



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

Ανοσολογικές διαταραχές και σύγχρονες τεχνικές διάγνωσής τους

ΚΟΤΣΙΟΥ ΣΟΡΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής: ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ

Πάτρα, Δεκέμβριος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



Ανοσολογικές διαταραχές και σύγχρονες τεχνικές διάγνωσής τους

ΚΟΤΣΙΟΥ ΣΟΦΙΑ

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Διαμάντης Σίδερης

Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Αικατερίνη Κωνσταντίνου

Πάτρα, Δεκέμβριος 2023

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διπλωματική μου εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Διαμάντη Σίδερη για την πολύτιμη βοήθειά του και την καθοδήγησή του.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συνεργάτες μου για την στήριξή τους και κυρίως θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Βαλέρια Κοτσιούγκ και Νίκο Λαγκωνάκη, για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την κατανόησή τους και την οικονομική και συναισθηματική τους στήριξη.

*Αφιερωμένο στους γονείς μου
που δεν παύουν να πιστεύουν σε μένα.*

Περίληψη

Το ανοσοποιητικό μας σύστημα είναι ένα πολυσύνθετο δίκτυο συντονισμένων αλληλεπιδράσεων των κυττάρων, ιστών και οργάνων. Αποτελείται από δύο τύπους συστημάτων, την έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία, τα οποία δρουν συνεργαστικά μεταξύ τους. Κύριος ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η προστασία και η άμυνα του οργανισμού από ξένα σώματα με τη δράση κυρίως των T και B λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, η εύρυθμη λειτουργία και η ομοιοστασία του ανοσοποιητικού μπορούν να διαταραχθούν προκαλώντας μη μεταδοτικές ασθένειες, όπως υπερευαισθησία, αλλεργίες, φλεγμονές, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνο. Σημαντικότεροι παράγοντες για την πρόληψη και διατήρηση της καλής λειτουργίας του οργανισμού αποτελούν η διατροφή, ο τρόπος ζωής και το περιβάλλον. Η εξειδίκευση των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν και να προσδένονται στα αντιγόνα (ξένα σώματα) προάγοντας την ανοσολογική απόκριση, καθώς και η ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων αποτέλεσαν τη βάση στην οποία στηρίζονται οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί. Οι ανοσοπροσδιορισμοί χωρίζονται ανάλογα με το είδος του ιχνηθέτη στους ισοτοπικούς, στους οποίους γίνεται χρήση ραδιοϊσοτόπων, αλλά τα αντιδραστήρια είναι βλαβερά και επικίνδυνα για την υγεία και το περιβάλλον, και στους μη ισοτοπικούς, όπου χρησιμοποιείται ένζυμο, φθορίζουσα ουσία ή γίνεται μέτρηση παραγόμενης ακτινοβολίας (μέθοδος χημειοφωταύγειας). Χωρίζονται, επιπλέον, σύμφωνα με τη φάση στην οποία βρίσκονται σε ετερογενείς (στερεά φάση) και ομογενείς (ελεύθερου διαλύματος). Επιπρόσθετα, ανάλογα με τον αριθμό των αντισωμάτων που χρησιμοποιούν, χωρίζονται σε ανταγωνιστικές, όπου χρησιμοποιείται ένα ειδικό αντίσωμα, και τις μη ανταγωνιστικές, όπου χρησιμοποιούνται δύο. Λόγω της εξειδίκευσής τους από τη σχέση αντιγόνου και αντισώματος και τη δημιουργία ισχυρού ανοσοσυμπλόκου, οι ανοσοπροσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Σε συνδυασμό με την ευκολία εφαρμογής τους, την ταχύτητα και τη δυνατότητα ανάλυσης ταυτόχρονα πολλών δειγμάτων, καθώς και τη δυνατότητα αυτοματισμού, οι ανοσοπροσδιορισμοί βρίσκονται στην κορυφή των βασικότερων αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια βιοχημείας, έρευνας και κλινικά εργαστήρια και νοσοκομεία.

Λέξεις – Κλειδιά: ανοσοποιητικό σύστημα, αντιγόνα, αντισώματα, ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, διαταραχές ανοσοποιητικού

Immune disorders and their modern diagnostic techniques

Kotsiou or Cociug Sorina

Abstract

Our immune system is a complex net of coordinated interactions of cell, tissue and organs. It consists of two types of systems, innate and adaptive immunity, which work together synergistically. The main role of the immune system is to protect and defend the body from foreign bodies with the action of mainly T and B lymphocytes. However, the proper functioning and homeostasis of the immune system can be disturbed, causing non-communicable diseases, such as hypersensitivity, allergies, inflammations, autoimmune diseases, cancer. The most important factors for the maintenance of good functioning are nutrition, way of living and environment. The specificity of antibodies to recognize and bind to antigens (foreign bodies) promoting the immune response, as well as the development of monoclonal antibodies, are the principles on which immunochemical assays are based. Immunoassays are divided according to the type of label into isotopic, where radioisotopes are used, but the reagents are harmful and dangerous for health and the environment, and to non-isotopic, where enzyme or fluorescent substance is used or the produced radiation is measured (method chemiluminescence). They are also divided according to the phase in which they are in heterogeneous (solid phase) and homogeneous (free solution). Moreover, according to the number of antibodies they are classified into competitive, where one specific antibody is used, and non-competitive, where two are used. Due to the specificity of the antigen-antibody and the creation of a strong immune complex, immunoassays are characterized by high sensitivity and accuracy. In combination with their ease application, speed and the ability to analyze many samples simultaneously, as well as the possibility of

automation, immunoassays are at the top of the most basic analytical techniques used in biochemistry, research and clinical laboratories and hospitals.

Keywords: antibodies, antigens, immune disorders, immune system, immunochemical assays

Περιεχόμενα

<u>Ευχαριστίες</u>	<u>iv</u>
<u>Περίληψη</u>	<u>v</u>
<u>Abstract</u>	<u>vi</u>
<u>Περιεχόμενα</u>	<u>vii</u>
<u>Κατάλογος Εικόνων</u>	<u>ix</u>
<u>Κατάλογος Πινάκων</u>	<u>xi</u>
<u>Συντομογραφίες & Ακρωνύμια</u>	<u>xii</u>
1. <u>Εισαγωγή</u>	<u>1</u>
1.1 <u>Σκοπός της μελέτης</u>	<u>2</u>
2. <u>Το ανοσοποιητικό σύστημα</u>	<u>4</u>
2.1 <u>Ανοσολογία</u>	<u>4</u>
2.1.1 <u>Ιστορική αναδρομή</u>	<u>5</u>
2.2 <u>Ανοσία</u>	<u>6</u>
2.3 <u>Ανοσολογική απόκριση</u>	<u>6</u>
2.4 <u>Αντιγόνα</u>	<u>12</u>
2.5 <u>Αντισώματα</u>	<u>13</u>
2.5.1 <u>Μονοκλωνικά αντισώματα</u>	<u>14</u>
2.5.1.1 <u>Ιστορική αναδρομή</u>	<u>15</u>
2.5.1.2 <u>Διαδικασία παραγωγής</u>	<u>15</u>
2.5.1.3 <u>Χρήσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων</u>	<u>16</u>
3. <u>Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος</u>	<u>18</u>
3.1 <u>Υπερευαισθησία</u>	<u>18</u>
3.2 <u>Ανοσολογική ανεπάρκεια</u>	<u>20</u>
3.3 <u>Αυτοανοσία</u>	<u>21</u>
3.4 <u>Αυτοφλεγμονή</u>	<u>23</u>
3.5 <u>Αλλεργία</u>	<u>23</u>

3.6	<u>Μη μεταδοτικές ασθένειες</u>	24
3.7	<u>Η σημασία της διατροφής</u>	25
3.7.1	<u>Οι βιοενεργές ενώσεις και τα οφέλη τους στην υγεία</u>	26
3.7.2	<u>Οφέλη για την υγεία από τα προβιοτικά</u>	29
3.8	<u>Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι</u>	31
4.	<u>Ανοσοχημικές μέθοδοι</u>	33
4.1	<u>Κριτήρια επιλογής και καταλληλότητας των ανοσοχημικών μεθόδων</u>	37
4.2	<u>Ισοτοπικοί ανοσοπροσδιορισμοί</u>	41
4.2.1	<u>Ραδιοανοσοανάλυση (Radioimmunoassay, RIA)</u>	42
4.2.2	<u>Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (Immunoradiometric assay, IRMA)</u>	46
4.3	<u>Ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού (Fluorescence immunoAssays, FIA)</u>	49
4.3.1	<u>Ανοσοπροσδιορισμός Μεταφοράς Διέγερσης Φθορισμού (Fluorescence Excitation Transfer Immunoassay – FETIA)</u>	54
4.3.2	<u>Ανοσοπροσδιορισμός Πόλωσης Φθορισμού (Fluorescence Polarization Immunoassay – FPIA)</u>	54
4.3.3	<u>Ανοσοπροσδιορισμός Φθορισμού Συνδεδεμένου Ενζύμου (Enzyme-Linked Fluorescence Immunoassay, ELFIA)</u>	56
4.3.4	<u>Ανοσοπροσδιορισμοί Χρονικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού (Time Resolved Fluorescence Immunoassays, TR-FIA)</u>	56
4.4	<u>Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassay, CLIA)</u>	58
4.5	<u>Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί (Enzyme ImmunoAssays, EIA)</u>	59
4.5.1	<u>Ενισχυμένη Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)</u>	62
4.5.2	<u>Προσδιορισμοί ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου ενζύμου (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)</u>	64
5.	<u>Συμπεράσματα</u>	69
	<u>Βιβλιογραφία</u>	72

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1. Ολοκληρωμένο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα: (i) ανατομικά και φυσιολογικά εμπόδια. (ii) έμφυτη ανοσία και (iii) προσαρμοστική ανοσία (Turvey and Broide, 2010).	8
Εικόνα 2.2. Ηλεκτρονική μικρογραφία που δείχνει ένα μακροφάγο έτοιμο να καταβροχθίσει ένα βακτήριο (Sompayrac, 2022).	9
Εικόνα 2.3. Διαδικασία φαγοκυττάρωσης – καταστροφή εισβολέα (Sompayrac, 2022).	10
Εικόνα 2.4. Η ανταπόκριση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος στην μόλυνση (Nicholson, 2016)	11
Εικόνα 2.5. Σύνδεση ενός απτενίου με ένα μόριο φορέα για τη δημιουργία ανοσογόνου (Mohanty and Leela, 2013)	12
Εικόνα 2.6. Δομή αντισώματος	13
Εικόνα 2.7. Γενική δομή των πέντε κατηγοριών αντισωμάτων (Kindt et al., 2007)	14
Εικόνα 2.8. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mohanty and Leela, 2013)	16
Εικόνα 3.1. Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Muñoz-Carrillo et al., 2018)	19
Εικόνα 3.2. Αποδιδόμενο κλάσμα μη μεταδοτικών ασθενειών (MMA) για επιλεγμένους παράγοντες κινδύνου ανά ομάδα ασθενειών το 2016 (Prüss-Ustün et al., 2019).	32
Εικόνα 4.1 Ανταγωνιστική μέθοδος (Καρκαλούσος κα., 2015)	35
Εικόνα 4.2 Μη ανταγωνιστική μέθοδος (Καρκαλούσος κα., 2015)	35
Εικόνα 4.3. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (Wild, 2013)	38
Εικόνα 4.4. Cross reactivity σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς a) ο παρεμποδιστής συνδέεται με το αντίσωμα πρόσδεσης b) ο παρεμποδιστής συνδέεται με το αντίσωμα αντίχενωσης c) ο παρεμποδιστής συνδέεται και στα δύο είδη αντισωμάτων (Wild, 2013).	39
Εικόνα 4.5 Διαφορά ακρίβειας και πιστότητας μιας μεθόδου (Καρκαλούσος κα., 2015)	41
Εικόνα 4.6 Ραδιοανοσοανάλυση (RIA) – ανταγωνιστική μέθοδος	43
Εικόνα 4.7 Εφαρμογή ραδιοανοσοανάλυσης (RIA) – βήματα (Dwivedi, 2022)	44

Εικόνα 4.8 Ραδιοανοσοανάλυση – διαχωρισμός με προσθήκη δεύτερου αντισώματος: Α) Σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου, Β) ανταγωνισμός από προσθήκη ραδιοσημασμένου αντιγόνου, Γ) προσθήκη δεύτερου αντισώματος το οποίο προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, Δ) συλλογή συμπλόκων αντισωμάτων σε ίζημα έπειτα από φυγοκέντρωση με απομάκρυνση του υπερκείμενου – Στη συνέχεια μετράται η ραδιενέργεια στο ίζημα, όπου τα επίπεδα ακτινοβολίας θα είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα των αντιγόνων στο δείγμα, Ε) Παράδειγμα τυπικής καμπύλης αναφοράς (Grange et al., 2014).	45
Εικόνα 4.9 Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (IRMA) – μη ανταγωνιστική μέθοδος (Miles, 1975)	47
Εικόνα 4.10 “2 θέσεων” Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (2-site IRMA) (Miles, 1975)	48
Εικόνα 4.11. Απορρόφηση και εκπομπή ενέργειας φωτονίου προκαλώντας φθορισμό (με άμεση μετάβαση) ή φωσφορισμό (μέσω μιας ενδιάμεσης κατάστασης) (Smith et al., 1981).	50
Εικόνα 4.12 (Ι) Ανάλυση άμεσου ανοσοφθορισμού: χρησιμοποιεί αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην κυτταρική επιφάνεια. (ΙΙ) Ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού: η αντίχρευση βασίζεται σε ένα δευτερεύον αντίσωμα σημασμένο με μια φθορίζουσα ουσία (Koivunen and Krosgsrud, 2006).	51
Εικόνα 4.13 Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση πολωμένης ακτινοβολίας (Fluorescent Polarisation Immunoassay, FPIA) (Wu et al., 2020).	55
Εικόνα 4.14. Αρχή μέτρησης Χρονικά διαχωριζόμενου Φθορισμού (Diamandis, E.P., 1988).	57
Εικόνα 4.15. Αρχή των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών (Voller et al., 1976).	60
Εικόνα 4.16. Αρχή της EMIT. Α) ο ιχνηθέτης (αναλυόμενη ένωση/φάρμακο δεσμευμένο στο ένζυμο) δεσμεύεται από το αντίσωμα, οπότε το ένζυμο είναι ανενεργό. Β) η αναλυόμενη ένωση ανταγωνίζεται τον ιχνηθέτη και δεσμεύεται αυτή στο αντίσωμα. Ο ελεύθερος ιχνηθέτης ενώνεται με το υπόστρωμα, γίνεται ενεργός και παράγεται μετρούμενο σήμα (Koivunen and Krosgsrud, 2006), Γ) συμπάραγοντας NAD και παραγόμενο NADH, Δ) πρότυπη καμπύλη (Castelli et al., 2022).	63
Εικόνα 4.17 Βασικά στάδια τεχνικής ELISA (Midhun et al., 2021).	66
Εικόνα 4.18 Διαγραμματική προβολή όλων των τύπων ELISA (Midhun et al., 2021).	66

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά έμφυτης και επίκτητης (προσαρμοστικής) ανοσίας (Kindt et al., 2007; Turvey and Broide, 2010)	9
Πίνακας 3.1 Παράγοντες αυτοάνοσης νόσου (Stojanovich and Marisavljevic, 2008).	22
Πίνακας 4.1 Βασικές κατηγορίες ανοσοχημικών μεθόδων (Καρκαλούςος κα., 2015)	36
Πίνακας 4.2 Κατηγοριοποίηση συχνών ανοσοχημικών προσδιορισμών (Slagle and Ghosn, 1996)	36
Πίνακας 4.3 Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι ιχνηθέτες (Kricka and Park, 2014).	37
Πίνακας 4.4. Ένζυμα που χρησιμοποιούνται στους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς και τα χαρακτηριστικά τους (Καρκαλούςος et al., 2015)	61

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΛΗΡΗΣ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	
ACTH	Adrenocorticotropic hormone	Αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη
Ag	Antigen	Αντιγόνο
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας
ALP	Alkaline phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση
ANA	antinuclear antibodies	αντιπυρηνικών αντισωμάτων
CD20	cluster of differentiate 20	σύμπλεγμα διαφορετικών 20
CLIA	Chemiluminescence immunoassay	Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας
CV	coefficient of variation	συντελεστή μεταβλητότητας
DAMPs	damage-associated molecular patterns	μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη
DCs	Dendritic cells	Δενδρικά κύτταρα
DFA	direct immunofluorescence assay	ανάλυση άμεσου ανοσοφθορισμού
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EIA	Enzyme ImmunoAssays	Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί
ELFIA	Enzyme-Linked Fluorescence Immunoassay	Ανοσοπροσδιορισμός Φθορισμού Συνδεδεμένου Ενζύμου

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	ροσδιορισμός ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου ενζύμου
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Τεχνική ανοσοδοκιμασίας ενισχυμένου ενζύμου
FETIA	Fluorescence Excitation Transfer Immunoassay	Ανοσοπροσδιορισμός Μεταφοράς Διέγερσης Φθορισμού
FIA	Fluorescence immunoAssays	Ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού
FITCH	Fluorescence In Situ Hybridization	φθορισμός in situ υβριδισμός
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassa	Ανοσοπροσδιορισμός Πόλωσης Φθορισμού
FSH	follicle stimulating hormone	ωοθυλακιοτρόπος ορμόνης
G6-PD	glucose 6-phosphate dehydrogenase	αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης,
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Γλοιακή ινιδώδης όξινη πρωτεΐνη
HCG	Human chorionic gonadotropin	Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη
Hep-2	human epithelial	ανθρώπινο επιθήλιο
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2	υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2
HGH	Human growth hormone	Ανθρώπινη αυξητική ορμόνη
HRP	horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση χρένου
Ig	Immunoglobulins	ανοσοσφαιρίνες

IFA	indirect immunofluorescence assay	ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού
IRMA	Immunoradiometric assay	Ανοσοραδιομετρική ανάλυση
LH	Luteinizing Hormone	Ωχρινότροπος ορμόνη
NAD	nicotinamide-adenine dinucleotide	νικοτιναμίδιο-αδενοδινουκλεοτίδιο
ng	nanograms	νανογραμμάρια
NK	Natural Killer	Κύτταρα φυσικού φονέα
nm	nanometers	νανόμετρο
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	μοριακά μοτίβα παθογόνων
PRRs	pattern recognition receptors	υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων
RIA	radioimmunoassay	ραδιοανοσοανάλυση
SD	standard deviation	τυπική απόκλιση
TMRITC	Tetrapethyl rhodamine isothiocynate	ισοθειοκυανική τετραμεθυλο-ροδαμίνη
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
TR-FIA	Time Resolved Fluorescence Immunoassays	Ανοσοπροσδιορισμοί Χρονικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού
TSH	Thyroid-stimulating hormone	Θυρεοειδοτρόπος ορμόνη
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης
VEGF	vascular endothelial growth factor	αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα

β-GAL	β-Galactosidase	β-γαλακτοζιδάση
μL	Microliters	Μικρόλιτρα
MMA		Μη μεταδοτικές ασθένειες
MMN		Μη μεταδοτικά νοσήματα
ΣΕΛ		συστηματικός ερυθματώδης λύκος
ΠΟΥ		Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

1. Εισαγωγή

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί κατέχουν ένα πολύπλοκο δίκτυο σχέσεων και αλληλεπίδρασης, το οποίο εντοπίζει και εξουδετερώνει απειλές από άλλα είδη. Οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός πολυσύνθετου δικτύου ιστών, κυττάρων και οργάνων συνιστούν το ανοσοποιητικό σύστημα και παρέχουν άμυνα ενάντια στις επιθέσεις των ξένων εισβολέων, όπως βακτήρια, ιοί και παράσιτα, ή την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Nicholson, 2016). Η λειτουργία και η αλληλεπίδραση των μοριακών και κυτταρικών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο και δυναμικό κυτταρικό δίκτυο που εκτελεί μυριάδες ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες (Sompayrac, 2022; Ginhoux et al., 2022). Ωστόσο, οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, η διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών από αυτό και η εύρυθμη λειτουργία του μπορεί να διαταραχθούν. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να οφείλονται είτε σε χαμηλή δραστηριότητα είτε σε υπερδραστηριότητα αυτού έναντι εσωτερικών ή εξωτερικών ερεθισμάτων προκαλώντας πολλές δυσλειτουργίες. Τέτοιες διαταραχές προκαλούν αυτοανοσία, από την επίθεση του ίδιου του οργανισμού σε υγιή κύτταρα, καρκίνο από την ανάπτυξη κακοηθών κυττάρων, τα οποία δεν μπορούν να αφαιρεθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα και άλλες μη μεταδοτικές ασθένειες (Ginhoux et al., 2022).

