRS
  - D : DTT+NRS
  - E : PBS+PBS
  - F : DTT+PBS
  - טור 1 – ללא מיהול
  - טור 12 מיהול הכי גבוה
- הערה- כל סימן יחיד מסמן תוצאה של קבוצה אחרת.

**טבלה מס' 5: ריכוז תוצאות שיטת המוליזה**

מיהול:	0	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	0.0078125	0.00390625	0.001953125		
עמודה שורה	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	,+,+ +,+	,+,+,+ +	,(+\ -) (+\ -) +,+	,(+\ -) (+\ -) +,+	,(+\ -) (+\ -) +	,(+\ -) (+\ -) +	,(+\ -) (+\ -) +	,(+\ -) (+\ -) (+\ -) (+\ -)	(+\ -)	(+\ -)		
B	,+,+ +,+	,(+\ -) +,+,+	,(+\ -) (+\ -) +,+	,(+\ -) +,+	,(+\ -) +,+	,(+\ -) (+\ -)	(+\ -)	(+\ -)	(+\ -)	(+\ -)		
C												
D												
E												
F								(+\ -)				

**מקרא:**

+ - מצוין כי ישנה המוליזה של כדוריות הדם.  
 (+\ -) - מצוין כי ישנה המוליזה חלקית של כדוריות הדם.  
 תא ריק - מצוין כי לא נראתה פעילות

- A : PBS + anti serum
- B : DTT+ anti serum
- C : PBS+NRS
- D : DTT+NRS
- E : PBS+PBS
- F : DTT+PBS
- טור 1 – ללא מיהול
- טור 12 מיהול הכי גבוה

הערה- כל סימן יחיד מסמן תוצאה של קבוצה אחרת.

**תשובות לשאלות מחוברת המעבדה:**

**שאלה 1**

**טבלה מס' 6: ערכי הכייל עבור שיטת המואגלוטינציה**

שורה בפלטה	A	B	C	D	E	F
ריכוז מיהול אחרון	0.25	0.125				
כייל	4	8				

**טבלה מס' 7: ערכי הכייל עבור שיטת המוליזה**

שורה בפלטה	A	B	C	D	E	F
ריכוז מיהול אחרון	0.0019	0.0019				
כייל	526	625				*

\*התייחסות בתשובה לשאלה 2

הכייל מושפע מאפיניות וריכוז הנוגדן והוא מהווה מדד לפעילות התגובה החיסונית, והוא מבוטא כערך ההופכי של המיחול האחרון של הנסיוב הנבדק שעדיין גורם להצמחה או המוליזה ולכן כדוגמה, אם המיחול 0.5 אז הכייל הינו 2.

## שאלה 2

השורות בהן נראתה כמצופה פעילות, בין אם הצמחה או המוליזה הינן שורות A ו-B אשר מכילות את האנטי סרום, בנוסף קבוצה אחת הבחינה בהמוליזה חלקית באחד המהולים של שורה F במבחן ההמוליזה, מפני ששורה זו בפלטה אינה הכילה נוגדנים ניתן לשלול את ההנחה כי המשלים הופעל הדרך הקלאסית ומפני שההמוליזה החלקית הובחנה רק בבארית אחת ניתן לשלול את ההנחה כי ה- DTT וה-PBS גרמו בצורה כלשהי לליזיס כדוריות הדם, בשל העובדות ניתן להסביר זאת בכך שבארית ספציפית זו הזדהמה בחומר כימי אשר גרם להרס התאים או שינה את צבע התמיסה כך שיראה כאילו התרחשה המוליזה, בנוסף יתכן כי נעשה שימוש ב"טיפ" שהיה בו שימוש עם האנטי סרום, כמו כן ניתן לראות כי ישנה השפעה של DTT על התוצאות, על כך מפורט בתשובה לשאלה 3.

## שאלה 3

ניתן לראות בבירור כי התוצאות בין השורות A ו-B אינן זהות גם במבחן ההמוליזה וגם במבחן ההמואגלוטינציה, בשיטות השונות בדקנו את רגישות הנוגדנים לחיזור על ידי DTT, בריכוז בניסוי צריך לחזור רק את הקשרים הדיסולפידיים בין המנומרים המרכיבים את מולקולת ה-IgM בעשותו זאת יכולתו של הנוגדן לגרום להצמחה או הפעלת המשלים קטנה משמעותית ואף ניתנת להזנחה, לעומת זאת נוגדנים מקבוצת IgG עמידים לכוח החיזור של DTT בריכוז זה, כידוע סוג הנוגדנים הראשוני המופיע בתגובה ראשונית הינו IgM וסוג הנוגדנים העיקרי המופיע בתגובה שניונית הינו IgG, בניסוי זה השתמשנו בנסיוב של ארנבת אשר עברה חיסון שניוני ולכן הצפי היה כי אם יראה שינוי כלשהו בין השורות A ו-B של שני המבחנים השינוי יובחן בכך שבשורה B המכילה DTT נראה פעילות נמוכה יותר. כפי שניתן לראות במבחן ההמוליזה אכן הדבר כך ונצפתה מגמה של ירידה בפעילות בשורה B לעומת שורה A, הדבר מצביע על נוכחות של נוגדני IgM בנסיוב. לעומת זאת במבחן ההמואגלוטינציה נצפתה מגמה ההפוכה לציפיות ונראית פעילות מוגברת בנוכחות DTT, ניתן להסביר זאת על ידי כך שביצענו רק ארבע חזרות של הניסוי וגם שחזרות אלו היו על ידי ארבעה זוגות שונים, השינויים בין הפעילות בשורות A ו-B אינם גדולים, על מנת לקבל תוצאות התואמות את התיאוריה ואת המגמה הנראית במבחן ההמוליזה ניתן לבצע את המבחן מספר נוסף של פעמים על ידי אותו הזוג.

## שאלה 4

- שורה B הינה ביקורת חיובית המראה האם קיימים בנסיוב נוגדנים מסוג IgM והאם DTT אכן מבצע חיזור קשרי s-s בנוגדנים אלו, על ידי הוספת DTT בשורה זו ניתן להבחין האם יש הבדלים בפעילות בין שורה זו לשורה A.
- שורה C הינה ביקורת שלילית המראה האם נגרמת הצמחה או המוליזה לכדוריות הדם עקב נוכחות השילוב של NRS ושל PBS בלבד במדיום.
- שורה D הינה ביקורת שלילית המראה האם נגרמת הצמחה או המוליזה לכדוריות הדם עקב נוכחות השילוב של DTT, NRS ושל PBS (אשר שימש להשלמת נפח).
- שורה E הינה ביקורת שלילית המראה האם נגרמת הצמחה או המוליזה לכדוריות הדם עקב נוכחות PBS בלבד במדיום.
- שורה F הינה ביקורת שלילית המראה האם נגרמת הצמחה או המוליזה לכדוריות הדם עקב נוכחות השילוב של PBS ו-DTT במדיום.

## שאלה 5

כפי שניתן לראות הטבלאות 6 ו-7 מבחן ההמוליזה רגיש יותר (נראתה תגובה במיחול גבוה יותר וריכוז נוגדנים קטן יותר), ניתן לראות כי הכייל המתקבל בשיטת ההמוליזה גבוה מן הכייל המתקבל בשיטת ההמואגלוטינציה. הסיבה היא שבכדי ליצור תגובת אגלוטינציה המערכת דורשת כמות רבה של נוגדנים (כדי ליצור cross linking) בעוד ועבור הפעלת מערכת המשלים בצורה יעילה, מספיקים מספר מועט של תצמידים נוגדן אנטיגן כדי להפעיל את "קסקדת" התהליכים בהפעלת המשלים, הסיבה למספר המועט הינו תהליך ההגברה המתרחש.

**שאלה 6**

**עבור אגלוטינציה:** יש צורך לבצע אינאקטיבציה של המשלים שמגיע יחד עם הדגימות, מאחר ואחרת יכול לקרות מצב שלפני שתבצע הצמחה תתבצע המוליזה. אם יש מרכיבי משלים שבאו עם הדגימה, אין מניעה שהם יגרמו לליזיס של הכדוריות לפני ההצמחה שלהם והרי אם אין כדוריות, גם לא תהיה הצמחה.

**עבור המוליזה:** גם כאן רצוי לבצע אינאקטיבציה בגלל שמטרת הניסוי היא לבדוק את ההמוליזה וכדאי שנשלוט בטיימינג של התהליך, את האינאקטיבציה נבצע לאחר זמן קבוע בכל הדוגמאות..

**שאלה 7**

החיסרון הבולט של שיטות לזיהוי נוגדנים המבוססות על פעילות המשלים בא לידי ביטוי כאשר אנחנו רוצים לזהות נוכחות נוגדנים כנגד אנטיגן תאי של פתוגן מסוים, במקרה זה הפעלת המשלים יכולה להתבצע באמצעות שתי דרכים נוספות ולא רק דרך הדרך הקלאסית של הפעלת המשלים על ידי קישור של נוגדן ואנטיגן, הדרכים הנוספות הינן הדרך האלטרנטיבית המתחילה בהתפרקות ספונטאנית של המולקולה C3 וקישור לסוגי פתוגנים שונים, ודרך MBL, מולקולה המזהה מנוז ופוקוז על גבי פתוגנים ומביעה להפעלת המשלים, במקרה כזה הפעלת המשלים לא נותנת לנו אינדיקציה חד משמעית לגבי נוכחות נוגדנים בסרום.