Σημαντικός παράγοντας στη διατήρηση της εύρυθμης λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και στη διαταραχή αυτού, αποτελεί το περιβάλλον, όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, καθώς επίσης ο τρόπος ζωής και η διατροφή. Η καλή, ποιοτική, υγιεινή διατροφή και συγκεκριμένα η κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων συμβάλλουν σημαντικά στη διατήρηση και βελτίωση της υγείας του ατόμου. Η λειτουργία των τροφίμων αυτών οφείλεται στις βιοενεργές ενώσεις που περιέχουν. Από την άλλη, η έλλειψη από τη διατροφή βασικών θρεπτικών συστατικών οδηγεί σε βάθος χρόνου σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού και επιδεινώνει την οποιαδήποτε υπάρχουσα ασθένεια (Tsoukalas et al., 2019).

Η διάγνωση μιας ασθένειας είναι βασική αρχή για την αποτελεσματικότητα και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκάστοτε θεραπείας. Αποτελεί υψίστης σημασίας η σωστή και

έγκαιρη διάγνωση, αν διαλογιστεί κανείς πως, παγκοσμίως, περίπου 1 στους 6 θανάτους οφείλεται σε ανίχνευση καρκίνου σε τελευταίο στάδιο και απρόσιτη διάγνωση.

Η διάγνωση μπορεί να αποτελεί απλή επιβεβαίωση της νόσου ή να συμπεριλαμβάνει διερεύνηση της ευαισθησίας ενός ατόμου σε διάφορες ασθένειες σύμφωνα με την ηλικιακή ομάδα στην οποία ανήκει (Kerry et al., 2021).

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση του αντισώματος έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου που εμπλέκεται με τη νόσο. Συγκεκριμένα, η υψηλή εξειδίκευση οφείλεται στην χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κυρίαρχες τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες ραδιοϊσότοπα, ένζυμα ή εκπέμπουν φθορισμό και οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας. Λόγω της μεγάλης ακρίβειας που παρουσιάζουν οι ανοσοπροσδιορισμοί, των χαμηλών ορίων ανίχνευσης και της ευκολίας εκτέλεσής τους, βρίσκονται στην κορυφή των βασικότερων αναλυτικών τεχνικών σε επίπεδο έρευνας αλλά και μεταξύ αυτών που χρησιμοποιούνται σε κλινικά εργαστήρια και νοσοκομεία (Bishop, 2020).

Η σωστή διάγνωση οποιασδήποτε διαταραχής του ανοσοποιητικού συστήματος πραγματοποιείται με την σωστή επιλογή κατάλληλης μεθόδου ανίχνευσης των αντισωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο. Η επιλογή και η αξιολόγηση καταλληλότητας μιας μεθόδου δεν είναι εύκολη διαδικασία και στηρίζονται σε μια πληθώρα κριτηρίων που καθορίζουν την ποιότητα της μεθόδου και αποτελούν την εξειδίκευση (Specificity), την ακρίβεια (Accuracy), το όριο ανίχνευσης (detection of limit), την ευαισθησία (sensitivity) και άλλα (Sahoo et al., 2018; Tozzoli and Bizzaro, 2020).

1.1 Σκοπός της μελέτης

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένας πολυσύνθετος κόσμος ιστών, κυττάρων και μορίων που λειτουργεί αρμονικά και προστατεύοντας τον οργανισμό από ξένες εισβολές. Η διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω υπερδραστηριότητας ή αδράνειας αποτελεί μεγάλο ενδιαφέρον και πολλές είναι οι εξάρσεις μη μεταδοτικών ασθενειών από δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, με κυρίαρχα τα αυτοάνοσα νοσήματα και τον καρκίνο. Καθώς οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί αποτελούν τις βασικότερες μεθόδους ανάλυσης και διάγνωσης των ασθενειών αυτών, η μελέτη επικεντρώνεται στις ισοτοπικές αναλύσεις, οι

οποίες χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες ραδιοϊσότοπα, και στις μη ισοτοπικές αναλύσεις, οι οποίες αποτελούνται από αυτές που χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες ένζυμα, που εκπέμπουν φθορισμό και στις μεθόδους χημειοφωταύγειας.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η παρουσίαση των διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος, οι πιθανοί λόγοι εμφάνισής τους και η σύγκριση, και η καταλληλότητα των ανοσοχημικών μεθόδων στη διάγνωση των διαταραχών αυτών, η ανάπτυξη των πλεονεκτημάτων τους και ο ρόλος τους σήμερα στα κλινικά εργαστήρια.

2. Το ανοσοποιητικό σύστημα

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί συνδέονται μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου σχέσεων και αλληλεπίδρασης, το οποίο χαρακτηρίζεται κυρίως από την προσπάθεια εντοπισμού και εξουδετέρωσης απειλών από άλλα είδη (Nicholson, 2016). Συγκεκριμένα, όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς που συμβάλλουν στη διατήρηση της σταθερότητας του εσωτερικού τους περιβάλλοντος, εξασφαλίζοντας έτσι την εύρυθμη λειτουργία του με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους. Η επιβίωση ενός οργανισμού εξαρτάται τόσο από τη συντονισμένη και αποτελεσματική λειτουργία των ιστών, των κυττάρων και των οργάνων του όσο και από την άμυνά του, η οποία αφορά τον εντοπισμό και την εξουδετέρωση απειλών από άλλα είδη. Συνεπώς ο οργανισμός προστατεύεται από εσωτερικούς (καρκινικά και αποπτωτικά κύτταρα) ή εξωτερικούς (παθογόνοι μικροοργανισμοί, τοξίνες) παράγοντες που θα μπορούσαν να διαταράξουν την ομαλή λειτουργία του. Οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός πολυσύνθετου δικτύου ιστών, κυττάρων και οργάνων συνιστούν το ανοσοποιητικό σύστημα και παρέχουν άμυνα ενάντια στις επιθέσεις των ξένων εισβολέων, όπως βακτήρια, ιοί και παράσιτα, ή την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Kindt et al., 2007; Nicholson, 2016; Czernek and Dühler, 2017; Norman et al., 2020).

2.1 Ανοσολογία

Η ανοσολογία αποτελεί κλάδο της ιατρικής και μελετά το ανοσοποιητικό σύστημα των οργανισμών καλύπτοντας τη σχέση μεταξύ του σώματος, των παθογόνων και της ανοσίας, της ικανότητας του οργανισμού να εξουδετερώνει τα ξένα σώματα (Sompayrac, 2022). Επίκεντρο της μελέτης της είναι η λειτουργία και η αλληλεπίδραση των μοριακών και κυτταρικών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο και δυναμικό κυτταρικό δίκτυο που εκτελεί μυριάδες ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες (Sompayrac, 2022; Ginhoux et al., 2022). Αυτός είναι και ένας από τους λόγους όπου η ανοσολογία αποτελεί ένα δύσκολο θέμα μελέτης, η πολυπλοκότητα του ανοσοποιητικού συστήματος και οι πολλές λεπτομέρειες οι οποίες δυσχαιρένουν την κατανόηση των εννοιών και την κάλυψη όλου του κλάδου. Ωστόσο, μια καλή αρχή είναι η εστίαση στη γενική εικόνα του κλάδου. Επιπλέον δυσκολία που αντιμετωπίζεται μελετώντας

την ανοσολογία είναι οι εξαιρέσεις που υπάρχουν σε κάθε κανόνα, όπως επίσης η συνεχόμενη εξέλιξη της γνώσης γύρω από το ανοσοποιητικό σύστημα (Sompayrac, 2022). Η λειτουργία των μοριακών και κυτταρικών συστατικών, αποτελώντας ένα πολυσύνθετο δίκτυο, καθώς και οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, αποτελούν τον κύριο λόγο δυσκολίας μελέτης του κλάδου αυτού (Nicholson, 2016; Sompayrac, 2022).

2.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η έννοια της ανοσίας και η ιστορία της ανοσολογίας ξεκινάνε ουσιαστικά από το 1798. Ο Άγγλος φυσικός Έντουαρντ Τζέννερ είναι αυτός που ανακάλυψε και θεμελίωσε τον εμβολιασμό και έσωσε πολλές ζωές από τον θανατηφόρο ιό της ευλογιάς. Συγκεκριμένα, στο εμβόλιο κατά της ευλογιάς χρησιμοποίησε έναν όμοιο ιό, αυτόν της ευλογιάς της αγελάδας, για να προκαλέσει ανοσία, ξεκινώντας έτσι την επιστήμη της ανοσολογίας και δικαίως θεωρείται Πατέρας της Ανοσολογίας (Smith, 2011; Bailey, 2011; Οικονομίδου, 2011).

Η ευλογιά χαρακτηρίζεται από έντονους πόνους στο κεφάλι, τη μέση και από υψηλό πυρετό, όπως επίσης από έντονα κόκκινα εξανθήματα τα οποία στη συνέχεια γίνονταν φουσκάλες γεμάτες υγρό (Riedel, 2005). Η ευλογιά ήταν η πιο θανατηφόρα αρρώστια που είχε δει ποτέ η ανθρωπότητα, προκαλώντας κατά τον 18^ο αιώνα θανατηφόρα ενδημικά και επιδημίες σε Βρετανία και το θάνατο περίπου 400 χιλιάδων ανθρώπων ετησίως στην Ευρώπη, καθώς επίσης και την τύφλωση του 1/3 των επιζώντων. Το ποσοστό θνησιμότητας κυμαινόταν από 20% έως 60% αφήνοντας τους περισσότερους επιζώντες με παραμορφωτικές ουλές, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας σε βρέφη προσέγγιζε το 80% στο Λονδίνο και το 98% στο Βερολίνο στα τέλη του 1800 (Behbehani, 1983; Riedel, 2005).

Είχε παρατηρηθεί ότι οι επιζώντες της ευλογιάς αποκτούσαν ανοσία και δεν κολλούσαν ξανά, όπως επίσης ότι δεν κολλούσαν οι γεωργοί που άρμεγαν τις αγελάδες. Έτσι, είχε δημιουργηθεί η υπόθεση ότι σε περιπτώσεις όπου ο οργανισμός είχε εκτεθεί στην ευλογιά των αγελάδων, ή αλλιώς δαμαλίτιδα, μια παρόμοιας αλλά πιο ήπιας μορφής ασθένεια, υπήρχε ανοσία στην ευλογιά. Ο Τζέννερ τόλμησε να αποδείξει αυτή την θεωρία. Τον Μάιο του 1796, μια νεαρή γυναίκα γαλακτοκόμος, η Σάρα Νέλμες, μολύνθηκε με τον ιό της δαμαλίτιδας από τις αγελάδες που άρμεγε στη φάρμα που εργαζόταν. Συγκεκριμένα

μολύνθηκε στο χέρι στο σημείο που είχε γρατζουνιθεί από αγκάθι και είχε δημιουργηθεί πληγή. Ο Τζέννερ πήρε δείγμα από την πληγή και εμβολίασε με το μικρόβιο της ευλογιάς της αγελάδας το μπράτσο ενός οχτάχρονου υγιέστατου αγοριού, του Τζέιμς Φιπς, κάνοντας δύο μικρές επιφανειακές τομές. Όταν το αγόρι συνήλθε από τα ήπια συμπτώματα, τον εμβολίασε ξανά με τον ιό της ευλογιάς. Δεν υπήρχαν ενδείξεις προσβολής από τον ιό, επιβεβαιώνοντας την θεωρία του (Smith, 2011; Plotkin, 2011). Την ίδια διαδικασία πειραμάτων επανέλαβε με επιτυχία και σε άλλα παιδιά. Το 1798, ο Τζέννερ δημοσίευσε τις ανακαλύψεις του με τίτλο “*Έρευνα επί των αιτίων και των αποτελεσμάτων της ευλογιάς*” (*An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae*). Ο Τζέννερ αποκάλεσε τη διαδικασία “vaccination”, εμβολιασμός, από το όνομα του ιού *variolae vaccinae*, ενώ ήταν και ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο *virus*, ιός (Smith, 2011).

2.2 Ανοσία

Η ικανότητα του οργανισμού να εντοπίζει τα ξένα σώματα και να τα εξουδετερώνει λέγεται ανοσία (Kindt et al., 2007; Nicholson, 2016; Czernek and Döchler, 2017; Norman et al., 2020). Οι μηχανισμοί της ανοσίας αποτελούνται από ένα μεγάλο εύρος ενεργειών, όπως την καταπολέμηση και καταστολή μιας μολυσματικής ασθένειας, την αναγνώριση και εξουδετέρωση ενός καρκινικού κυττάρου, την αποδοχή ή απόρριψη μοσχεύματος, τη δημιουργία αυτό-ανοσίας και την ανάπτυξη αλλεργικών αντιδράσεων (Medina, 2016). Τα κύτταρα και τα μόρια τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανοσία του οργανισμού αποτελούν το ανοσοποιητικό σύστημα.

2.3 Ανοσολογική απόκριση

Η συλλογική και συντονισμένη αντίδρασή τους στην είσοδο ξένου σώματος ονομάζεται ανοσολογική απόκριση ή ανοσοαπόκριση (Abbas et al., 2018).

Η ανοσοαπόκριση του ανθρώπου αποτελείται από τρία μέρη (2.1):

- 1) Ανατομικά και φυσιολογικά εμπόδια, τα οποία παρέχουν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στα παθογόνα και περιλαμβάνουν άθικτο δέρμα, ισχυρούς μηχανισμούς

κάθαρσης του βλεννογόνου, χαμηλό pH στομάχου και βακτηριολυτική λυσοζύμη στα δάκρυα, το σάλιο και άλλες εκκρίσεις (Turvey and Broide, 2010),

- 2) Την έμφυτη (μη ειδική) ανοσία, η οποία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας που όλοι οι οργανισμοί έχουν έμφυτα και στην οποία μέσω μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών παρέχεται προστασία στον οργανισμό από εισβολείς μέσω ενός πιο γενικευμένου μη ειδικού συστήματος αναγνώρισης,
- 3) Την προσαρμοστική (ή επίκτητη) ανοσία, κατά την οποία εξειδικευμένα κύτταρα προσαρμόζονται ανάλογα εκτελώντας ξεχωριστές λειτουργίες για την προστασία του οργανισμού από σχεδόν κάθε εισβολέα. Επιπλέον, χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση κυττάρων μνήμης προκαλώντας την άμεση αμυντική ανοσολογική απόκριση στην περίπτωση επαναπροσβολής του οργανισμού από το ίδιο ξένο σώμα (Kindt et al., 2007; Turvey and Broide, 2010).

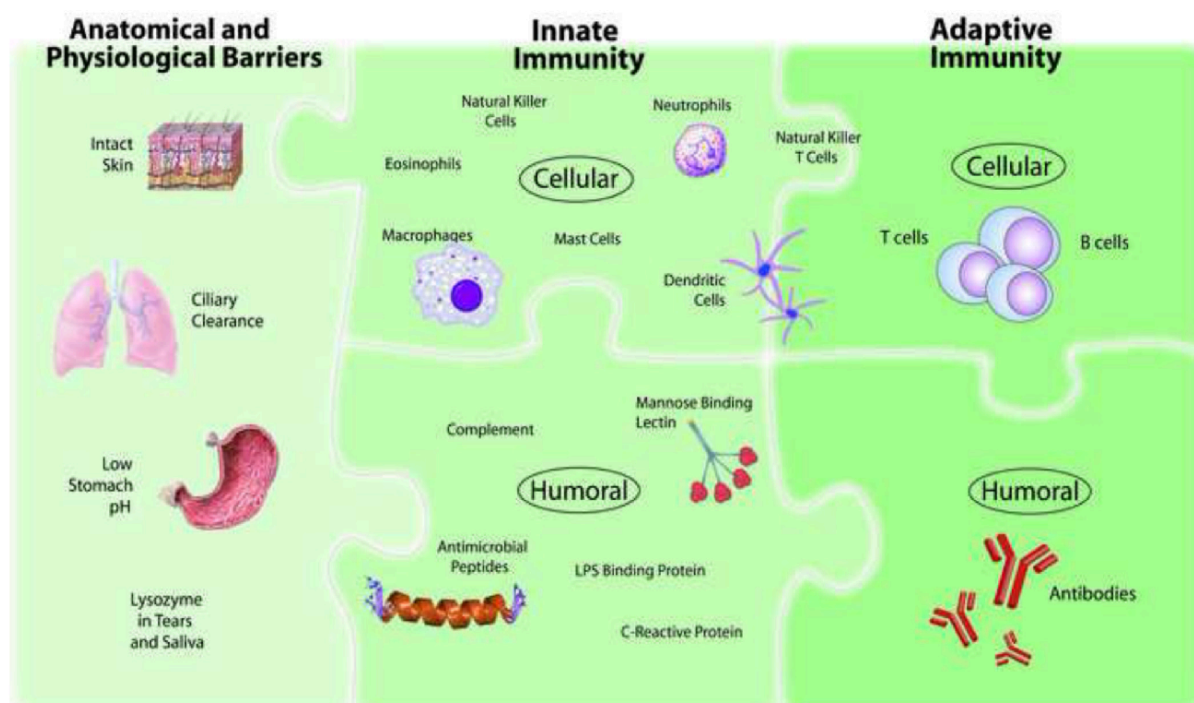
Το έμφυτο και το προσαρμοστικό μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν συνεργαστικά μεταξύ τους στους σποδυλωτούς οργανισμούς προστατεύοντάς τους από μολυσματικές προσβολές (Medina, 2016; Sompayrac, 2022). Συγκεκριμένα, η έμφυτη ανοσία είναι αυτή που συμβάλει στην ενεργοποίηση της επακόλουθης προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης (Turvey and Broide, 2010). Για παράδειγμα, το έμφυτο σύστημα στρατολογεί ειδικές για το αντιγόνο αποκρίσεις προσελκύοντας κύτταρα στη θέση μόλυνσης/τραυματισμού και μεταφέροντας αντιγόνο στους λεμφικούς ιστούς, οδηγώντας σε ενεργοποίηση προσαρμοστικών τελεστών κυττάρων (Medina, 2016). Ωστόσο, οι δύο αυτές μορφές ανοσίας δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσουν τις αποτυχίες των βασικών ανατομικών και φυσιολογικών φραγμών, καταλήγοντας για παράδειγμα σε ακραία ευαισθησία σε λοιμώξεις τα άτομα με σοβαρά δερματικά εγκαύματα ή πρωτοπαθή βλεφαροειδής δυσκινησία (Turvey et al., 2010).