**שאלה 8**

תגובת ההצמחה מושפעת ממספר אתרי הקישור של הנוגדן וכמו כן ממספר האפיטופים הנמצאים על כדורית הדם, כאשר אנטיגן מסוים מכיל אפיטופ יחיד, נוגדן יחיד יקשר אליו, לא יתאפשר קישור של נוגדן נוסף וכתוצאה מכך לא ייווצרו קומפלקסים גדולים, כאשר אנטיגן אשר במקרה שלנו כדורית דם מכיל מספר רב של אפיטופים נוגדן המכיל 2 או יותר אתרי קישור ספציפיים לאותו האפיטופ, יקשר על ידי קישור יחיד אל כדורית אחת ועל ידי קישור נוסף לכדורית נוספת, על ידי מנגנון זה ייווצרו צברים של כדוריות דם אשר ישקעו בתמיסה וידבקו לקרקעית המבחנה.

גם במקרה וכאשר האנטיגן הינו אנטיגן תאי המכיל מספר רב של אפיטופים שונים, והאנטי סרום מכיל מספר רב של נוגדנים, נוגדנים שונים יקשרו לאפיטופים שונים על גבי התא ויגרמו לאגלוטינציה.

## אימונולוגיה - דוח מעבדה מס' 3

בליסט

שפיים ע"ו

פאוציסיס

מתקופ

פואאני

271040310 / 2	מסי קבוצה
ד"ר נעמה רווח הראל	שם המנחה
31.1.2007	תאריך המעבדה

תאריך הגשה : 4.2.2007

## השוואה בין דיפרנציאל דם מלא ודיפרנציאל דם לאחר הפרדה (שאלה 1)

### טבלה מס' 1: ספירת תאים פגוציטים מדגימת דם מלא

סוג התאים	נוטרופילים	לימפוציטים	מונוציטים	אאוזינופילים	באזופילים	סה"כ
מס' תאים שנספרו	67	29	4	-	-	100
מס' תאים (%)	67	29	4	-	-	100

- התוצאות המודגשות אלו הן התוצאות שלנו (וכך נסמנן לכל אורך הדוח).

### טבלה מס' 2: ספירת תאים פגוציטים מדגימת תאים מופרדים

% התאים הלבנים	נוטרופילים	לימפוציטים	מונוציטים	אאוזינופילים	באזופילים	סה"כ
מס' תאים שנספרו	94	5	2	5	-	106
מס' תאים (%)	88.6	4.7	1.8	4.7	-	100

- חישוב התאים הלבנים כמו בטבלה מס' 1
- חישוב % התאים הלבנים:  $(\text{כלל התאים שנספרו}) / 100 * (\text{תאים מסוג } X)$ , כאשר כלל התאים הינו בסביבות 100, ואכן ספרנו 100 תאים.

נתונים ספרותיים בנוגע לתאים הלבנים לניתוח התוצאות:

**נוטרופילים:** שייכים למע' החיסון הטבעית, תאים אלו מסייעים בדרך כלל בלוחמה כנגד זיהומים הנגרמים על-ידי חיידקים/שמרים, ע"י סלקציה בין עצמי לזר. אחוזם בדם ע"פ הספרות הינו כ-70%.

**לימפוציטים:** תאים אלו בעלי תפקיד חשוב במערי' החיסון, חלקם נמנים עם מערי' החיסון הנרכשת והאחרים עם מערי' החיסון הטבעית, הם מתחלקים ל-2 קבוצות עיקריות תאי B ותאי T אשר מסייעים בלוחמה נגד מחלות הנגרמות על-ידי נגיפים (וירוסים). אחוזם בדם הוא השני בגובהו בין 20%-30%.

**מונוציטים** משמשים כקו הגנה משני המתפקד כמאקרופגים, תאים אלו משוחררים ממוח העצם בשעת צורך ובמצב נורמאלי אחוזם מכלל התאים הלבנים בפלאזמה הינו 5%-8%.

**אאוזינופילים:** תאים אלו נמצאים בדם ברמה נמוכה ורק כאשר יפגשו עם פולשן המוכר להם הם יגיבו ויתרבו, אחוזם מכלל התאים הלבנים בפלאזמה הוא 2%-5%.

**באזופילים:** תאים אלו תפקידם העיקרי הוא שבנוכחות זיהום או מחלה כלשהי הם מרחיבים את כלי הדם ע"מ לאפשר מעבר מהיר ויעיל של כדוריות הדם הלבנות, אחוזם הוא בין 1%-0.5%.