Η έμφυτη ανοσοπροστασία εκτελείται από αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα (Εικόνα 2.1). Τα αιμοποιητικά κύτταρα περιλαμβάνουν μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, κύτταρα φυσικού φονέα (NK) και κύτταρα T φυσικοί φονιάδες. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1, τα δύο συστήματα ανοσίας μοιράζονται τα κύτταρα T φυσικοί φονιάδες και τα “δενδρικά” κύτταρα, ενώ το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα εξαρτάται αποκλειστικά από τα T και B

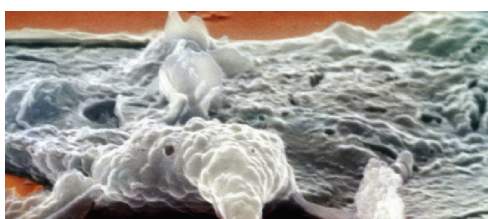
λεμφοκύτταρα (Turvey et al., 2010). Συγκεκριμένα, τα δενδρικά κύτταρα (DCs) συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία, ενώ ρυθμίζουν την προσαρμοστική ανοσοαπόκριση και είναι θεμελιώδεις για την ανάπτυξη της ανοσολογικής μνήμης και ανοχής. Επιπλέον, ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικών φονέων (NK), μακροφάγους και ηωσινόφιλα (Muñoz-Carrillo et al., 2018).

Ένα από τα αμυντικά κύτταρα είναι ο μακροφάγος, ο οποίος έχει υποδοχείς και αναγνωρίζει τα επικίνδυνα μόρια των εισβολέων και όταν τα ανιχνεύσουν, αρχίζουν να κατευθύνονται προς το μικρόβιο που εκπέμπει αυτά τα μόρια (Εικόνα 2.2). Τα μακροφάγα και όλα τα άλλα αιμοσφαίρια στο σώμα δημιουργούνται στο μυελό των οστών, όπου προέρχονται από αυτοανανεούμενα κύτταρα που ονομάζονται βλαστοκύτταρα (Sompayrac, 2022).

Στον πίνακα 2.1 συνοψίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας.



Εικόνα 2.1. Ολοκληρωμένο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα: (i) ανατομικά και φυσιολογικά εμπόδια. (ii) έμφυτη ανοσία και (iii) προσαρμοστική ανοσία (Turvey and Broide, 2010).



Εικόνα 2.2. Ηλεκτρονική μικρογραφία που δείχνει ένα μακροφάγο έτοιμο να καταβροχθίσει ένα βακτήριο (Sompayrac, 2022).

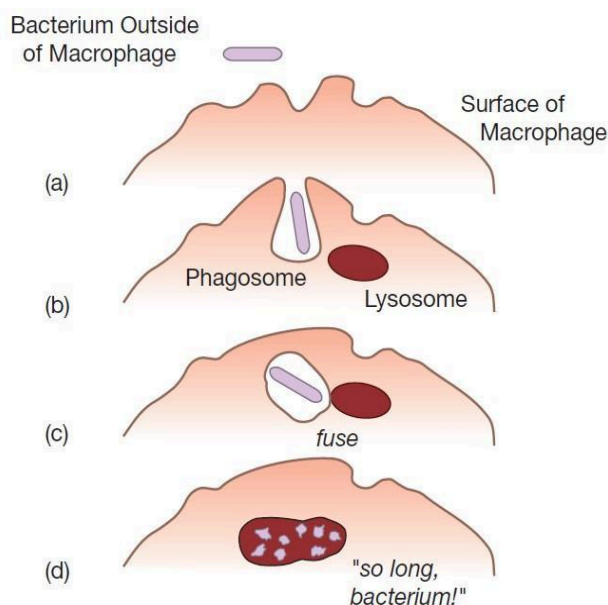
Πίνακας 2.1. Χαρακτηριστικά έμφυτης και επίκτητης (προσαρμοστικής) ανοσίας (Kindt et al., 2007; Turvey and Broide, 2010)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΕΜΦΥΤΗ ΑΝΟΣΙΑ	ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ
Κύριοι κυτταρικοί τύποι	Φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα), κύτταρα φυσικοί φονιάδες, δενδριτικά κύτταρα	T και B κύτταρα, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
Διαλυτά συστατικά του αίματος ή των υγρών των ιστών	Αντιμικροβιακά πεπτιδία και πρωτεΐνες	Αντισώματα
Διάκριση εαυτού-μη εαυτού	Υψηλή	Πολύ καλή. Αποτυχία διάκρισης οδηγεί σε αυτοάνοσα νοσήματα
Ειδικότητα	Εξειδίκευση για μόρια και για μοριακά πρότυπα συνδεδεμένα με μικροοργανισμούς	Υψηλή εξειδίκευση
Ποικιλότητα	Ο αριθμός των υποδοχέων είναι μικρός και είναι αποτέλεσμα της έκφρασης γονιδίων της σπερματικής σειράς	Μεγάλη ποικιλομορφία που οφείλεται στον μεγάλο αριθμό υποδοχέων που είναι αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού των ανίστοιχων γονιδίων
Μνήμη	Όχι	Ναι. Μόνιμη μνήμη που οδηγεί σε ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απόκριση σε ενδεχόμενη επαναμόλυνση.
Χρόνος απόκρισης	Λεπτά/Ωρες	Ημέρες

Η κάθε εισβολή στον οργανισμό αναγνωρίζεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος λόγω της παρουσίας των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs), οι οποίοι λαμβάνουν «σήματα κινδύνου» που σχετίζονται με μια μικροβιακή επίθεση. Από αυτούς κάποιοι αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα παθογόνων (PAMPs), τα οποία αφορούν ευρεία κατηγορία εισβολέων, και κάποιοι άλλοι λαμβάνουν σήματα από μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη (DAMPs). Αυτά είναι φυσιολογικά ενδοκυτταρικά μόρια, τα οποία απελευθερώνονται από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη και πεθαίνουν (π.χ. κύτταρα που σκοτώνονται από ιούς). Η ανίχνευση των εισβολέων από τους PRR ενεργοποιεί κύτταρα

πολεμιστές, όπως τα μακροφάγα, και παράγονται κυτοκίνες μάχης που ειδοποιούν και ενεργοποιούν άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Όταν ένα μακροφάγο συναντά ένα βακτήριο το φυλακίζει σε ένα θύλακα (κυστίδιο) που ονομάζεται φαγόσωμα, και το οποίο στη συνέχεια εισχωρεί μέσα στο μακροφάγο, όπου συντήκεται με ένα άλλο κυστίδιο που ονομάζεται λυσόσωμα. Τα λυσοσώματα περιέχουν ισχυρές χημικές ουσίες και ένζυμα ικανά να καταστρέψουν τα βακτήρια. Μάλιστα, οι παράγοντες αυτοί είναι τόσο καταστροφικοί που θα μπορούσαν να σκοτώσουν το μακροφάγο εάν απελευθερώνονταν μέσα σε αυτό αντί να διατηρούνται σε κυστίδια. Έτσι το μακροφάγο καταστρέφει τον εισβολέα και η διαδικασία αυτή ονομάζεται φαγοκυττάρωση (Εικόνα 2.3) (Sompayrac, 2022).

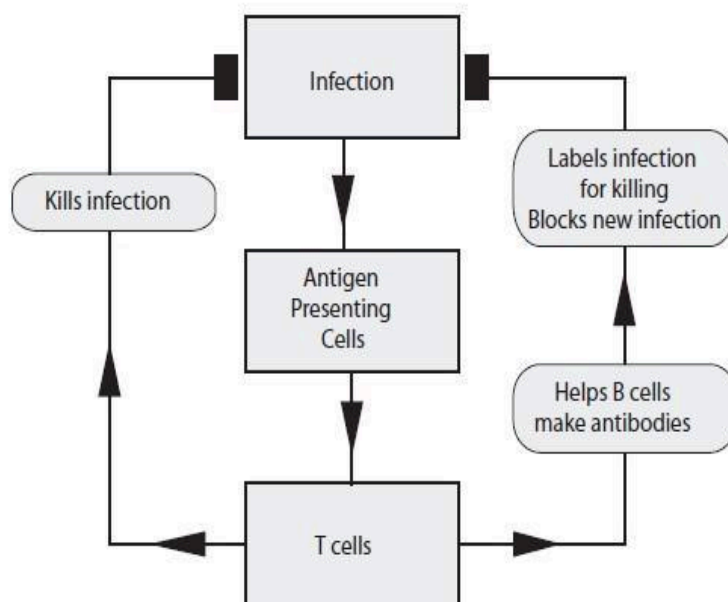


Εικόνα 2.3. Διαδικασία φαγοκυττάρωσης – καταστροφή εισβολέα (Sompayrac, 2022).

Όταν ένας ιός προσβάλλει ένα ανθρώπινο κύτταρο, το μολύνει χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό του κυττάρου και αναπαράγεται σε πολλά αντίγραφα. Στη συνέχεια, ξεσπούν από το κύτταρο και μολύνουν άλλα κύτταρα. Σε αντίθετη περίπτωση που ο ιός είναι ακόμα έξω από το κύτταρο, πρωτεΐνες του συστήματος αμύνονται ενάντια του ιού κατασκευάζοντας σύμπλοκα επίθεσης μεμβράνης στην επιφάνεια του ιού. Ωστόσο, από τη στιγμή που ένα κύτταρο μολυνθεί και ξεκινάει ο αναπαραγωγικός του κύκλος, οι πρωτεΐνες αυτές είναι αναποτελεσματικές και άλλα έμφυτα όπλα του συστήματος αναλαμβάνουν δράση ενάντια στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί (Sompayrac, 2022).

Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζεται η ανταπόκριση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος στην μόλυνση, η οποία εξελίσσεται συνοπτικά σε τρεις φάσεις:

- 1) Στην αρχή εντοπίζεται η μόλυνση-αντιγόνο από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία ενεργοποιούν συγκεκριμένα T λεμφοκύτταρα, τα οποία
- 2) πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε B και T λεμφοκύτταρα, συντονίζοντας την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα και
- 3) οδηγώντας στη θανάτωση της μόλυνσης (Nicholson, 2016).



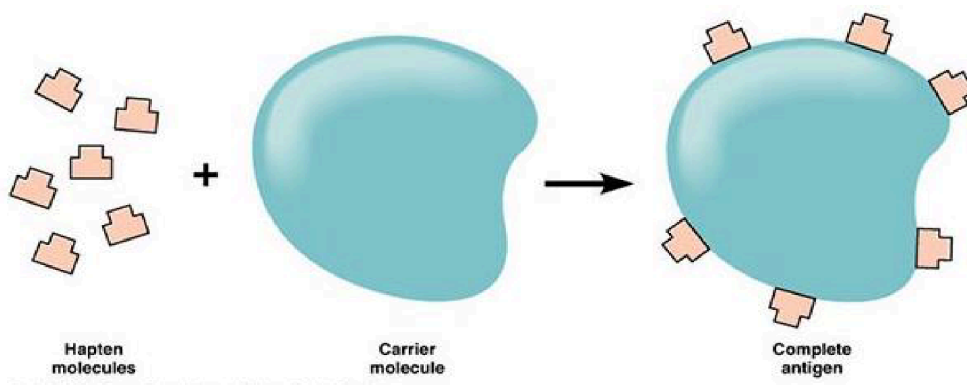
Εικόνα 2.4. Η ανταπόκριση του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος στην μόλυνση (Nicholson, 2016)

Η καταστροφή του αντιγόνου γίνεται μέσω ενεργοποιημένων κυττάρων και λέγεται κυτταρική ανοσία, και η οποία διαμεσολαβείται από τα T λεμφοκύτταρα ή μέσω ειδικών αντισωμάτων και λέγεται χυμική ανοσία, και η οποία διαμεσολαβείται από τα B λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους, τα αντισώματα. Η χυμική ανοσία προστατεύει τον οργανισμό από εξωκυττάρια βακτήρια και τοξίνες αυτών, ενώ η κυτταρική ανοσία τον προστατεύει από ενδοκυτταρικά παράσιτα προάγοντας την ενδοκυτταρική καταστροφή τους ή τη λύση των μολυσμένων κυττάρων (Nicholson, 2016).

2.4 Αντιγόνα

Αντιγόνο (Ag) ονομάζεται οποιαδήποτε ουσία, από βιολογικά μόρια, όπως απλοί ενδιάμεσοι μεταβολίτες, σάκχαρα, λιπίδια, ορμόνες, καθώς και μακρομόρια, όπως σύνθετοι υδατάνθρακες, φωσfolιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες, η οποία μπορεί να προκαλέσει την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού.

Τα αντιγόνα αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από ειδικά μόρια αντισώματος ή από έναν υποδοχέα T λεμφοκυττάρου με επακόλουθη διέγερση των B λεμφοκυττάρων και ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Αυτά τα αντιγόνα ονομάζονται ανοσογόνα, είναι μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους και προάγουν την χυμική και/ή κυτταρική ανοσοαπόκριση. Ωστόσο, υπάρχουν ουσίες μικρού μοριακού βάρους που θεωρούνται αντιγόνα, καθώς προσδένονται με αντισώματα, αλλά δεν χαρακτηρίζονται ως ανοσογόνα γιατί δεν επάγουν ανοσοαπόκριση. Αυτές οι ουσίες ονομάζονται απτένια και μόνο αφού συνδεθούν με μακρομοριακές πρωτεΐνες (φορείς) μπορούν να γίνουν ανοσογόνα (Abbas et al., 2018) (2.5).



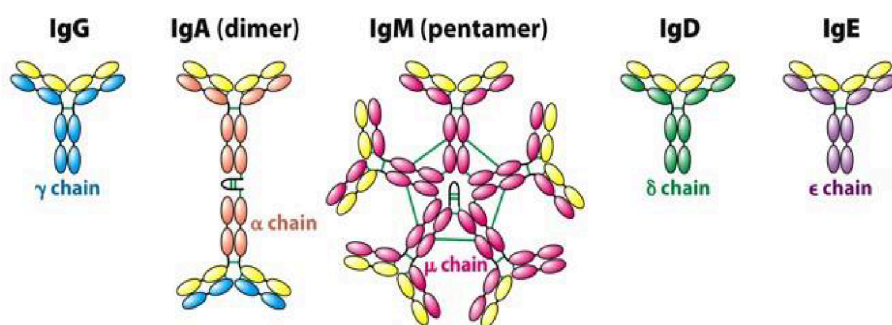
Εικόνα 2.5. Σύνδεση ενός απτενίου με ένα μόριο φορέα για τη δημιουργία ανοσογόνου (Mohanty and Leela, 2013)

2.5 Αντισώματα

Τα αντισώματα, γνωστά και ως ανοσοσφαιρίνες (Ig), είναι πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος που ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Τα αντισώματα είναι αυτά που αναγνωρίζουν τα ξένα μόρια (αντιγόνα), ενεργοποιώντας στη συνέχεια πολλαπλές χημικές και φυσιολογικές διεργασίες με σκοπό να τα αποβάλουν και να τα εξουδετερώσουν από τον οργανισμό αποτελώντας την ανοσολογική απόκριση (Kindt et al., 2007; Nicholson, 2016; Czernek and Döchler, 2017; Norman et al., 2020; Sompayrac, 2022). Τα αντισώματα

είναι διαλυτά και συνήθως σχεδιάζονται σε σχήμα Y (2.6). Για τον σχηματισμό τους συνδυάζονται δύο πανομοιότυπα βαριές και δύο πανομοιότυπα ελαφρές αλυσίδες. Με τα δύο άκρα τους συνδέονται σταθερά με έναν στόχο (αντιγόνο), ενώ με το άλλο, της βάσης, αναγνωρίζονται και δεσμεύονται από ειδικές πρωτεΐνες και μεταφέρουν σήματα στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η περιοχή αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διαδικασία επιλογής και καθαρισμού των αντισωμάτων, αλλά και στην ακινητοποίησή τους σε στερεές επιφάνειες στις ανοσοχημικές τεχνικές. Οι άλλες δύο περιοχές δέσμευσης διαθέτουν την ίδια εξειδίκευση προς το αντιγόνο και ονομάζονται. Η ταξινόμηση των αντισωμάτων γίνεται σε διαφορετικές οικογένειες, που ονομάζονται ισότυποι. Η παραγωγή τους ελέγχεται και ορίζεται από ρυθμιζόμενες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις καθοριστικές για κάθε αντίσωμα. Οι διαφορετικοί ισότυποι ονομάζονται σύμφωνα με τον τύπο της βαριάς πολυπεπτιδικής αλυσίδας που περιέχουν, μ , δ , γ , ϵ , και α , και αποτελούν αντίστοιχα τις εξής ανοσοσφαιρίνες: IgM, IgD, IgG, IgE και IgA (Nicholson, 2016; Sompayrac, 2022) (2.7). Οι ανοσοσφαιρίνες αυτές αποτελούν το 20-25% των πρωτεϊνών του ορού του αίματος, μεταξύ των οποίων η IgG συναντάται σε μεγαλύτερη αναλογία και είναι αυτή που χρησιμοποιείτε κυρίως στις ανοσοχημικές τεχνικές (Abbas et al., 2018).