1. אחוז הלימפוציטים, מונוציטים ונוטרופילים בדם המלא תואם לערכים הידועים, לא נצפו אאוזינופילים ובאזופילים והדבר מתאים לעובדה כי ריכוזם בדם נמוך מאוד.
2. בדגימת הדם לאחר שיקוע בדקסטראן קיבלנו תוצאות בהתאם לציפיות, למרות שלא היינו מצפים לראות לימפוציטים הכמות שאותה ספרנו זניחה, רוב התאים שראינו היו אכן נוטרופילים.

### בניסוי כאמור נגדיר 3 מערכות להלן:

1. מערכת מס' 1: לויקוציטים, קנדידה, פלסמה.
2. מערכת מס' 2: לויקוציטים, קנדידה, פלסמה שעברה דה-קומפלמנטציה.
3. מערכת מס' 3: לויקוציטים, קנדידה, מדיום הניסוי.

**הצגה וניתוח סטטיסטי של תוצאות הבליעה של הקנדידה ע"י פגוציטים (שאלה 2)**

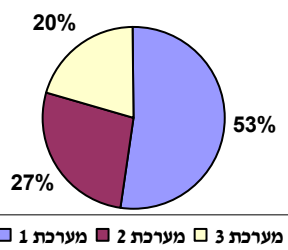
**טבלה מס' 3: תוצאות הבליעה של השמרים ע"י הפגוציטים - נתונים כיתתיים**

מערכת 3		מערכת 2		מערכת 1		זוג	שמות בני הזוג
בליעה	תאים	בליעה	תאים	בליעה	תאים		
0	41	0	38	0	27	1	זוהר ושגיא
1	8	1	11	1	7		
2	1	2	1	2	11		
				3	4		
				4	1		
0	33	0	24	0	19	2	עודד ואיתי
1	16	1	19	1	17		
2	1	2	6	2	8		
		3	1	3	2		
				4	3		
				6	1		
0	36	0	28	0	16	3	אושרת ומרינה
1	12	1	17	1	23		
2	2	2	4	2	7		
		3	0	3	1		
		4	1	4	1		
				5	1		
0	39	0	35	0	17	4	אורטל וקרן
1	9	1	9	1	20		
2	1	2	4	2	5		
3	1	3	2	3	4		
				5	1		
				6	3		
0	30	0	22	0	18	5	ולדימיר ואלכסנדרה
1	9	1	12	1	10		
2	1			2	3		
				3	1		
				4	1		
				5	1		
				6	1		
0	30	0	28	0	34	6	קטיה ואור
1	16	1	13	1	6		
2	2	2	5	2	4		
4	2	3	4	3	2		
				4	2		
				5	2		
0	20	0	20	0	25	7	סיון ומעיין
1	5	1	6	1	7		
		2	5	3	4		
		3	2	4	4		
				5	3		
				6	2		
0	25	0	20	0	28	8	גיא ורז
1	7	1	20	1	10		
		2	5	2	7		
		3	1	3	2		
				4	3		
				5	4		
				6	3		

ניתן לראות בבירור את ההבדלים בין המערכות, מבחינים ביעילות בליעה במערכת מס' 1 לעומת האחרות.

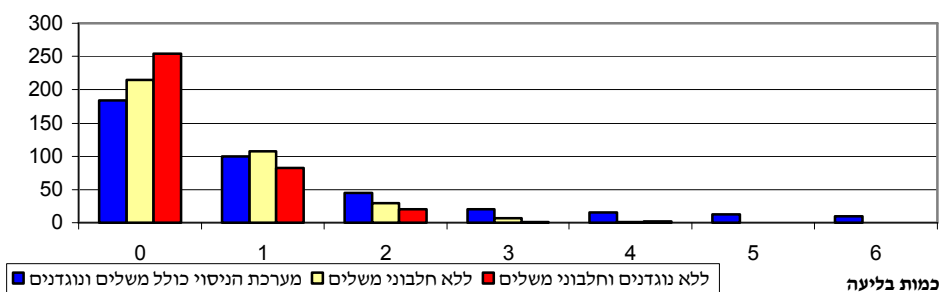
**טבלה מס' 4: בליעת קנדידה ע"י פגוציטים – תוצאות אישיות- ניתוח סטטיסטי**

מערכת 3	מערכת 2	מערכת 1	
9	12	23	סה"כ תאים שבלעו
50	50	50	סה"כ תאים שנצפו
18	24	46	היחס בין התאים שבלעו לכלל התאים שנצפו (%)



גרף מס' 1: יעילות הבליעה של 3 המערכות - תוצאות אישיות

**כמות הפגוציטים שביצעו בליעה של מס' תאי קנדידה**



גרף מס' 2: הצגה סטטיסטית של כלל הקבוצות

**טבלה מס' 5: בליעת קנדידה ע"י פגוציטים – ריכוז תוצאות כיתתי**

מערכת 3	מערכת 2	מערכת 1	שמרים שנבלעו
254	215	184	0
82	107	100	1
20	30	45	2
1	7	20	3
2	1	15	4
		12	5
		10	6
105	145	202	סה"כ תאים שבלעו
359	360	386	סה"כ תאים שנצפו
29.25	40.28	52.33	היחס בין התאים שבלעו לכלל התאים שנצפו (%)