Εικόνα 2.6. Δομή αντισώματος



Εικόνα 2.7. Γενική δομή των πέντε κατηγοριών αντισωμάτων (Kindt et al., 2007)

Τα αντισώματα αποτελούν μέρος του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και έχουν εξελιχθεί για να είναι πολύπλευρα συνδετικά, ικανά να αναγνωρίζουν και να συνδέονται σε μεγάλη ποικιλία μοριακών επιφανειών

(Norman et al., 2020; Deszynski et al., 2022). Εξαιτίας της ιδιότητάς τους αυτής, τα αντισώματα αποτελούν κύρια εργαλεία των ανοσοπροσδιορισμών επιτρέποντας την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων βιοδεικτών και είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για μόρια με μοριακό βάρος άνω των 3000 Da (Castelli et al., 2022). Επιπλέον, έχουν αξιοποιηθεί για θεραπευτικούς σκοπούς και προς το παρόν αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία βιοθεραπευτικών με πέντε από τα μονοκλωνικά αντισώματα να βρίσκονται στην κορυφή των πωλήσεων: adalimumab και infliximab (anti-TNF α), rituximab (anti-CD20), bevacizumab (anti-VEGF) και trastuzumab (anti-HER2/neu) (Norman et al., 2020).

2.5.1 Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα περισσότερα αντιγόνα διαθέτουν πάνω από έναν επίτοπο, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παράγουν πολλά διαφορετικά εξειδικευμένα για κάθε κύτταρο αντισώματα και τη δημιουργία έτσι μια μεγάλης ποικιλίας κλώνων B κυττάρων. Τα ετερογενή αυτά μίγματα των διαφορετικών αντισωμάτων ονομάζονται πολυκλωνικά. Η μεγάλη ετερογένεια των αντισωμάτων τις περισσότερες φορές παρεμποδίζει την αποτελεσματικότητά τους όσον αφορά την έρευνα, τη διάγνωση και την αξιοποίησή τους για θεραπευτικούς σκοπούς. Την αδυναμία τους αυτή έρχονται να καλύψουν τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προέρχονται από έναν κλώνο B κυττάρων, αποτελούν, δηλαδή, ειδικά αντισώματα, πανομοιότυπα, που συντίθενται από πολλά αντίγραφα ενός μόνο κυττάρου. Καθώς, ωστόσο, η απομόνωσή τους από τα πολυκλωνικά είναι εξαιρετικά δύσκολη, οι Köhler και Milstein ανέπτυξαν μια μέθοδο που καθιστά δυνατή την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Kindt et al., 2007; Abbas et al., 2018).

2.5.1.1 Ιστορική αναδρομή

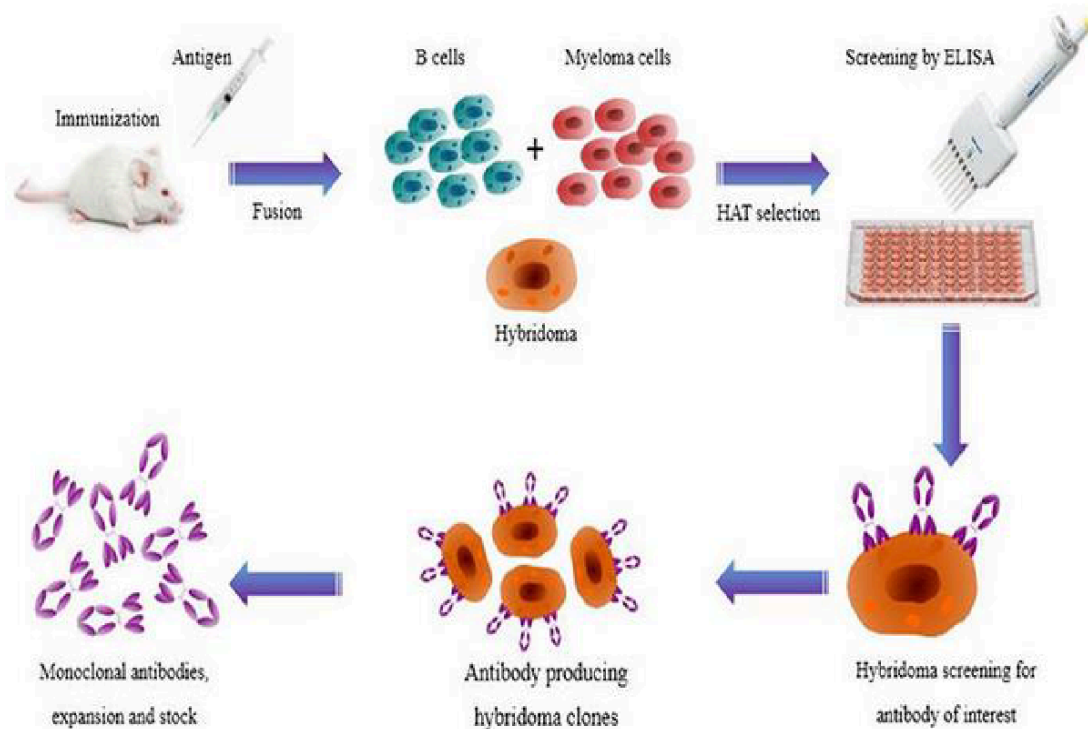
Το 1975 οι Georges Köhler και Cesar Milstein ανέπτυξαν την τεχνολογία ιβρυδώματος βασισμένη στην ανακάλυψη της δυνατότητας σύντηξης υγίων B κυττάρων από ένα ανοσοποιημένο ζώο (συνήθως από ένα ποντίκι) με κύτταρα μυελώματος παράγοντας μεγάλη ποσότητα ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής ειδικότητας. Ιβρυδώματα είναι τα ιβρυδικά κύτταρα που προκύπτουν από την σύντηξη των B λεμφοκυττάρων και των

κυττάρων του μυελώματος. Η ανακάλυψή τους αυτή τους οδήγησε στο Nobel το 1984 (Abbas et al., 2018).

2.5.1.2 Διαδικασία παραγωγής

Η διαδικασία παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Εικόνα 2.8):

1. Εμβολιασμός του ειδικού αντιγόνου σε ένα ζώο (συνήθως ποντικό ή αρουραίο) για να αναπτύξει ανοσολογική απόκριση και να παραχθούν αντισώματα για αυτό το αντιγόνο.
2. Έπειτα από μερικές εβδομάδες λαμβάνονται Β λεμφοκύτταρα από τη σπλήνα του ζώου τα οποία παράγουν τα αντισώματα αυτά που είναι ενάντια σε αυτό το αντιγόνο. Τα κύτταρα από τη σπλήνα του ποντικού αναμειγνύονται με κύτταρα μυελώματος και δημιουργούνται τα υβριδικά κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να αναπτύσσονται συνεχώς και να παράγουν αντισώματα σε μεγάλες ποσότητες.
3. Το μείγμα των υβριδικών κυττάρων τοποθετείται σε ένα μέσο (υποξανθίνη, αμινοπτερίνη και θυμιδίνη) που επιτρέπει μόνο τα υβριδικά κύτταρα να αναπτυχθούν.
4. Στη συνέχεια γίνεται προσδιορισμός των παραγόμενων υβριδικών κυττάρων.
5. Από τα επιλεγμένα υβριδώματα παράγονται στη συνέχεια μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων που αποτελούν τα μονοκλωνικά αντισώματα.
6. Τα υβριδώματα που παράγουν τα επιθυμητά αντισώματα μπορούν:
 - να καταψυχθούν και να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα,
 - να εμβολιαστούν σε ποντικούς και να επαχθεί η δημιουργία μυελώματος,
 - να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό (Mohanty and Leela, 2013).



Εικόνα 2.8. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων (Mohanty and Leela, 2013)

2.5.1.3 Χρήσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων

Εξαιτίας της παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων από κύτταρα ποντικών, η θεραπευτική τους χρήση είναι περιορισμένη, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα των κάποιων ανθρώπων μπορεί να αντιδράσει σε αυτά. Κατά συνέπεια, με σκοπό την συμβατότητα τους στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, έγινε με χρήση της Γενετικής Μηχανικής και του ανασυνδιασμένου DNA δημιουργία αντισωμάτων τα οποία περιέχουν μεταβλητές περιοχές από κύτταρα ποντικού και σταθερές περιοχές από ανθρώπινες πηγές και ονομάζονται χμαιοκλικά μονοκλωνικά αντισώματα. Επιπλέον, με χρήση της ίδιας τεχνολογίας, τα αντισώματα του ποντικού μπορούν να τροποποιηθούν και να μοιάζουν περισσότερο με αυτά του ανθρώπου (Mohanty and Leela, 2013).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για:

Ταυτοποίηση φαινοτυπικών δεικτών, ειδικών για συγκεκριμένους τύπους κυττάρων, όπως οι δείκτες CD (clusters of differentiation), οι οποίοι συμβάλλουν στη μελέτη των σταδίων ανάπτυξης των λευκοκυττάρων και συχνά δρουν ως υποδοχείς ή

συνδέτες σημαντικοί για τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Xiong and Xu, 2014).

Διάγνωση πολλών μολυσματικών και μη ασθενειών με ανίχνευση στο αίμα, στα ούρα ή στους ιστούς των αντιγόνων ή αντισωμάτων για τις συγκεκριμένες ασθένειες μέσω ανοσοχημικών τεχνικών (Abbas et al., 2018).

Γρήγορη διάγνωση της ηπατίτιδας, της γρίπης, του έρπητα, του στρεπτόκοκκου και των λοιμώξεων από χλαμύδια (Xiong and Xu, 2014).

Ταυτοποίηση καρκινικών όγκων με επισημασμένα ειδικά για διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες του όγκου μονοκλωνικά αντισώματα για τον προσδιορισμό της πηγής του όγκου μετά από ιστολογική χρώση ενός τμήματος του.

Την στόχευση κυττάρων και μορίων που σχετίζονται με την παθογένεση πολλών ασθενειών και την θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών.

Την αντιμετώπιση κυττάρων του όγκου ως συζευγμένα με κυτταροτοξικά φάρμακα σαν αντικαρκινικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.

Θεραπεία ορισμένων αυτοάνοσων διαταραχών.

Τον καθαρισμό σπάνιων πρωτεϊνών.

Την αντιμετώπιση συμπτωμάτων απόρριψης μοσχευμάτων.

Τον καθορισμό των λειτουργιών διαφόρων μορίων, όπως των αντιγονικών υποδοχέων, καθώς και για την ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων που μπορεί να είναι μόρια στην επιφάνεια κυττάρου ή σχετίζονται με την οργάνωση ολόκληρου ιστού (Xiong and Xu, 2014; Abbas et al., 2018).

Η παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ακριβότερη από των πολυκλωνικών, λόγω των πολύτιμων ιδιοτήτων τους και των εφαρμογών τους, όπως επίσης δυσκολότερη και πιο αργή. Ωστόσο, είναι προτιμώμενα και πιο αποτελεσματικά για την ανάπτυξη ανοσολογικών εξετάσεων (Castelli et al., 2022).

3. Διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος

Οι διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλούνται από δυσλειτουργίες αυτού λόγω είτε χαμηλής δραστηριότητας είτε υπερδραστηριότητας αυτού έναντι εσωτερικών ή εξωτερικών στόχων προκαλώντας μη μεταδοτικά νοσήματα και ευαισθησία σε λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, ένα υπερδραστήριο ανοσοποιητικό σύστημα εκλαμβάνει υγιή κύτταρα σαν ξένα σώματα και η απόκριση αυτή ονομάζεται αυτοάνοση, ενώ όταν αντιδρά έντονα σε εξωτερικούς στόχους δημιουργείται υπερευαισθησία. Η περίπτωση όπου υπολειτουργεί η ανοσοαπόκριση ενός οργανισμού και αποτυγχάνει να το προστατέψει και να εξαλείψει οποιαδήποτε λοίμωξη, ονομάζεται ανοσοανεπάρκεια και δημιουργούνται χρόνιες και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα). Η ανοσολογική απορρύθμιση μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσης πάθησης ή καρκίνου.

Συνοπτικά, οι διαταραχές της άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού εμπίπτουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

Ανοσοανεπάρκεια: ανεπαρκής δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος

Αυτοανοσία: υπερδραστηριότητα ανοσολογικών αποκρίσεων με αποτυχία διάκρισης των συστατικών του οργανισμού από τα ξένα και επιτίθεται στο ίδιο το άτομο και τα υγιή του κύτταρα

Υπερευαισθησία: ανοσολογικές αποκρίσεις που βλάπτουν τους ίδιους τους ιστούς του σώματος, αντιδρώντας σε εξωτερικά ερεθίσματα (πχ. αλλεργία)

3.1 Υπερευαισθησία

Η υπερευαισθησία του ανοσοποιητικού προκαλεί ασθένειες οι οποίες τείνουν να εκδηλώνονται ως χρόνια προβλήματα, καθώς προκύπτουν από ανοσολογικές αποκρίσεις εναντίον αυτοαντιγόνων (αυτοάνοσες ασθένειες) και από ανεξέλεγκτες ή υπερβολικές αποκρίσεις σε ξένα αντιγόνα.

Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας ομαδοποιούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες (3.1):

(Α) Υπερευαισθησία τύπου I: Το αντιγόνο δεσμεύεται σε προσχηματισμένα αντισώματα IgE συνδεδεμένα στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων ή των βασεόφιλων, απελευθερώνοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως η ισταμίνη, κυτοκίνες και μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος, εκδηλώνοντας κλινικά συμπτώματα, όπως σπηπτικό σοκ, αλλεργική ρινίτιδα, αλλεργικό άσθμα και οξείες αλλεργικές αντιδράσεις σε φάρμακα.

(Β) Υπερευαισθησία τύπου II: Αντιγόνα συνδεδεμένα με κύτταρα δεσμεύονται με τα αντισώματα IgM και IgG προκαλώντας κυτταροτοξικές αντιδράσεις καταστρέφοντας το κύτταρο στο οποίο είναι συνδεδεμένο το αντιγόνο.

(Γ) Υπερευαισθησία τύπου III: Σχηματίζονται ανοσοσυμπλέγματα, από συμπλέγματα αντιγόνων, πρωτεϊνών συμπληρώματος και αντισωμάτων IgG και IgM, τα οποία συνήθως απομακρύνονται με φαγοκυττάρωση και η εναπόθεση τους στους ιστούς ή στο αγγειακό ενδοθήλιο μπορεί να τους προκαλέσει επιθετικότητα.

(Δ) Υπερευαισθησία τύπου IV. Αυτοί οι τύποι αντιδράσεων δεν προκαλούνται από αντισώματα, αλλά κυρίως από T λεμφοκύτταρα (κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία), καθώς και μονοκύττατα και μακροφάγα. Οι αντιδράσεις αυτού του τύπου εμπλέκονται σε πολλές αυτοάνοσες και μολυσματικές ασθένειες (Muñoz-Carrillo et al., 2018).

Εικόνα 3.1. Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Muñoz-Carrillo et al., 2018)

3.2 Ανοσολογική ανεπάρκεια

Η ανοσοανεπάρκεια περιλαμβάνει νοσήματα τα οποία προκύπτουν όταν ένας ή περισσότεροι από τους μηχανισμούς άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ανενεργοί με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία του οργανισμού σε λοιμώξεις. Συγκεκριμένα, η ανοσολογική ανεπάρκεια σχετίζεται με διαταραχή είτε του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος λόγω ανεπαρκούς αριθμού ή αδυναμίας δράσης των B και T-λεμφοκυττάρων, τα οποία αποτελούν τα ειδικά κύτταρα άμυνας του οργανισμού, είτε της έμφυτης ανοσοαπόκρισης από διαταραχές φαγοκυττάρων και συμπληρώματος. Υπάρχουν δυο κύριες κατηγορίες ανοσολογικής ανεπάρκειας: η πρωτογενής και η δευτερογενής ή επίκτητη. (Nicholson, 2016; McCusker et al., 2018).

Σε σπάνιες περιπτώσεις συμβαίνει να γεννιούνται άτομα χωρίς αποτελεσματικό ανοσοποιητικό σύστημα, λόγω ασυνήθιστων μεταλλάξεων που οφείλονται σε σπάνιες κληρονομικές παθήσεις και οι οποίες εμποδίζουν την ωρίμανση των ανοσοκυττάρων. Το είδος αυτό ανοσοανεπάρκειας ονομάζεται πρωτογενής. Ενώ οι πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες οφείλονται σε εγγενή δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος το οποίο καταστέλλεται από ένα γενετικό παράγοντα, οι δευτερογενείς ανοσοανεπάρκειες οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες και μπορεί να προκύψουν και σε μεγαλύτερη ηλικία. Οι δευτερογενείς ανοσοανεπάρκειες μπορεί να προκύψουν εξαιτίας ιογενών ή βακτηριακών λοιμώξεων, υποσιτισμού, χρήσης ορισμένων φαρμάκων (π.χ. κορτικοστεροειδή, ανοσοκατασταλτικά, κ.ά.) απώλειας ανοσοσφαιρίνης (Ig), κακοήθειας ή θεραπείας κάποιας ασθένειας με φάρμακα που προκαλούν ανοσοκαταστολή κ.α. (Nicholson, 2016; McCusker et al., 2018; Alroqi et al., 2019). Η αντιμετώπιση της δευτερογενούς ανοσολογικής ανεπάρκειας εξαρτάται από το αίτιο που την προκάλεσε. Συνήθως η άρση της αιτίας θα επαναφέρει τη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. διακοπή λήψης κορτικοστεροειδών ή ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, σωστή και πλήρης διατροφή). Ωστόσο, η κύρια αποτελεσματική αντιμετώπιση μιας σοβαρής ανοσοεπάρκειας είναι η μεταμόσχευση μυελού των οστών με χρήση κυττάρων που δεν φιλοξενούν την επικίνδυνη μετάλλαξη. Επίσης τα άτομα αυτά χρησιμοποιούν δικά τους κύτταρα τροποποιημένα με γενετική μηχανική για τη διόρθωση της διαταραχής (Nicholson, 2016).