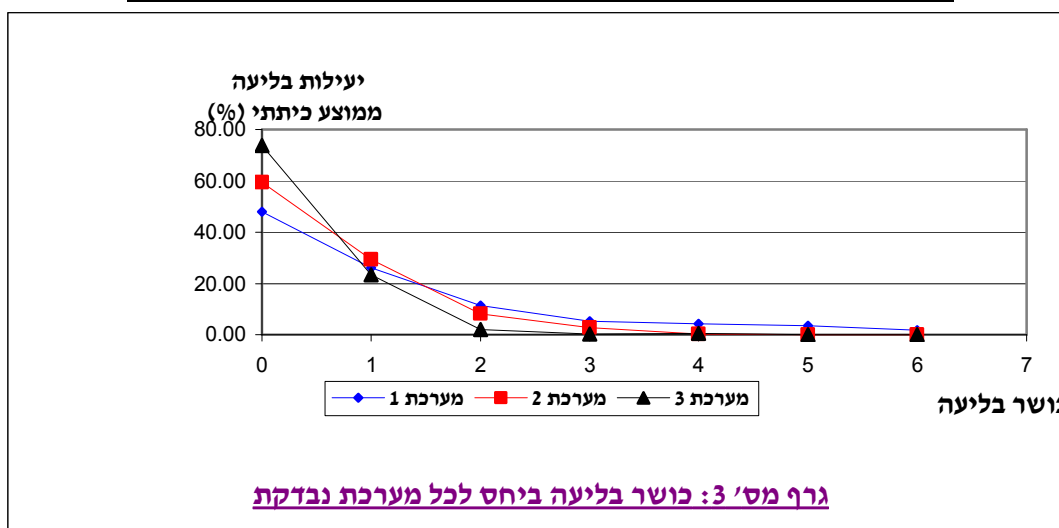


**טבלה מס' 6: בליעת קנדידה ע"י פגוציטים – ריכוז תוצאות כיתתי וניתוח סטטיסטי**

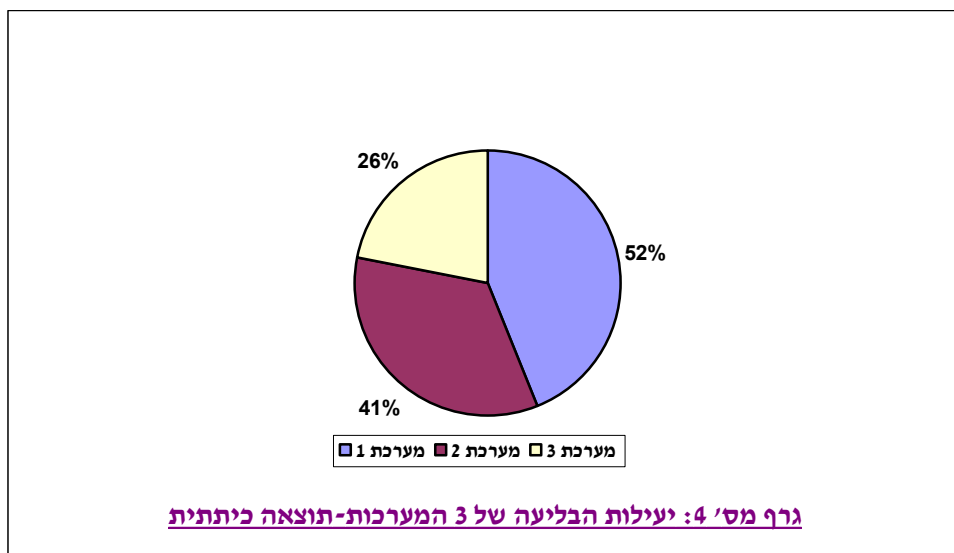
מערכת 3					מערכת 2					מערכת 1						מס' שמרים שבלע פגוציט	מס' פגוציטים שבלעו ביחס לכלל הפגוציטים שנבלעו (%)
4	3	2	1	0	4	3	2	1	0	6	5	4	3	2	1		
0.00	0.00	2.00	16.00	82.00	0.00	0.00	2.00	22.00	76.00	0.00	0.00	2.00	8.00	22.00	14.00	54.00	1 זוג
0.00	0.00	2.00	32.00	66.00	0.00	2.00	12.00	38.00	48.00	2.00	0.00	6.00	4.00	16.00	34.00	38.00	2 זוג
0.00	0.00	4.00	24.00	72.00	2.00	0.00	8.00	34.00	56.00	0.00	2.04	2.04	2.04	14.29	46.94	32.65	3 זוג
0.00	2.00	2.00	18.00	78.00	0.00	4.00	8.00	18.00	70.00	0.00	6.00	2.00	8.00	10.00	40.00	34.00	4 זוג
0.00	0.00	2.50	22.50	75.00	0.00	0.00	0.00	35.29	64.71	2.86	2.86	2.86	2.86	8.57	28.57	51.43	5 זוג
4.00	0.00	4.00	32.00	60.00	0.00	8.00	10.00	26.00	56.00	0.00	4.00	4.00	4.00	8.00	12.00	68.00	6 זוג
0.00	0.00	0.00	20.00	80.00	0.00	6.06	15.15	18.18	60.61	4.44	6.67	8.89	8.89	0.00	15.56	55.56	7 זוג
0.00	0.00	0.00	21.88	78.13	0.00	2.17	10.87	43.48	43.48	5.26	7.02	5.26	3.51	12.28	17.54	49.12	8 זוג
0.50	0.25	2.06	23.30	73.89	0.25	2.78	8.25	29.37	59.35	1.82	3.57	4.13	5.16	11.39	26.08	47.84	ממוצע כיתתי (%)
1.41	0.71	1.52	5.94	7.54	0.71	3.02	5.05	9.64	10.85	2.17	2.83	2.46	2.69	6.48	13.23	12.17	סטיית תקן

**טבלה מס' 7: כושר בליעה ביחס לכל מערכת נבדקת – תוצאות כיתתיות**

6	5	4	3	2	1	0	יכולת בליעה	
1.82	3.57	4.13	5.16	11.39	26.08	47.84	מערכת 1	ממוצע כיתתי
0	0	0.25	2.78	8.25	29.37	59.35	מערכת 2	
0	0	0.5	0.25	2.0625	23.297	73.89	מערכת 3	



ניתן לראות בבירור כי המערכת היעילה ביותר היא מערכת 1 בה אחוזי הבליעה הם הגבוהים ביותר.



### ניתוח תוצאות הבליעה (שאלה 3):

המערכות בניסוי מתוארות להלן ( כל מערכת מכילה רכיבים בנפחים שווים המתוארים מטה) :

#### מערכת מס' 1

הכילה לויקוציטים, קנדידה, ופלסמה. פלסמת הדם מכילה נוגדנים שונים שהגוף נחשף בעבר לפתוגן שלהם ובנוסף מכילה את חלבוני מערכת המשלים אשר משמשים כאופסונינים בתהליך הפגוציטוזה, ולכן במבחנה זו נצפה לראות שיעור גבוה של פאגוציטוזה. ניתן לראות, כי אכן השיעור הגבוה ביותר של הפגוציטוזה התקבל במערכת זו אשר הכילה נוגדנים שונים בפלסמה שנחשפו בעבר לשמר (שמר זה ידוע כמזהם נפוץ של הפה ודרכי המין והשתן) ואת חלבוני מערכת המשלים שעוזרים בהכרה ובפעולה מוגברת של פאגוציטוזה. על התאים הפגוציטים ישנם רצפטורים ל-Fc של הנוגדן ורצפטורים ל-C'3b של המשלים, ולאחר שהמשלים נקשר לקומפלקס נוגדן אנטיגן, הרצפטור נקשר אליהם גם כן וע"י כך חלה הגברה של תהליך הפגוציטוזה.

#### מערכת מס' 2

הכילה לויקוציטים, קנדידה, ופלסמה שעברה דקומפלמנטציה (הרס של חלבוני המשלים), ולכן במבחנה זו נצפה לראות שיעור נמוך יותר של תהליך הפגוציטוזה. ניתן לראות שאכן הייתה ירידה בפאגוציטוזה וזאת עקב הפלסמה שעברה דקומפלמנטציה נוצר מצב של פגיעה בחלבוני מע' המשלים, כלומר ישנה רק מער' אופסוניזציה אחת והיא הנוגדנים שנחשפו בעבר לשמר זה, וע"י כך ייווצר קומפלקס נוגדן – אנטיגן, ה-Fc של הנוגדן יקשר לרצפטור של הפגוציטים. בשל כך קיבלנו כי יעילות הבליעה קטנה יותר מאשר מערכת 1, אך עדיין מתרחשת בליעה ברמה יחסית גבוהה.