3.3 Αυτοανοσία

Η αυτοανοσία αναγνωρίστηκε το 1964 επίσημα ως σημαντική αιτία ανθρώπινης νόσου και ορίζεται η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού ενάντια κυττάρων και ιστών που ενώ ανήκουν στον ίδιο τον οργανισμό τα αναγνωρίζει ως ξένα (αυτοαντιγόνα). Στα αυτοαντιγόνα περιλαμβάνονται πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και νουκλεϊκά οξέα κατά των οποίων παράγονται από τα Β-λεμφοκύτταρα και Τ-αυτοαντιδραστικά κύτταρα τα αυτοαντισώματα (Lleo et al., 2010). Στατιστικά, το ανοσοποιητικό σύστημα των περίπου 4,5% των ατόμων επιτίθεται στο ίδιο το άτομο το οποίο είναι σχεδιασμένο να προστατεύει (Bhagavati, 2021). Οι μη φυσιολογικές ανοσολογικές αποκρίσεις του οργανισμού κατά του ίδιου του ατόμου προκαλούν παθήσεις που ονομάζονται αυτοάνοσα νοσήματα. Στην ουσία, η αυτοάνοση νόσος εμφανίζεται όταν το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται σε υγιείς

ιστούς. Έρευνες έχουν δείξει ότι η αντίσταση στη μόλυνση συσχετίζεται με την ευαισθησία σε αυτοάνοσες ασθένειες που σημαίνει πως ένα ισχυρό ανοσοποιητικό σύστημα είναι πιο πιθανό να αναπτύξει αυτοανοσία (Nicholson, 2016).

Υπάρχουν πάνω από 80 αυτοάνοσες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων περίπου 30 αυτοάνοσων διαταραχών του νευρικού συστήματος (Bhagavati, 2021). Ένα κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η συμβολή τόσο των χυμικών όσο και των κυτταρικών ανοσολογικών αποκρίσεων στον τραυματισμό των ιστών. Ωστόσο, αν και δεν είναι ξεκάθαροι οι λόγοι που πυροδοτούν τα αυτοάνοσα νοσήματα, έρευνες έχουν δείξει πως είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως επίσης ορμονικών και νευροψυχολογικών παραγόντων (Stojanovich and Marisavljevich, 2008; Lleo et al., 2010; Ngo et al., 2014). Σε αντίθεση με τους κληρονομικούς και γενετικούς παράγοντες που δεν μπορούν να αλλάξουν, πολλοί παράγοντες που αφορούν τον τρόπο ζωής, τη διατροφή και το περιβάλλον μπορούν να τροποποιηθούν για την καλύτερη διαχείριση της αυτοάνοσης νόσου (3.1) (Stojanovich and Marisavljevich, 2008). Στον Πίνακα 3.1 είναι συγκεντρωμένοι οι μεταβλητοί και οι αμετάβλητοι παράγοντες που αφορούν και μπορεί να επηρεάσουν την πρόκληση και την τροποποίηση και διαχείριση των αυτοάνοσων νοσημάτων.

Σχετικά με τους γενετικούς παράγοντες έχει διαπιστωθεί ότι κληρονομείται η γενετική προδιάθεση για την εμφάνιση αυτοάνοσου νοσήματος και όχι το ίδιο το νόσημα. Όσον αφορά τους ορμονικούς παράγοντες έχει διαπιστωθεί ιδιαίτερα αυξημένη εμφάνιση στις γυναίκες από ότι στους άντρες, είτε λόγω επίδρασης των ορμονών του φύλου, δηλαδή των οιστρογόνων (π.χ χρήση αντισυλληπτικών δισκίων), είτε λόγω αναπαραγωγικής λειτουργίας και εγκυμοσύνης (Ngo et al., 2014). Στους νευροψυχολογικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται κυρίως το σωματικό και ψυχολογικό στρες. Είναι πολλές οι μελέτες μέσα από τις οποίες έχει αποδειχτεί η επίδραση διάφορων στρεσογόνων παραγόντων στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, καθιστώντας σαφή τη σύνδεση της ψυχικής μας υγείας με το νευρολογικό και το ανοσοποιητικό μας σύστημα. Επιπλέον, πολλές αναδρομικές μελέτες αναφέρουν την εμπειρία ενός υψηλού ποσοστού ασθενών, έως 80%, να βιώνουν ασυνήθιστο συναισθηματικό στρες πριν από την έναρξη της νόσου. Αντίστοιχα, έχει παρατηρηθεί πως και η ίδια η ασθένεια, ανάλογα με τη βαρύτητα και τη διάρκεια ετών της, προκαλεί άγχος στους ασθενείς και κάποιο είδος ψυχικής διαταραχής, δημιουργώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο.

Έρευνες πάνω στη συσχέτιση του ψυχολογικού στρες και των κύριων ορμονών του στρες με την παθογένεση της αυτοάνοσης νόσου έχουν καταλήξει στη θεωρία ότι οι νευροενδοκρινικές ορμόνες που εκκρίνονται με το στρες είναι αιτία πρόκλησης ανοσολογικής διαταραχής δημιουργώντας αυτοάνοση νόσο, αλλάζοντας ή ενισχύοντας την παραγωγή κυτοκίνης. Συμπερασματικά, η θεραπεία της αυτοάνοσης νόσου θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει διαχείριση του στρες και συμπεριφορική παρέμβαση για την πρόληψη της ανοσολογικής ανισορροπίας που σχετίζεται με το στρες σε συνδυασμό με σωστή, ισορροπημένη διατροφή και άσκηση (Stojanovich and Marisavljevic, 2008). Τέλος, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορεί να διεγείρουν την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων είναι η έκθεση στον ήλιο, λοιμώξεις από μικρόβια (ρευματικός πυρετός ή στρεπτόκοκκος) και ιοί, η κατανάλωση φαρμάκων, παρενέργειες εμβολίων, το κάπνισμα κα.

Πίνακας 3.1 Παράγοντες αυτοάνοσης νόσου (Stojanovich and Marisavljevic, 2008).

Μεταβλητοί παράγοντες	Αμετάβλητοι παράγοντες
Ψυχολογικό στρες	Γενετικός
Λοίμωξη	Ορμονικός
Εμβόλιο	Κατάσταση ανοσοανεπάρκειας
Κάπνισμα	Φύλο
Παχυσαρκία	
Έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία	
Φάρμακα	

3.4 Αυτοφλεγμονή

Η αυτοφλεγμονή είναι διαταραχή της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, η οποία συχνά εκδηλώνεται ως αυθόρμητες κρίσεις ασθένειας και πυρετό.

Οι μεταλλάξεις στα αισθητήρια συστήματα που χρησιμοποιεί το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα για την αξιολόγηση του κινδύνου, μπορεί να οδηγήσουν σε κληρονομική ασθένεια. Ένας σημαντικός αισθητήρας του κυττάρου όταν λαμβάνει σήματα κινδύνου είναι το

φλεγμονόσωμα, το οποίο είναι μια ενδοκυτταροπλασματική δομή αποτελούμενη από πολλές πρωτεΐνες. Οι υπομονάδες του ενώνονται και ενεργοποιούν ένα ένζυμο το οποίο απελευθερώνει κυτοκίνες που προωθούν τη φλεγμονή. Η είσοδος των κυτοκινών στην κυκλοφορία μπορεί να προκαλέσει ασθένεια και πυρετό. Οι αλλαγές στο περιβάλλον προκαλούν τη συγκρότηση των υπομονάδων οι οποίες ωθούν σε ενεργοποίηση του φλεγμονώδους. Η χρόνια και επίμονη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει και σε αυτοανοσία (Nicholson, 2016).

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η χρόνια οστεομυελίτιδα, η ψωρίαση, η παννιδίτιδα και το γάγγραινο πυόδερμα μπορεί να είναι εκδηλώσεις διαφόρων αυτοφλεγμονωδών διαταραχών (Al-Herz et al., 2014).

3.5 Αλλεργία

Η αλλεργία προκύπτει, όπως και η αυτοάνοση νόσος, από ακανόνιστη ανοσολογική απόκριση. Ωστόσο, αντί για αυτοαντιγόνο ως αντιγόνο πυροδότησης, συνήθως είναι μια αβλαβής περιβαλλοντική πρωτεΐνη. Αλλεργικές αντιδράσεις μπορεί να προέλθουν από ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών ερεθισμάτων, τα οποία μπορεί να είναι φυσικά, όπως οι γύρες, ή να είναι φάρμακα, όπως το αντιβιοτικό πενικιλίνη.

Οι αλλεργικές αντιδράσεις, ως προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις που είναι, είναι πολύ συγκεκριμένες. Παράδειγμα, ο αλλεργικός πυρετός κάθε ατόμου προκαλείται από έναν συγκεκριμένο τύπο γύρης και όχι από οποιαδήποτε γύρη. Επιπλέον, οι ασθενείς που έχουν αλλεργία στην πενικιλίνη μπορούν, ωστόσο, να λαμβάνουν άλλα είδη αντιβιοτικών (Nicholson, 2016).

3.6 Μη μεταδοτικές ασθένειες

Οι μεταδοτικές ασθένειες, οι οποίες φέρουν ως αιτιολογία τη λοίμωξη, προκαλούν περίπου 4 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο παγκοσμίως. Παρόλο που οι μη μεταδοτικές ασθένειες ή νοσήματα (MMA ή MMN) δεν είναι μολυσματικές ή μεταδοτικές, έχουν αναδειχθεί ως η κύρια αιτία ασθενειών και θανάτου παγκοσμίως, συμβάλλοντας στο 71% όλων των θανάτων (Kerry et al., 2021). Το 2010, περίπου 40 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν παγκοσμίως από

MMN, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του διαβήτη και των χρόνιων καρδιαγγειακών, νευρολογικών και πνευμονοπαθειών. Το ποσό αυτό αύξηθηκε από το 60% των συνολικών θανάτων που αποδίδονται σε αυτές τις ασθένειες σε 70% (συνολικοί θάνατοι) εντός μιας δεκαετίας, από το 2000 έως στο 2010 (Budnik et al., 2018). Αυτά τα ποσά υποδεικνύουν ότι το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σχετίζεται περισσότερο με τις MMA παρά με τις μεταδοτικές ασθένειες παγκοσμίως. Οι μεταδοτικές ασθένειες μπορούν να προληφθούν με τις κατάλληλες προφυλάξεις και τις κατάλληλες συνθήκες υγιεινής και να αποτραπεί η μετάδοσή τους και η εξάπλωση της λοίμωξης σε άλλους ανθρώπους, ενώ οι MMA αφορούν δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού και προκαλούνται από τον ανθυγιεινό τρόπο ζωής, καθώς και από τη γήρανση συμπεριλαμβανομένων όλων των φυσιολογικών, περιβαλλοντικών, γενετικών και συμπεριφορικών παραγόντων (Kerry et al., 2021). Συγκεκριμένα, βασικοί παράγοντες τους αποτελούν η χρήση ουσιών, το κάπνισμα, το αλκοόλ, το άγχος, περιβαλλοντολογικοί παράγοντες, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η υποκατανάλωση λαχανικών και φρούτων και η κακή διατροφή γενικότερα.

Παρακάτω αναφέρονται οι πιο συχνές μη μεταδοτικές ασθένειες:

Παχυσαρκία

Καρδιαγγειακά νοσήματα – Υπέρταση και Υπερλιπιδαιμίες

Σακχαρώδη Διαβήτη

Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών

Σιδηροπενική Αναιμία

Οστεοπενία – Οστεοπόρωση

Ουρική Αρθρίτιδα

Ρευματοειδής Αρθρίτιδα

Γαστρεντερολογικά Περιστατικά (δυσκοιλιότητα, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, νόσος Crohn, δυσανεξία στην γλουτένη κ.ά)

Αυτοάνοσα Νοσήματα

Νεφρική Ανεπάρκεια

Καρκίνος

Διατροφικές Διαταραχές

3.7 Η σημασία της διατροφής

Παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής και η διατροφή επηρεάζουν την εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Ελλείψεις και ανεπάρκειες του οργανισμού σε θρεπτικά συστατικά, όπως βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, αντιοξειδωτικά κ.ά., καθώς και κακή ποιότητα διατροφής επιδρούν αρνητικά στον οργανισμό. Η διάρκεια αυτών οδηγούν σε βάθος χρόνου στην ανάπτυξη αυτοάνοσων και χρόνιων νοσημάτων και γενικά σε διαταραχές του ανοσοποιητικού. Συνοπτικά:

Γίνεται καταστολή της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος

Επιδεινώνονται οι φλεγμονές

Αυξάνεται η ευαισθησία σε λοιμώξεις

Επιδεινώνεται η πορεία χρόνιων ασθενειών, όπως τα αυτοάνοσα, τα καρδιαγγειακά, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και τα νοσήματα του αναπνευστικού.

Η διατήρηση των ελλείψεων αυτών και των μεταβολικών διαταραχών που οδηγούν σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού, επιδεινώνουν την πορεία οποιασδήποτε υπάρχουσας ασθένειας, ενώ με σωστή διαχείριση και διατροφή μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά η υγεία του οργανισμού (Tsoukalas et al., 2019).

Η διατροφή διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία, στην πρόληψη από μη μεταδοτικές ασθένειες (MMA) και στην αύξηση της ποιότητας ζωής. Αρκετά τρόφιμα, φυτικής ή ζωικής προέλευσης, εκτός από την κάλυψη των διατροφικών αναγκών και την καλή λειτουργία του οργανισμού εξαιτίας των θρεπτικών τους συστατικών, συμβάλλουν αποδεδειγμένα ευεργετικά τόσο στην υγεία του οργανισμού όσο και στη μείωση του κινδύνου παρουσίασης ασθενειών. Τα τρόφιμα αυτά ονομάζονται λειτουργικά και η λειτουργία τους αυτή οφείλεται στις βιοενεργές ενώσεις που περιέχουν (Batista et al, 2013; Paliwal et al, 2016; Κουτελιδάκης, 2019).

Ο όρος λειτουργικά αναφέρεται αποκλειστικά στα τρόφιμα και δεν αφορά τα δισκία ή τις κάψουλες, ενώ έχουν μέγιστη προσλαμβανόμενη ποσότητα η οποία δεν πρέπει να ξεπεραστεί (Κουτελιδάκης, 2019). Από τον 21^ο αιώνα μέχρι και σήμερα η επιστημονική έρευνα έχει προσεγγίσει με ιδιαίτερο και αυξανόμενο ενδιαφέρον τα λειτουργικά τρόφιμα, ενώ παράλληλα αυξάνεται συνεχώς η ζήτηση και η κατανάλωσή τους (Alongi and Anese, 2021).

Τα φυτά, τα οποία και χρησιμοποιούσε ο άνθρωπος από την αρχή της ανθρωπότητας για την κάλυψη των διατροφικών του αναγκών, σύντομα χρησιμοποιήθηκαν και για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Shakya, 2016). Αρκετές είναι οι αναφορές σχετικά με τις χρήσεις φυτών και βοτάνων και τις θεραπευτικές τους ιδιότητες κατά την ελληνορωμαϊκή περίοδο από μελετητές, όπως ο Ιπποκράτης, ο Θεόφραστος, ο Κέλσος, ο Διοσκουρίδης και πολλοί άλλοι (Van Wyk and Wink, 2018). Αναφορά έχει γίνει και από τον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, 460 – 377 π.Χ., για τη λειτουργία τους ως ιατρικό λέγοντας την εξής φράση «*Φάρμακο σας ας γίνει η τροφή σας και η τροφή σας ας γίνει φάρμακο σας*» (Tur and Bibiloni 2016). Μέχρι και σήμερα οι περισσότεροι άνθρωποι καταφεύγουν στους παραδοσιακούς τρόπους αντιμετώπισης των ασθενειών και κάλυψης των υγειονομικών τους αναγκών με τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών και βοτάνων (Van Wyk and Wink, 2018).

3.7.1 Οι βιοενεργές ενώσεις και τα οφέλη τους στην υγεία

Βιοενεργές ή βιοδραστικές ονομάζονται οι ενώσεις με βιολογική δράση που επιδρούν φυσιολογικά ή κυτταρικά σε έναν ζωντανό οργανισμό (Walia et al., 2019). Συγκεκριμένα, οι βιοενεργές ενώσεις φυτικής προέλευσης, ή αλλιώς δευτερογενείς μεταβολίτες, έχουν αποδεδειγμένα ευεργετικά οφέλη στο ανοσοποιητικό σύστημα. Βελτιώνουν και προάγουν την υγεία του οργανισμού, όπως επίσης μειώνουν την εμφάνιση ασθενειών και παθήσεων (Batista et al, 2013, Paliwal et al, 2016; Κουτελιδάκης, 2019).

Οι βιοενεργές ενώσεις παράγονται κατά την ανάπτυξη του φυτού, ωστόσο, δε συμμετέχουν ούτε στην ανάπτυξη ούτε στις βασικές μεταβολικές ανάγκες του φυτού, όπως είναι η αναπνοή και η φωτοσύνθεση (Azmir et al., 2013, Walia et al., 2019). Συμβάλλουν, όμως, στην άμυνα και αυτοσυντήρηση του φυτού. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται ως αντι-θρεπτικές και περιλαμβάνουν: πολυφαινόλες (τανίνες), γλυκοζίτες (σαπωνίνες), λεκτίνες, νιτρικά άλατα, φωσφορικό οξύ, αναστολείς ενζύμων (της πρωτεάσης), φυτικά οξέα, οξαλικό ασβέστιο, φαινολικές ενώσεις κα. (Gemede and Ratta, 2014; Samtiya et al., 2020; Acquah et al., 2021). Γενικά, οι δευτερογενείς μεταβολίτες χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, αρωματικά ή χαλαρωτικά φάρμακα, όπως κυρίως τα αιθέρια έλαια (Kabera et al., 2014).

Σε αντιδιαστολή των ευεργετικών επιδράσεων των ενώσεων αυτών, κάποιες ουσίες, ανάλογα με τη φύση τους, τη δοσολογία και τη βιοδιαθεσιμότητά τους, μπορεί να βλάψουν τον

οργανισμό (Walia et al., 2019). Άτομα με γαστρεντερικά προβλήματα και ανεπάρκεια σε ορισμένα θρεπτικά συστατικά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις ουσίες αυτές λόγω μείωσης της πεπτικότητας ή/και της βιοδιαθεσιμότητας των βασικών θρεπτικών συστατικών (Gemedede and Ratta, 2014; Samtiya et al., 2020; Acquah et al., 2021). Συγκεκριμένα, οι ενώσεις αυτές δεσμεύουν τα ωφέλιμα και βασικά οργανικά και ανόργανα συστατικά δυσκολεύοντας την απορρόφησή τους από τον οργανισμό, ή αντιδρούν με αυτά σχηματίζοντας μη εύπεπτες ενώσεις. Επιπλέον αρνητική επίδραση είναι η αναστολή των πεπτικών πρωτεϊνών που διασπούν τη θρεπτική ουσία, μειώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά της από τον οργανισμό. Για την αποφυγή των παραπάνω αρνητικών επιδράσεων, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι και τεχνολογικοί τρόποι επεξεργασίας με σκοπό την απενεργοποίηση ή τη μείωση της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν το μούλιασμα, το άλεσμα, το ξεφλούδισμα, το ψήσιμο, το βράσιμο και τη ζύμωση (Samtiya et al., 2020; Acquah et al., 2021).