#### מבחנה מס' 3

הכילה לויקוציטים, קנדידה, ומדיום, כלומר אינה מכילה כלל נוזל פלסמה, ולכן אין בה נוגדנים ולא חלבוני משלים להגברת הפגוציטוזה. מבחנה זו מהווה ביקורת ע"מ לבדוק את יעילות הפגוציטוזה ללא נוכחות אופסונינים. ניתן לראות לפי התוצאות כי מתרחשת בליעה אך היא מינימאלית. אין גורמים חיצוניים מהפלסמה שעוזרים בתהליך הבליעה.

### (שאלה 4) אם הפלסמה מכילה רק נוגדנים מסוג IgM איזה תוצאות היו מתקבלות בכל אחת ממבחנות הניסוי ולמה?

אם הפלסמה הייתה מכילה רק נוגדנים מסוג IgM התוצאות שהיינו צופים לקבל הן :  
**מערכת 1:** ידוע כי לנוגדני IgG אפיניות גבוהה לרצפטור ל-Fc מאשר IgM ואי הימצאותם בפלסמה תביא לירידה משמעותית בבליעה על ידי התאים הפגוציטים, כמו כן על מנת שיהיה

קישור ל-FcR צריך להיות קישור בין הנוגדן לאנטיגן, ידוע כי לנוגדני IgG אשר מופיעים בפלסמה כתגובה שניונית אפיניות גבוהה יותר לאנטיגן מאשר IgM, בשל דברים אלו נצפה לקבל ירידה במספר התאים שמבצעים פאגוציטוזה, המערכת היחידה שתפעל לאופסוניזציה של הפגוציטוזה הינה מערכת המשלים. (כלומר נצפה לתוצאות כמו במערכת 2 בניסוי המקורי).

**מערכת 2:** נצפה לירידה משמעותית במספר התאים שמבצעים פאגוציטוזה, זאת מאחר מהפלסמה עברה דקומפלמנטציה כלומר הרס של מערכת המשלים, על כן לא ימצאו אופסונינים (מעודדי פאגוציטוזה), כגון: מער' משלים, נוגדנים מסוג IgG. (כלומר נצפה לתוצאות כמו במבחנה 3 בניסוי המקורי).

**מערכת 3:** במבחנה זו לא נצפה לשינוי משמעותי, זאת מאחר ובכל מקרה בניסוי המקורי לא היו בה חלבונים/נוגדנים המעודדים אופסוניזציה, ואם נעשה את הניסוי עם פלסמה המכילה רק נוגדנים מסוג IgM אנו באותו מצב של תכולת מערכת כלומר עדיין ללא מעודדי פאגוציטוזה, ולכן נצפה לאותן התוצאות.

את כל הני"ל נוכל להסיק על סמך זה שהנוגדן IgM בפלסמת הדם מופיע בצורה שאינה מאפשרת קישור בין נוגדן לפגוציט, (פנטמר).

ניתן לראות כי התוצאות שקיבלנו תואמות בקירוב לתוצאות הכיתתיות.

### (שאלה 5) האם צריך להוסיף לניסוי עוד ביקורות?

בניסוי זה ניתן להוסיף ביקורות נוספות :

1. מערכת ללא נוגדנים, אך עם מערכת חלבונים המשלים ולבדוק כיצד היא תשפיע על הפגוציטוזה. ולכן ניתן להוסיף מערכת 4 שתכיל לויקוציטים שהופרדו מפלסמה שלא עברה טיפול, קנדידה ופלסמה ממקור הומאני שעברה טיפול לפגיעה בנוגדנים, למשל בחומר DTT אשר פוגע בקשרי S-S אצל הנוגדן או פפסין/פאפאין המפרקים את הנוגדנים. התוצאה לה נצפה היא שמע' המשלים תפעל במסלולים שאינם דורשים קישור של אנטיגן נוגדן במסלול הקלאסי (מאחר ואין נוגדנים ליצירת קומפלקס זה) אלא במסלולים אחרים כמו למשל המסלול האלטרנטיבי, או מסלול הלקטין.
2. מערכת המכילה קנדידה, נוגדנים ומע' משלים, שתבדוק איך תתבצע התגובה החיסונית ללא לויקוציטים כלל.

### (שאלה 6) תכנן ניסוי שיבדוק מה תרומתה של מער' המשלים לפאגוציטוזה ללא נוכחות נוגדנים?

נתכנן את המערכות הר"מ :

#### **מערכת מס' 1:**

לויקוציטים, שמר קנדידה, פלסמה ממקור הומוגני לאחר טיפול בפפסין ו/או פאפאין, (מפרקים את הנוגדנים לשני חלקים: חלק קבוע וחלק ווריאבילי), כך לא יוכלו לתפקד כאופסונינים.  
**מטרה:** לקבל תוצאות על השפעת מער' המשלים (בלבד) על יעילות הפגוציטוזה ללא נוגדנים כלומר, ללא שימוש במסלול הקלאסי שלה ע"י הכרה של קומפלקס אנטיגן נוגדן, אלא רק ע"י המסלולים העקיפים (מסלול אלטרנטיבי, מסלול הלקטין).