Οι βιοενεργές ενώσεις εντοπίζονται σε συγκεκριμένες ποσότητες και τα οφέλη τους στην υγεία εξαρτώνται από την συχνότητα κατανάλωσης των τροφίμων, από την συνολική κατάσταση υγείας του ατόμου, καθώς και από την βιοδιαθεσιμότητα αυτών των συστατικών (Κουτελιδάκης, 2019). Επομένως, ένας απλός ορισμός των βιοδραστικών ενώσεων στα φυτά είναι σύμφωνα με τον Bernhoft (2010): *«δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες που προκαλούν φαρμακολογικές ή τοξικολογικές επιδράσεις σε ανθρώπους και ζώα»*.

Οι βιοενεργές ενώσεις στα τρόφιμα, εκτός από την φυσική τους παρουσία μέσω της σύνθεσής τους κατά την ανάπτυξη της πρώτης ύλης, προκύπτουν επίσης έπειτα από ανθρώπινη παρέμβαση με ενσωμάτωσή τους ή με ενίσχυση της συγκέντρωσής τους σε αυτά (Tur and Bibiloni 2016; Κουτελιδάκης, 2019). Οι φαινολικές ενώσεις, τα καροτενοειδή, οι διαιτητικές ίνες, οι βιταμίνες και τα μέταλλα είναι τα φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται συχνότερα στα τρόφιμα προκειμένου να αυξηθεί η διατροφική τους αξία, να βελτιωθούν οι ευεργετικές και διατροφικές λειτουργίες τους, αλλά και για την ενίσχυση του χρώματος, εμπλουτίζονται (Martins and Ferreira, 2017).

Κάποιοι δευτερογενείς μεταβολίτες με τις θεραπευτικές και ευεργετικές τους ιδιότητες είναι:

Αλκαλοειδή: Αντισπασμωδική, ανθελονοσιακή, αναλγητική, αντιβιοτική, διουρητική δράση, μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα σε άτομα με διαβήτη τύπου 2 (Chang et al, 2014; Pang et al., 2015).

Τερπενοειδή: Αντικές, αντιοξειδωτικές, ανθελμινθικές, αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές, ανθελονοσιακές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, βελτίωση όρασης και υγείας του δέρματος.

Γλυκοσίδες: Αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες.

Φαινόλες και φλαβονοειδή: αντιοξειδωτικές, αντιαλλεργικές, αντιβακτηριακές, αντιγηραντικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και θρομβολυτική δράση. Διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης και χοληστερόλης στο αίμα, καθώς και την ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Επίσης, συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου πρόκλησης καρδιαγγειακών παθήσεων λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων και στην υγεία των οστών. Διαχείριση του βάρους, πρόληψη ενάντια του διαβήτη, προστασία από τη νόσο του Αλτσχάιμερ, καθώς και από πλήθος ασθενειών που συνδέονται με το πεπτικό σύστημα (Gutiérrez-Grijalva et al., 2016; Ahmad, 2019).

Σαπωνίνες: αντιφλεγμονώδεις, αντικές, αμυντικές ιδιότητες των φυτών (Shakya, 2016).

Παρακάτω συνοψίζονται όλες οι ιδιότητες και δράσεις των βιοενεργών ενώσεων:

Αντιοξειδωτική δράση
Καρδιοπροστατευτική δράση
Αντικαρκινική δράση
Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες
Αντιβακτηριακή δράση
Βελτίωση ανοσοποιητικού συστήματος
Βελτίωση υγείας του δέρματος
Προστασία της όρασης
Καλύτερη υγεία οστών

Ρύθμιση σακχάρου στο αίμα

Ρύθμιση του μεταβολισμού και διαχείριση βάρους

Μείωση του οξειδωτικού στρες.

3.7.2 *Οφέλη για την υγεία από τα προβιοτικά*

Αρκετές είναι οι περιπτώσεις στις οποίες η φυσική άμυνα του οργανισμού αποδυναμώνεται λόγω χρόνιων λοιμώξεων, κοπώσεως, χρήσης φαρμάκων, αλλά ακόμα και λόγω αθλητικών δραστηριοτήτων και ψυχολογικών πιέσεων. Πολλές είναι οι περιπτώσεις στις οποίες διάφορες δυσλειτουργίες του σώματος οφείλονται σε ψυχοσωματικούς λόγους, όπως είναι η κατάθλιψη και το άγχος, καταλήγοντας σε διαταραχές του πεπτικού συστήματος και ενοχλήσεις στο έντερο. Σε αυτό το σημείο, απαραίτητη είναι η εισαγωγή λειτουργικών τροφίμων στη διατροφή για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας. Μάλιστα τα τρόφιμα με προβιοτικά βοηθούν στη διατήρηση της υγείας και στην αντιμετώπιση των φυσιολογικών διαταραχών (Jankovic et al., 2010).

Αρκετά είναι τα οφέλη που παρέχουν στην υγεία μας τα προβιοτικά τρόφιμα, κυρίως μέσω της διατήρησης της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας και της προστασίας κατά των παθογόνων. Συγκεντρωτικά κάποια από τα οφέλη είναι:

Αποτελεσματική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (συμπεριλαμβανομένου του *Candida*)

Ρύθμιση και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αύξηση αντοχής σε μολυσματικές ασθένειες

Μείωση φλεγμονής και ηπατικής τοξικότητας

Βελτιστοποίηση της απορρόφησης θρεπτικών ουσιών και ενίσχυση της απορρόφησης του ασβεστίου

Βελτίωση της ανθρώπινης διάθεση, των επιπέδων ενέργειας και των νοητικών ικανοτήτων

Πρόληψη της βρεφικής διάρροιας, διάφορων ουρογεννητικών νόσων και οστεοπόρωσης

Μη εμφάνιση τροφικών αλλεργιών και ατοπικών νόσων, μείωση της διάρροιας επαγόμενη από αντισώματα και στην ανακούφιση της δυσκοιλιότητας και της υπερχοληστερολαιμίας

Έλεγχος των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου και προστασία κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης

Πιθανές κλινικές εφαρμογές τους στην πρόληψη και θεραπεία των γαστρεντερικών, ουρογεννητικών και αναπνευστικών παθήσεων (Tripathi and Giri, 2014)

Πρόληψη αποικισμού παθογόνων μέσω της παραγωγής ανασταλτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των οξέων και του υπεροξειδίου του υδρογόνου και φυσικά αντιβιοτικά

Ενίσχυση του περισταλτισμού, της πέψης, κανονικότητας και επαναπορρόφησης των θρεπτικών συστατικών

Προαγωγή υγιούς πεπτικού συστήματος σε βρέφη κατά τον αποικισμό

Ενίσχυση και ισορροπία των επιπέδων των οιστρογόνων, πρόληψη της οστεοπόρωσης μέσω αυξημένης πρόσληψης ασβεστίου

Ενίσχυση της κατάστασης βιταμινών (B, K)

Πέψη πρωτεϊνών, λιπών, υδατανθράκων

Μείωση της δυσανεξίας στη λακτόζη

Πρόληψη από εντερική γαστρίτιδα, κολπίτιδα και ουρογεννητικές λοιμώξεις

Μείωση αρτηριακής πίεσης

Ρύθμιση της υπέρτασης

Ρύθμιση και μείωση της συγκέντρωσης χοληστερόλης ορού στο αίμα

Μείωση της λοιμώξεων του αναπνευστικού

Διατήρηση της στοματικής υγείας

Ενίσχυση της απορρόφησης μετάλλων

Αντοχή στη χημειοθεραπεία του καρκίνου και μείωση του κινδύνου του καρκίνου του παχέος εντέρου (Anuradha and Rajeshwari, 2005; Yerlikaya, 2014).

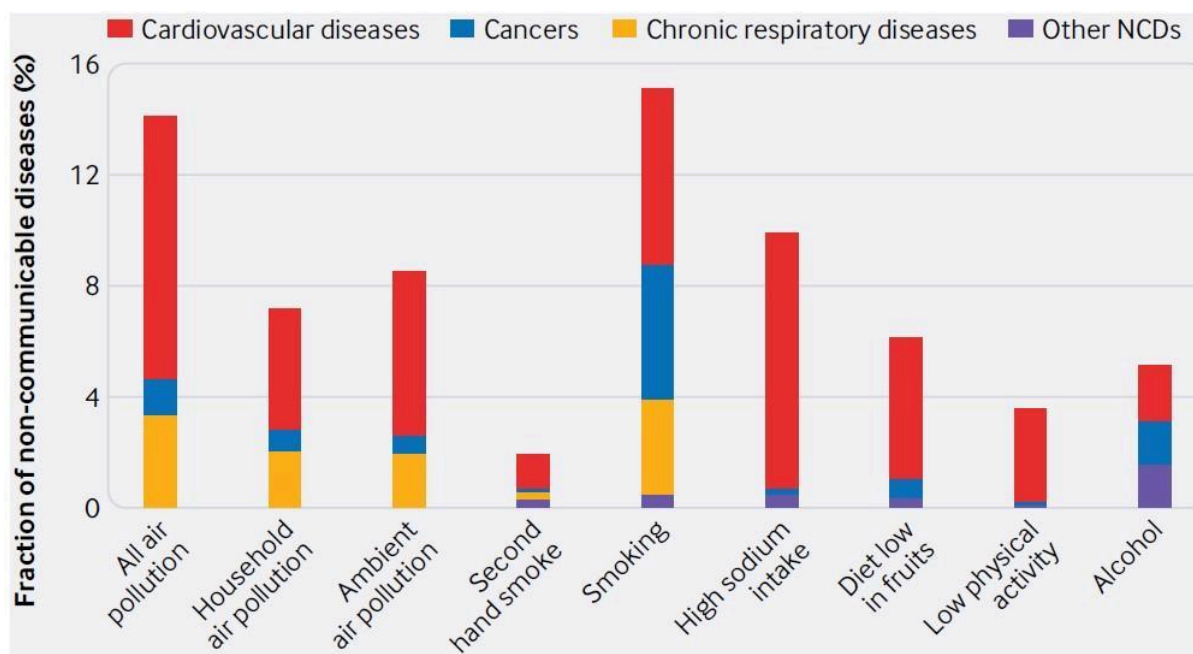
3.8 Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι

Η έκθεση στο δυσμενές περιβάλλον διαβίωσης και εργασίας σε συνδυασμό με τον τρόπο ζωής επιφέρουν δυσμενή αποτελέσματα στην υγεία προκαλώντας έως και το 75% των παγκόσμιων μη μεταδοτικών ασθενειών (MMA). Επιπλέον, οι εκθέσεις αυτές προκαλούν χρόνιες ασθένειες, επιβάρυνση των MMA και αύξηση του κόστους υγείας. Το 2015 προκλήθηκαν παγκοσμίως περίπου 9 εκατομμύρια πρόωγη θάνατοι εξαιτίας ασθενειών που σχετίζονται με την περιβαλλοντική ρύπανση. Το ποσό αυτό είναι φορές μεγαλύτερο από τους θανάτους που προκλήθηκαν από AIDS, τη φυματίωση και την ελονοσία μαζί (Budnik et al., 2018).

Η ατμοσφαιρική ρύπανση ήταν το 2016 παγκοσμίως ο δεύτερος, μετά το κάπνισμα, μεγαλύτερος περιβαλλοντικός κίνδυνος που προκαλεί μη μεταδοτικά νοσήματα (MMN) καταλήγοντας σε 5,6 εκατομμύρια θανάτους (3.2). Παγκοσμίως 91% των ανθρώπων εκτίθενται σε επιβλαβή επίπεδα ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Επιπρόσθετα, σε πάνω από 40% κατοικίες κυρίως σε χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος, δημιουργείται επιβλαβής καπνός από αναποτελεσματικούς συνδυασμούς τεχνολογίας και καυσίμων για την παρασκευή φαγητού. Επιπλέον, η ατμοσφαιρική ρύπανση του περιβάλλοντος και του οικιακού αέρα έχει προκαλέσει 24% των περιπτώσεων εγκεφαλικά επεισόδια, 25% ισχαιμική καρδιοπάθεια, 28% καρκίνο του πνεύμονα και 43% χρόνια αποφρακτική αναπνευστική νόσο. Ακόμα, το 2016 είχαν προκληθεί 1,3 εκατομμύρια θάνατοι από MMN, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και καρκίνοι, τα οποία οφείλονταν σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες και μείγματα χημικών, στο σπίτι, την κοινότητα ή τον χώρο εργασίας.

Νευρολογικές και ψυχικές διαταραχές σχετίζονται επίσης με χημικές ουσίες. Επιπλέον, η έκθεση σε μόλυβδο σε χρώματα, καταναλωτικά προϊόντα, αέρα και νερό προκάλεσε 540.000 θανάτους από καρδιαγγειακές και νεφρικές παθήσεις. Επαγγελματικές καρκινογόνες ουσίες και οι αερομεταφερόμενες εκθέσεις προκάλεσαν 882.000 θανάτους από MMN, ενώ η έκθεση σε οικιακό ραδόνιο προκάλεσε 58.000 θανάτους από καρκίνο του πνεύμονα. Οι επιπτώσεις στην υγεία πολλών περιβαλλοντικών κινδύνων πιθανότατα δεν έχουν ακόμη εκτιμηθεί. Οι κίνδυνοι που προκαλούν τους ταχύτερα αυξανόμενους θανάτους από MMN παγκοσμίως μεταξύ 2010 και 2016 είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση με αύξηση 9% και η χαμηλή σωματική δραστηριότητα με αύξηση 11%. Η χαμηλή σωματική δραστηριότητα έχει περιβαλλοντική

συνιστώσα, λόγω χρήσης των μέσων μεταφοράς, του σχεδιασμού της πόλης και της πρόσβασης σε χώρους πρασίνου. Από την άλλη πλευρά, οι θάνατοι από MMN από οικιακή ατμοσφαιρική ρύπανση έχουν μειωθεί, αλλά πρέπει να επιταχυνθεί η πρόοδος για να επιτευχθεί ο στόχος βιώσιμης ανάπτυξης για την ενίσχυση της καρδιαγγειακής και αναπνευστικής θνησιμότητας σε συχνότερα επεισόδια θερμότητας. Χωρίς περισσότερη δράση, οι άνθρωποι θα επηρεάζονται όλο και περισσότερο από περιβαλλοντικούς κινδύνους για την υγεία (Prüss-Ustün et al., 2019).



Εικόνα 3.2. Αποδιδόμενο κλάσμα μη μεταδοτικών ασθενειών (MMA) για επιλεγμένους παράγοντες κινδύνου ανά ομάδα ασθενειών το 2016 (Prüss-Ustün et al., 2019).

Το 2017, σύμφωνα με τον ΠΟΥ, υπολογίστηκε ότι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι, όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση εσωτερικών και εξωτερικών χώρων, το παθητικό κάπνισμα, το μη ασφαλές νερό, η έλλειψη υγιεινής και οι ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής, προκαλούν κάθε χρόνο το θάνατο 1,7 εκατομμυρίων παιδιών κάτω των 5 ετών. Μόνο η ατμοσφαιρική ρύπανση υπολογίζεται ότι προκαλεί 7 εκατομμύρια πρόωρους θανάτους ετησίως (Budnik et al., 2018).

4. Ανοσοχημικές μέθοδοι

Η ανακάλυψη των ανοσοπροσδιορισμών (immunoassays), με πρώτη την ραδιοανοσοανάλυση (RIA), συγκεκριμένα για τη μέτρηση της ινσουλίνης, έγινε από τους Yalow και Berson, των οποίων η έρευνα και τα αποτελέσματά της δημοσιεύτηκαν το 1959 (Tan and Bracha, 2019). Οι Yalow και Berson χρησιμοποίησαν ραδιοσημασμένη ινσουλίνη για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στο ανθρώπινο πλάσμα και έτσι ανέπτυξαν την πρώτη ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) (Grange et al., 2014).

Οι ανοσοχημικές τεχνικές εξελίχθηκαν και αναπτύχθηκαν νέες βελτιωμένες μέθοδοι με μεγαλύτερη ευαισθησία με την εμφάνιση και εξέλιξη της τεχνολογίας των υβριδωμάτων και των μονοκλωνικών αντισωμάτων (Σκορίλας, 2009). Ωστόσο, η βασική αρχή λειτουργίας τους παραμένει σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητη (Bishop, 2020).

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι αποτελούν αναλυτικές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στην υψηλή εξειδίκευση και αλληλεπίδραση αντισωμάτων με συγκεκριμένο αντιγόνο δημιουργώντας ένα ανοσοσύμπλοκο για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων ουσιών. Οι ανοσοπροσδιορισμοί χωρίζονται ανάλογα με το σήμα του ανοσοσυμπλόκου (σύνδεση αντιγόνων – αντισωμάτων) που μετράται, τον αριθμό των αντισωμάτων που συμμετέχουν στις χημικές αντιδράσεις, αλλά και στον διαχωρισμό των ανοσοσυμπλόκων από τα υπόλοιπα μέρη του διαλύματος (Καρκαλούσος κα., 2015). Το σήμα του ανοσοσυμπλόκου μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση ιχνηθέτη, ο οποίος μπορεί να είναι κάποια φωσφορίζουσα ή φθορίζουσα ένωση, κάποια ραδιενεργός ένωση ή ένζυμο που καταλύει αντίδραση (Castelli et al., 2022).

Συγκεντρωτικά, οι ανοσοχημικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

1) Ανάλογα με το σήμα και το είδος του ιχνηθέτη:

Σε ισοτοπικές, όπου μετράται σήμα από εκπομπή ραδιενέργειας και ονομάζονται ραδιοανοσολογικές μέθοδοι

Σε μη ισοτοπικές, οι οποίες αφορούν ενζυμικές αντιδράσεις παραγωγής έγχρωμου προϊόντος ή εκπομπής ακτινοβολίας και ονομάζονται, αντίστοιχα, ανοσοενζυμικές μέθοδοι και χημειοφωταύγεια ή ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού.

2) Ανάλογα με τον αριθμό των αντισωμάτων:

Σε ανταγωνιστικές μεθόδους, όπου χρησιμοποιείται σε περιορισμένη ποσότητα ένα μόνο ειδικό αντίσωμα για το μόριο που θα προσδιοριστεί, οπότε υπάρχει ανταγωνισμός για την κάλυψη των περιορισμένων θέσεων δέσμευσης μεταξύ του αντιγόνου (προς ανάλυση) του δείγματος με τα ιχνηθετημένα μόρια του αναλύτη, τα οποία έχουν προστεθεί στο δείγμα σε προκαθορισμένη ποσότητα (4.1). Αυτές οι τεχνικές απαιτούν μεγάλους χρόνους επώασης για την επίτευξη ισοροπίας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την ανίχνευση μικρών μορίων, όπως φαρμάκων ή ορμονών.

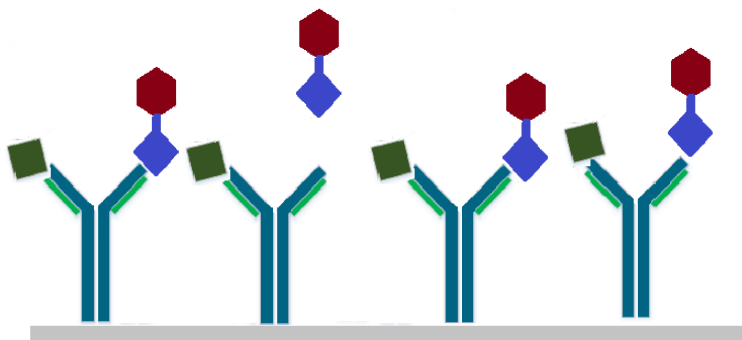
Σε μη ανταγωνιστικές μεθόδους, όπου χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα που μπορούν και δεσμεύονται σε διαφορετικούς επιτόπους στα μόρια του αναλύτη (4.2). Οι τεχνικές αυτές είναι γρηγορότερες και εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία, καθώς η καμπύλη ανάφοράς τους είναι γραμμική. Με αυτές τις μεθόδους διευκολύνεται η ανάλυση μεγάλων μορίων, όπως πρωτεϊνών (Dasgupta and Wahed, 2013; Καρκαλούσος κα., 2015).

3) Ανάλογα με το διαχωρισμό των ανοσοσυμπλόκων

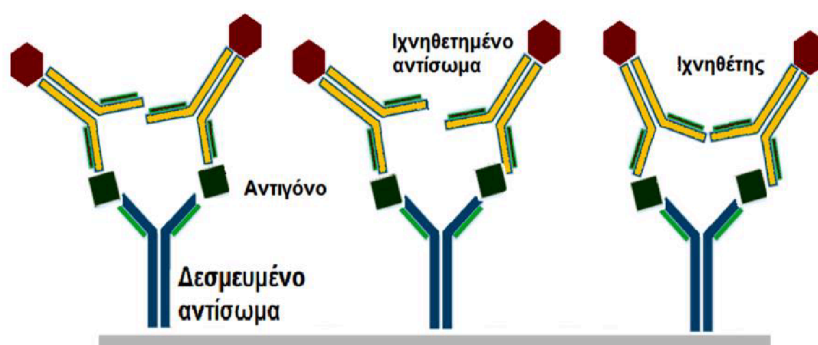
Σε ομογενείς τεχνικές (δοκιμασίες ελεύθερου διαλύματος), όπου το αντίσωμα και το αντιγόνο παραμένουν στην ίδια φάση, σε διαλυτή μορφή μέσα στο διάλυμα αντίδρασης, και δεν απαιτείται βήμα πλύσης και διαχωρισμού του ανοσοσυμπλόκου.

Στις ετερογενείς (δοκιμασίες στερεάς φάσης), όπου γίνεται διαχωρισμός των δεσμευμένων συστατικών από τα ελεύθερα (αντιγόνο ή αντίσωμα) με πλύση της στερεάς φάσης με κάποιο κατάλληλο διάλυμα και τα αντισώματα παραμένουν προσκολλημένα πάνω στη στερεή επιφάνεια (Dasgupta and Wahed, 2013; Καρκαλούσος κα., 2015).

Στον 4.1 συνοψίζονται οι βασικές κατηγορίες των ανοσοχημικών μεθόδων. Σε πολλές ανοσοδοκιμασίες κατά τις οποίες μετράται το τελικό σήμα που δημιουργείται (απορρόφηση UV, φθορισμός, χημειοφωταύγεια, θολερότητα), χρησιμοποιούνται φασματοφωτομετρικές αρχές μέσω κατάλληλου φασματοφωτόμετρου (Dasgupta and Wahed, 2013). Στον 4.2 κατηγοριοποιούνται οι πιο συνηθισμένοι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί και στον 4.3 παρουσιάζονται οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι ιχνηθέτες.



Εικόνα 4.1 Ανταγωνιστική μέθοδος (Καρκαλούσος κα., 2015)



Εικόνα 4.2 Μη ανταγωνιστική μέθοδος (Καρκαλούσος κα., 2015)

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από ευκολία, απλότητα, ταχύτητα, αυτοματοποίηση και προειδοποίηση κακής ποιότητας δείγματος, υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια λόγω της υψηλής εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος και είναι κατάλληλες για διαγνωστικές αναλύσεις ρουτίνας σε κλινικά εργαστήρια. Μπορούν να εφαρμοστούν για τον προσδιορισμό περισσότερων από 100 αναλυτών χωρίς περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος ή κίνδυνος καταστροφής του, με χρήση μικρού όγκου δείγματος (10μL – 50μL) χωρίς προηγούμενη προετοιμασία. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτοί εμφανίζουν παρεμβολές τόσο από ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται απευθείας στα εργαστηριακά πληροφορικά συστήματα σε 10 με 30 λεπτά (Koivunen and Krogsrud, 2006; Dasgupta and Wahed, 2013).

Πίνακας 4.1 Βασικές κατηγορίες ανοσοχημικών μεθόδων (Καρκαλούσος κα., 2015)

ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΣΗΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΟΥ ΙΧΝΗΘΕΤΗ		
Μη ισοτοπικές μέθοδοι		Ισοτοπικές μέθοδοι
Ανοσοενζυμικές μέθοδοι	Χημειοφωταύγεια/ Ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού	Ραδιοανοσολογικές μέθοδοι
Χρωματική αντίδραση	Ένταση παραγόμενου φωτός	Εκπεμπόμενη ραδιενέργεια
Ιχνηθέτες ένζυμα	Ιχνηθέτες φθορίζουσες χρωστικές	Ιχνηθέτες ραδιοϊσότοπο
ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ		
Ανταγωνιστικές μέθοδοι		Μη ανταγωνιστικές μέθοδοι
Ένα αντίσωμα		Δύο αντισώματα
ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΑΝΟΣΟΣΥΜΠΛΟΚΩΝ		
Ομογενείς μέθοδοι		Ετερογενείς μέθοδοι
Διαλυτό ανοσοσύμπλοκο		Ακίνητοποιημένο ανοσοσύμπλοκο

Πίνακας 4.2 Κατηγοριοποίηση συχνών ανοσοχημικών προσδιορισμών (Slagle and Ghosn, 1996)

Ανοσοπροσδιορισμός	Ανταγωνιστικός	Μη ανταγωνιστικός	Ομογενής	Ετερογενής	Ιχνηθέτης	Ανίχνευση
ELISA Enzyme Linked immunosorbent assay	X	X		X	Ένζυμα	Χρωματομετρία ή φθορισμομετρία
EMIT Enzyme multiplied immunoassay	X		X		Ένζυμα	Χρωματομετρία
MEIA Microparticle enzyme immunoassay		X		X	Ένζυμα	Χρωματομετρία ή φθορισμομετρία
RIA Radioimmunoassay	X			X	Ραδιοϊσότοπα	Μέτρησης ραδιενέργειας
FPIA Fluorescence Polarization	X			X	Φθορίζουσα ουσία	Μέτρηση πόλωσης φθορισμού
SLFIA Substrate labeled fluorescence immunoassay	X			X	Ενζυμικό υπόστρωμα	Φθορισμομετρία
CHIA* Chemiluminescence immunoassay					Αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας	Φωτομετρία
*Γενική κατηγορία : περιλαμβάνει όλους τους τύπους ανοσοδοκιμασιών						

Πίνακας 4.3 Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι ιχνηθέτες (Kricka and Park, 2014).

Χημειοφωταυγής ένωση	εστέρας Ακριδινίου, ισολουμινόλη
Ηλεκτροχημειοφωταυγής ένωση	χηλικό τρις(διπυριδύλιο) ρουθίνιο (II)
Ένζυμο	Αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση, αφυδρογονάση 6-φωσφορικής γλυκόζης, υπεροξειδάση χρένου
Φθοριοφόρο	Χηλικό ευρώπιο, φλουορεσκεΐνη
Ισότοπο	¹²⁵ Ιώδιο, τρίτιο ³ H
Μέταλλο	Χρυσό, σελήνιο, ασήμι
Σωματίδιο	Ερυθροκύτταρα, χάντρα λατέξ, κβαντική κουκκίδα, άνθρακας
Φώσφορος	Νανοσωματίδιο ανωδικής μετατροπής που περιέχει λανθανίδη
Πολυνουκλεοτιδικό	DNA

Οι ανοσοπροσδιορισμοί χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια κλινικής χημείας για τη μέτρηση βιολογικών ουσιών, όπως πρωτεϊνών, ορμονών, μεταβολιτών, καθώς και μεγαλομορίων ιατρικού ενδιαφέροντος, όπως των νουκλεϊκών οξέων στον ορό, στο πλάσμα, στο αίμα, στους ιστούς και τα όργανα. Επιπλέον, συμβάλλουν σημαντικά στη διάγνωση ασθενειών, όπως επίσης στην διάγνωση και τον έλεγχο ενδοκρινικών διαταραχών, στον θεραπευτικό έλεγχο φαρμάκων και στην παρακολούθηση των επιπέδων της ανοσολογικής απόκρισης (Σκορίλας, 2009; Καρκαλούςος κα., 2015; Bishop 2020).

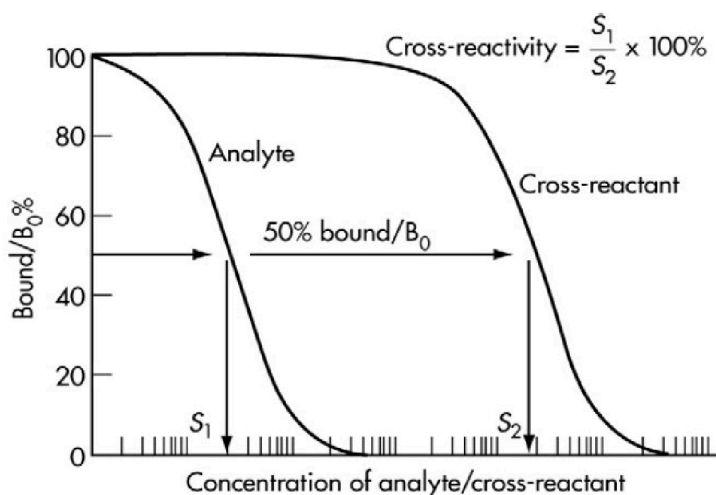
4.1 Κριτήρια επιλογής και καταλληλότητας των ανοσοχημικών μεθόδων

Οι απαιτήσεις μιας ανάλυσης για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση ενός αναλύτη καθορίζουν την ποιότητα και την καταλληλότητα της μεθόδου. Οι βασικοί παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα των ανοσοχημικών μεθόδων είναι κυρίως η εξειδίκευση (Specificity), η πιστότητα/εγκυρότητα (Precision) και η ακρίβεια (Accuracy), όριο ανίχνευσης (detection of limit), ποσοτικό όριο (quantitation limit), γραμμικότητα (linearity), και εύρος ανίχνευσης (range), ενώ και άλλα κριτήρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η ευαισθησία (sensitivity) και η ανθεκτικότητα/αντοχή (ruggedness/ robustness) (Sahoo et al., 2018):

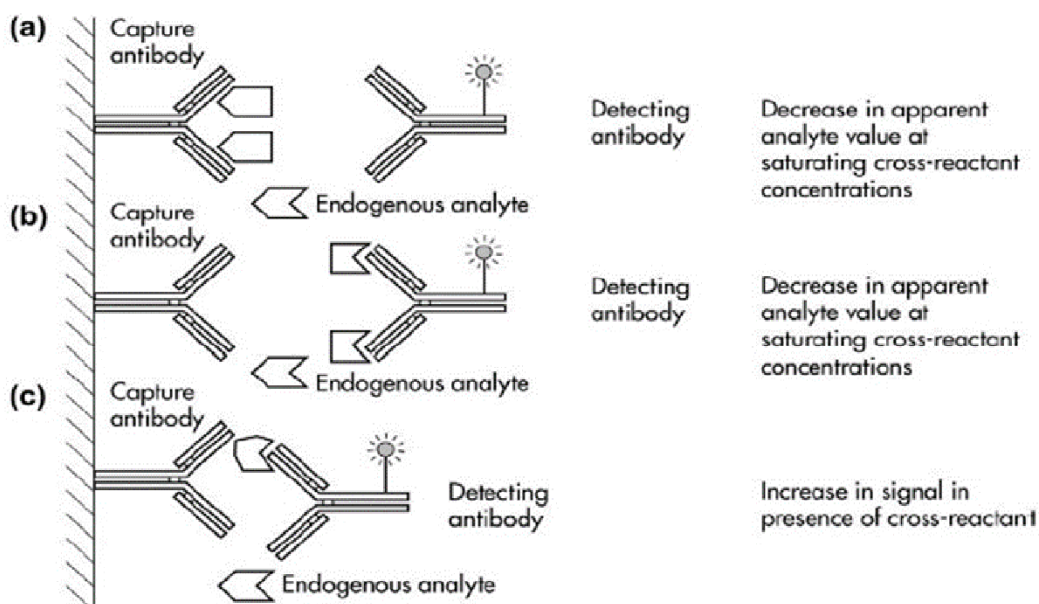
Εξειδίκευση

Η εξειδίκευση της μεθόδου αφορά την απόκριση του αντισώματος στην προσδιοριζόμενη ουσία. Η υψηλή ειδικότητα που εμφανίζουν μπορεί να παρεμποδιστεί από τη σύνδεσή τους με ουσίες που χημικά μοιάζουν με την εξεταζόμενη ουσία, κι αυτό συνήθως γίνεται όταν εφαρμόζονται πολυκλωνικά αντισώματα αντί για μονοκλωνικά, τα οποία εμφανίζουν αναλυτική ειδικότητα. Αυτό συμβαίνει λόγω αναγνώρισης επιτόπων που είναι κοινοί σε περισσότερα από ενός αντιγόνα. Αυτός ο τύπος παρεμπόδισης της μεθόδου χαρακτηρίζεται ως διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross-reactivity) (Wild, 2013; Vashist and Luong, 2018). Για την αξιολόγηση της κάθε ανοσοχημικής μεθόδου ελέγχεται η εξειδίκευση και η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ορίζεται ως το ποσοστό της συγκέντρωσης του αναλύτη προς τη συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί την παρεμπόδιση (Vashist and Luong, 2018). Συγκεκριμένα, ορίζεται στο σημείο όπου η μείωση του σήματος αντιστοιχεί στο 50% του σήματος που επιτυγχάνεται απουσία της αναλυόμενης ουσίας (B /Bo 50%) σαν ποσοστό της συγκεντρώσεως της αναλυόμενης ουσίας που δίνει την

ίδια πτώση σήματος (4.3, 4.4). Όσο αυξάνει η εξειδίκευση τόσο όμως μικραίνει η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (Wild, 2013).



Εικόνα 4.3. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (Wild, 2013)



Εικόνα 4.4. Cross reactivity σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς a) ο παρεμποδιστής συνδέεται με το αντίσωμα πρόσδεσης b) ο παρεμποδιστής συνδέεται με το αντίσωμα ανίχνευσης c) ο παρεμποδιστής συνδέεται και στα δύο είδη αντισωμάτων (Wild, 2013).

Ευαισθησία

Η ευαισθησία αφορά τη χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη, η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια. Όσο χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη η οποία ανιχνεύεται, τόσο μεγαλύτερη η ευαισθησία της μεθόδου (Vashist and Luong, 2018).

Εγκυρότητα - Πιστότητα

Η εγκυρότητα/πιστότητα υποδηλώνει την μικρότερη απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της ανάλυσης καθορίζοντας την επαναληψιμότητα της μεθόδου, ενώ η αβεβαιότητα (imprecision) είναι το αντίθετο της εγκυρότητας. Η «υψηλή πιστότητα» μιας μεθόδου υποδηλώνει το ίδιο με τη «χαμηλή αβεβαιότητα». Συγκεκριμένα η πιστότητα-εγκυρότητα μετράει το σφάλμα μια μεθόδου στις επαναλήψεις της και εκφράζεται ως το επί τοις εκατό ποσοστό συντελεστή μεταβλητότητας (%CV, coefficient of variation) ή ως η τυπική απόκλιση (SD) της αναλυόμενης ουσίας. Η πιστότητα για τις διάφορες συγκεντρώσεις των αναλυόμενων ουσιών στο εύρος ανίχνευσης πρέπει να είναι περίπου στο 15% του συντελεστή μεταβλητότητας (Wild, 2013; Vashist and Luong, 2018).

Ανθεκτικότητα/Αντοχή

Η αξιοπιστία και η ευαισθησία μιας μεθόδου επηρεάζονται από την υψηλή συγγένεια των αντισωμάτων και τον ρυθμό πραγματοποίησης της αντίδρασης σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Η επιβράδυνση του ρυθμού αντίδρασης μειώνει την εγκυρότητα και αυξάνει την αβεβαιότητα. Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την ταχύτητα της δέσμευσης αντισώματος-αντιγόνου και κατ' επέκταση το ρυθμό αντίδρασης είναι η συγκέντρωση του αντισώματος, η θερμοκρασία, το pH του μείγματος και η ιοντική του ισχύς (Wild, 2013). Η κάθε μικρή αλλαγή αυτών και άλλων παραμέτρων που μπορεί να αποδόσει διαφορετικά αποτελέσματα αυξάνει την αβεβαιότητα της μεθόδου, ενώ μια μέθοδος έχει αντοχή και ανθεκτικότητα όταν έχει χαμηλή ευαισθησία στις αλλαγές των πειραματικών συνθηκών. Εκτός από τις φυσικές, οι μέθοδοι συνήθως υπόκεινται και σε χημικές παρεμβολές, οι οποίες μπορεί να επιφέρουν αβεβαιότητα στα αποτελέσματα της ανάλυσης, ενώ μέθοδοι σχετικά απαλλαγμένες από χημικές παρεμβολές έχουν ανεκτικότητα και ανθεκτικότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικιλία υποστρωμάτων για την ανάλυση μιας ουσίας (Vander Heyden et al., 2001).