#### **מערכת מס' 2:**

לויקוציטים, שמר קנדידה, מדיום ניסוי  
**מטרה:** בעזרת מבחנה זו שבה אין לנו נוגדנים ומער' משלים נוכל להשוות את יעילות הפגוציטוזה בהשוואה למערכת 1 שבה בדקנו את יעילות מע' המשלים ללא נוגדנים. (מבחנת ביקורת).

#### **מערכת מס' 3:**

**מטרה:** ביקורת נוספת ובה פלסמה שלא עברה טיפול כלשהו (מכילה נוגדנים + משלים), לויקוציטים, שמר קנדידה, כדי לוודא שתגובה חיסונית אכן מתרחשת שכן יכולה להיות בעיה בלויקוציטים עצמם.

### (שאלה 7) הסבר איך ואם יכולים להיות מופעלים שלושת מסלול המשלים בתנאי הניסוי שביצענו

מסלולי מע' המשלים הם :

1. מסלול קלאסי – הפעלה על ידי קישור לקומפלקס Ag-Ab, אשר יוביל לקסקדת תגובות אנזימטיות שבסופן החלבון C3 יהפוך להיות אקטיבי.
  2. מסלול אלטרנטיבי – קישור מרכיבי מע' המשלים אל האנטיגן, אשר תוביל להתפרקות C3 באופן ספונטאני והפיכתו לאקטיבי.
  3. מסלול ה-Lectin – קישור למנוז ע"י הממבראנה החיצונית של פתוגנים, אשר יאפשר קישור MBL ובשרשרת של תגובות הפעלה של מערכת המשלים.
- בניסוי שביצענו מערכת המשלים פעלה רק במערכת מס' 1 (אנו מניחים כי מערכת המשלים פעלה בכל 3 מסלוליה) שלושת מסלולי ההפעלה השונים שלה.
- מערכת 2 הכילה פלסמה אשר עברה דה-קומפלמנטציה ולכן מערכת המשלים לא תוכל לבוא לידי ביטוי.
- מערכת 3 לא הכילה כלל מערכת משלים.

**(שאלה 8) חולה מגיע עם תלונה של זיהום חמור של דרכי הנשימה עם קנדידה. תכנן סידרת ניסויים של פאגוציטוזה (בדומה למה שבוצע במעבדה) שיבדקו את התפקוד של כל אחת מהמרכיבים של מערכת החיסון שיכולים לגרום לכשל חיסוני כזה.**

לפני ביצוע הניסוי לשאול את השאלות הבאות :

- האם לאדם החולה יש בעיה בלויקוציטים ?
- האם לאדם החולה יש בעיה במע' המשלים ?
- האם לאדם החולה יש בעיה בייצור נוגדנים כנגד קנדידה ?
- האם הבעיה היא בקנדידה עצמה ?

**מערכת 1:**

לויקוציטים פלסמה וקנדידה (wild type) מאדם בריא. מטרה : משמש כביקורת.

**מערכת 2:**

לויקוציטים ופלסמה מאדם בריא, קנדידה מהאדם החולה. מטרה : בדיקה כי אכן הבעיה הינה במערכת החיסונית של החולה ואינה בשל זן אלים של קנדידה.

**מערכת 3:**

לויקוציטים מאדם בריא, פלסמה וקנדידה מהאדם החולה. מטרה : בדיקה האם הכשל החיסוני מקורו בתאים הפגוציטים בחולה. במידה והייתה פאגוציטוזה יעילה כמו במערכת הביקורת, הבעיה הינה בתאים הפגוציטים של החולה, במידה ולא הבעיה הינה במשלים או בנוגדנים ויש להמשיך לבדיקה הבאה.

**מערכת 4:**

לויקוציטים מאדם בריא, קנדידה מהחולה, פלסמת החולה אשר עברה טיפול להרס הנוגדנים, פלסמת אדם בריא שעברה דה-קומפלמנטציה. מטרה : בדיקה האם הכשל החיסוני הינו במערכת המשלים של האדם החולה. במידה ולא הייתה פאגוציטוזה יעילה כמו במערכת הביקורת, הבעיה הינה במערכת המשלים של החולה.

**מערכת 5:**

לויקוציטים מאדם בריא, קנדידה מהחולה, פלסמת החולה אשר עברה דה-קומפלמנטציה, פלסמת אדם בריא שעברה טיפול להרס הנוגדנים. מטרה : בדיקה האם הכשל החיסוני הינו בנוגדנים של האדם החולה. במידה ולא הייתה פאגוציטוזה יעילה כמו במערכת הביקורת, הבעיה הינה בנוגדנים של החולה.