Ακρίβεια

Η ακρίβεια σχετίζεται με την απόκλιση της προσδιορισθείσας συγκέντρωσης από την πραγματική της τιμή. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ουσίας γίνεται με πρότυπες καμπύλες αναφοράς και βαθμονόμησης, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα άλλων εργαστηρίων και με τα δεδομένα αναφοράς και κλινικών συνθηκών (Wild, 2013).

Ο όρος “ακρίβεια” δεν είναι ταυτόσημος με τον όρο “πιστότητα” της μέτρησης. Μια ανάλυση μπορεί να παράγει έγκυρα αλλά ανακριβή δεδομένα. Η αναπαραγωγιμότητα δεν εγγυάται την ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Η πιστότητα και η ακρίβεια είναι σημαντικές αλλά διακριτές πτυχές της αναπαραγωγιμότητας. Η ακρίβεια υποδεικνύει πόσο κοντά βρίσκονται οι μετρούμενες τιμές στην πραγματική τιμή του στόχου ή της αναλυόμενης ουσίας σε ένα δείγμα. Η πιστότητα-εγκυρότητα περιγράφει την επαναληψιμότητα της ανάλυσης, τη διακύμανση και το σφάλμα μεταξύ των μετρήσεων της ανάλυσης και στην ουσία πόσο παρόμοια και κοντά είναι τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων αναλύσεων (Pillai-Kastoori et al., 2020). Στην Εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η διαφορά μεταξύ ακρίβειας και πιστότητας.



Εικόνα 4.5 Διαφορά ακρίβειας και πιστότητας μιας μεθόδου (Καρκαλούσος κα., 2015)

Γραμμικότητα

Όταν τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι ανάλογα της συγκεντρώσεως του αναλύτη στο δείγμα ενώ βρίσκονται μέσα σε δεδομένο εύρος ανίχνευσης, τότε η μέθοδος έχει γραμμικότητα. Το εύρος ανίχνευσης καθορίζεται από: 1) την ποσότητα του αναλύτη στα

δείγματα, 2) την αναμενόμενη συγκέντρωσή του και 3) την ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί δίνοντας μετρήσιμο σήμα (Sahoo et al., 2018).

Εύρος ανίχνευσης

Το εύρος ανίχνευσης ή μετρήσεως μιας μεθόδου είναι οι ανιχνεύσιμες τιμές συγκέντρωσης του αναλύτη, οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν από ακρίβεια, πιστότητα και γραμμικότητα (Sahoo et al., 2018).

Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Η χαμηλότερη προσδιορισμένη με αξιοπιστία συγκέντρωση ενός αναλύτη, χωρίς όμως την ικανότητα ποσοτικοποίησης με μια δεδομένη μέθοδο, αποτελεί το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection - LOD). Η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με τη μέθοδο και να διακριθεί από το μηδέν ονομάζεται όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation – LOQ) (Sahoo et al., 2018).

4.2 Ισοτοπικοί ανοσοπροσδιορισμοί

Οι ισοτοπικοί ανοσοπροσδιορισμοί έχουν ως ιχνηθέτες ραδιενεργά άτομα και αποτελούν την ραδιοανάλυση (RIA) και παραλλαγή αυτής, την ανοσοραδιοανάλυση (IRMA) (Καρκαλούςος κα., 2015). Η ανίχνευση του σήματος στηρίζεται στη μέτρηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας από τη διάσπαση του ραδιονουκλιδίου, η οποία μπορεί να είναι α , β , γ ακτινοβολία ή ακτίνες X (Σκορίλας, 2009). Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ραδιοϊσότοπα για την εφαρμογή τους, με συχνότερο και ευρέως εφαρμοσμένο το ^{125}I (Καρκαλούςος κα., 2015).

Οι ραδιοπροσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία λόγω της ικανότητας τους να ανιχνεύουν μικρό όγκο δείγματος, 10^{-6} με 10^{-14} mol/l (Wu and Ju, 2012). Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με τις εναλλακτικές τεχνικές, όπως η καθίζηση ή η συγκόλληση συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος, οι οποίες χρησιμοποιούν δευτερεύοντα μέτρα ορατής αντίδρασης, οι ραδιοϊσοτοπικές τεχνικές αφορούν πρωτογενή αντίδραση μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων σε διάλυμα που επιτρέπουν την ανίχνευση πολύ μικρότερων ποσοτήτων αντιγόνου (Tan and Bracha, 2019). Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από αξιοπιστία και ακρίβεια, όπως

επίσης και από ανθεκτικότητα, καθώς η διαδικασία διάσπασης των ραδιοϊσοτόπων δεν επηρεάζεται από παράγοντες κοινούς στα βιολογικά μέσα, όπως το pH, η ιοντική ισχύς και παρεμποδιστές, σε αντίθεση με τις μεθόδους που εξαρτώνται από οπτικές μετρήσεις και ενζυμικές δραστηριότητες (Wu and Ju, 2012). Ωστόσο, η χρήση ραδιενεργών ιχνηθετών (συνήθως [^{125}I]) φέρουν ως αποτέλεσμα μικρή διάρκεια ζωής, αυστηροί κανονισμοί και τήριση νομοθετικών οδηγιών για την εξασφάλιση κατάλληλων προφυλάξεων κατά την παρασκευή και φύλαξη τους, όπως επίσης η ανάγκη ειδικών οργάνων και εργαστηρίου με εξειδικευμένο προσωπικό, αποτελούν τα κυριότερα μειονεκτήματα της. Οι λόγοι αυτοί μπορεί να είναι ικανοί να περιορίσουν τη χρήση της τεχνολογίας αυτής σε κλινικά και μικρά εργαστήρια, κυρίως λόγω ανησυχιών σχετικά με τον ασφαλή χειρισμό και την απόρριψη ραδιενεργών αντιδραστηρίων και αποβλήτων (Wu and Ju, 2012; Grange et al., 2014; Kricka and Park, 2014; Καρκαλούσος κα., 2015; Dwivedi, 2022).

4.2.1 Ραδιοανοσοανάλυση (Radioimmunoassay, RIA)

Η ραδιοανοσοανάλυση (RIA) είναι η πρώτη ανοσοχημική μέθοδος ιστορικά και στηρίζεται στην μέτρηση της ακτινοβολίας γ , με μετρητή γ ακτινοβολίας ή σπινθηρισμού, η οποία εκπέμπεται από το επισημασμένο ανοσοσύμπλοκο. Είναι ετερογενής, ανταγωνιστική μέθοδος, στην οποία απαιτείται ένα δείγμα που περιέχει το προς ανίχνευση αντιγόνο, ένα συμπληρωματικό αντίσωμα και μια ραδιοσημασμένη έκδοση του αντιγόνου (4.6).

Εικόνα 4.6 Ραδιοανοσοανάλυση (RIA) – ανταγωνιστική μέθοδος

Κατά τη διαδικασία της μεθόδου, το αντιγόνο του δείγματος ανταγωνίζεται το ραδιοσημασμένο αντιγόνο (Ag^*) για να συνδεθεί με το αντίσωμα. Στην 4.7 παρουσιάζονται τα βήματα της ραδιοανοσοανάλυσης. Όσο περισσότερη ποσότητα του αντιγόνου δείγματος έχει συνδεθεί με το αντίσωμα, τόσο περισσότερο αδυνατεί το ραδιοσημασμένο αντιγόνο να δεσμευτεί στο αντίσωμα με αποτέλεσμα μικρότερη ποσότητα του ραδιοσημασμένου αντιγόνου να μπορεί να προσδεθεί στο αντίσωμα. Η αναλογία αντισώματος προς

ραδιοσημασμένο αντιγόνο πρέπει να διασφαλίζει ότι ο αριθμός των επιτόπων που θα δεσμεύσει το ραδιοσημασμένο αντιγόνο θα είναι πάντοτε μεγαλύτερος από τον συνολικό αριθμό των θέσεων πρόσδεσης στο αντίσωμα (Mohanty and Leela, 2013; Grange et al., 2014). Στην ουσία η ραδιενέργεια θα είναι μέγιστη όταν τα επισημασμένα αντιγόνα συνδεθούν με τα αντισώματα. Μόλις συγκεκριμένα αντιγόνα ενδιαφέροντος του δείγματος που προστίθεται συνδεθούν με τα αντισώματα, τα επισημασμένα αντιγόνα απελευθερώνονται και ως εκ τούτου η ραδιενέργεια του διαλύματος θα μειωθεί. Η φθίνουσα ραδιενέργεια επιβεβαιώνει πως το αντιγόνο ενδιαφέροντος υπάρχει στο δείγμα, ενώ αν η ραδιενέργεια παραμένει ίδια το αντιγόνο ενδιαφέροντος λείπει και το τεστ ονομάζεται αρνητικό. Η τυπική καμπύλη προκύπτει από την ποσοστιαία ραδιενέργεια προς γνωστή συγκέντρωση μη επισημασμένων αντιγόνων, κατά την οποία με την αυξανόμενη συγκέντρωση μη επισημασμένων αντιγόνων, η ραδιενέργεια μειώνεται. Το άγνωστο δείγμα προς ανάλυση εκτελείται παράλληλα ακολουθώντας παρόμοια διαδικασία και η μετρούμενη ραδιενέργεια βαθμονομείται με την πρότυπη καμπύλη για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου (Sharma et al., 2014; Dwivedi, 2022). Αφού αποκατασταθεί η ισορροπία του σχηματισμένου ανοσοσυμπλόκου και διαχωριστεί το ελεύθερο αντιγόνο από το δεσμευμένο με κατάλληλη μέθοδο διαχωρισμού, πραγματοποιείται η μέτρηση της ακτινοβολίας.

Εικόνα 4.7 Εφαρμογή ραδιοανοσοανάλυσης (RIA) – βήματα (Dwivedi, 2022)

Ο διαχωρισμός του ελεύθερου αντιγόνου από το δεσμευμένο είναι υψίστης σημασίας και μπορεί να συμβεί με τους εξής τρόπους:

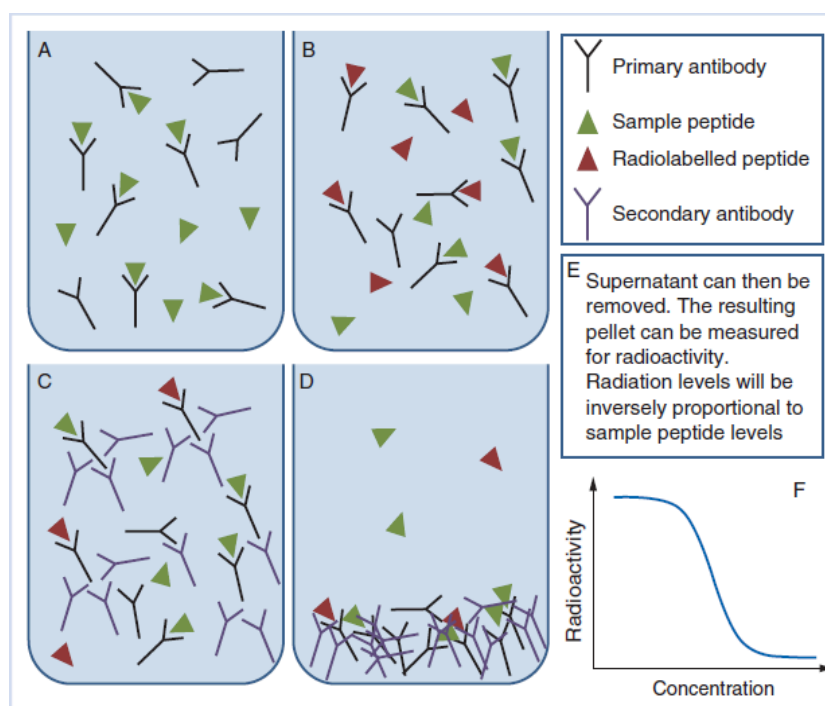
Προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα ή με πρωτεΐνη A

Καθίζηση με χρήση αντιδραστηρίου, όπως πολυαιθυλενογλυκόλης κα.

Σύνδεση με διπλό αντίσωμα και μαγνητικά σφαιρίδια ακολουθούμενη από καθίζηση (Σκορίλας, 2009)

Σχηματισμός συμπλόκου με προσθήκη δεύτερου αντισώματος, ικανού να προσδεθεί σε οποιοδήποτε αντίσωμα επιτρέποντας το διαχωρισμό του ελεύθερου

ραδιοσημασμένου αντιγόνου από το συνδεδεμένο. Στη συνέχεια, με φυγοκέντρηση απομακρύνεται το υπερκείμενο και συλλέγονται τα σύμπλοκα των αντισωμάτων στο ίζημα όπου μετράται η ραδιενέργεια των δύο κλασμάτων (δεσμευμένο και ελεύθερο αντιγόνο). Με τη μέτρηση της ραδιενέργειας, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η ποσότητα του ραδιοσημασμένου αντιγόνου που έχει δεσμευτεί στο αντίσωμα, και επομένως η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα (4.8) (Grange et al., 2014). Η τεχνική αυτή αν και εφαρμόσιμη, δεν είναι αρκετά πρακτική λόγω του μεγάλου χρόνου επώασης.



Εικόνα 4.8 Ραδιοανοσοανάλυση – διαχωρισμός με προσθήκη δεύτερου αντισώματος: A) Σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου, B) ανταγωνισμός από προσθήκη ραδιοσημασμένου αντιγόνου, C) προσθήκη δεύτερου αντισώματος το οποίο προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, D) συλλογή συμπλόκων αντισωμάτων σε ίζημα έπειτα από φυγοκέντρηση με απομάκρυνση του υπερκείμενου – Στη συνέχεια μετράται η ραδιενέργεια στο ίζημα, όπου τα επίπεδα ακτινοβολίας θα είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα των αντιγόνων στο δείγμα, F) Παράδειγμα τυπικής καμπύλης αναφοράς (Grange et al., 2014).

Η ραδιοανοσοανάλυση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για την ανίχνευση πεπτιδικών ορμονών και βρίσκει εφαρμογή κυρίως:

Στην ανάλυση πολλών ορμονών (γονιμότητας, υπόφυσης, επινεφριδίων), όπως ινσουλίνης και θυροξίνης, και καρδιολογικών ορμονών για τη διάγνωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της συμφορητικής καρδιακής νόσου,

Στην ανίχνευση αλλεργιογόνων,

Στην ανίχνευση καρκινικών βιοδεικτών και του πρώιμου σταδίου του καρκίνου,

Στην ανίχνευση φαρμάκων, πχ μορφίνη, και βιταμικών για την παρακολούθηση των επιπέδων τους στον ορό,

Στην ανίχνευση διαφορετικών ικών αντιγόνων,

Στην ανίχνευση επιφανειακών αντιγόνων της ηπατίτιδας Β,

Στην ανίχνευση μυκοτοξινών (Grange et al., 2014; Dwivedi, 2022).

Οι περισσότερες μορφές ανάλυσης συνιστούν καθαρισμό που περιλαμβάνει χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων ακολουθούμενη από κάποια μορφή ξήρανσης με ψύξη / λυοφιλοποίηση (Grange et al., 2014).

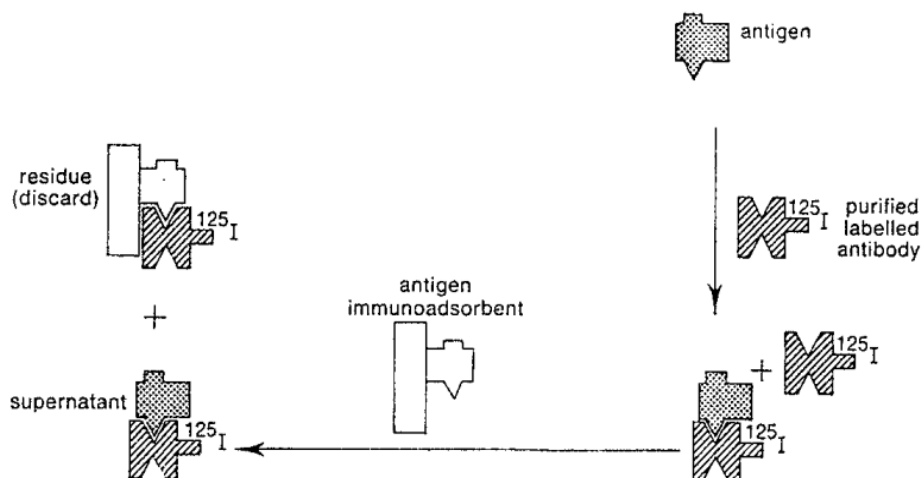
4.2.2 Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (Immunoradiometric assay, IRMA)

Η ανοσοραδιομετρική ανάλυση (IRMA) αναπτύχθηκε το 1968 από τους Miles και Hales. Η μέθοδος IRMA μοιάζει πολύ με την RIA, με τη διαφορά ότι μπορεί να εφαρμοστεί στον προσδιορισμό διαλυτών αντιγόνων και είναι μη ανταγωνιστική μέθοδος (Miles, 1975). Επιπλέον, ως τεχνική περίσσειας αντιδραστηρίου, τα αποτελέσματά της παρουσιάζουν γραμμικότητα και παρέχει υψηλότερη ευαισθησία από την RIA (Sharma et al., 2014). Ακόμα, ως μη ανταγωνιστική μέθοδος τα ραδιενεργά αντισώματα συνδυάζονται αμέσως με την ένωση που πρόκειται να μετρηθεί, το οποίο έχει ως πλεονέκτημα οι αναλύσεις να πραγματοποιούνται σε συντομότερο χρονικό διάστημα λόγω των λιγότερων πειραματικών βημάτων (Σκορίλας, 2009; Sharma et al., 2014).

Κατά την ανάλυση, χρησιμοποιείται μια περίσσεια συγκέντρωσης διαλυτού καθαρισμένου ραδιενεργού αντισώματος, το οποίο αντιδρά με το άγνωστο αντιγόνο, ενώ πραγματοποιείται και μια δεύτερη αντίδραση με ένα αντιγόνο στερεάς φάσης. Τα αχρησιμοποιήτα ραδιενεργά αντισώματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση, ενώ το ραδιενεργό σύμπλοκο παραμένει στο

υπερκείμενο (4.9). Η ποσότητα ραδιενέργειας του ανοσοσυμπλόκου στο διάλυμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου, η οποία προσδιορίζεται με πρότυπη καμπύλη αναφοράς (Miles, 1975; Σκορίλας, 2009; Sharma et al., 2014).

Η τεχνική IRMA δεν εφαρμόζεται για την ανίχνευση αντιγόνων μικρού μοριακού βάρους, όπως παράδειγμα οι μυκοτοξίνες, καθώς δεν μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικά αντισώματα. Ωστόσο, η χρήση δύο αντισωμάτων καθιστά τη μέθοδο IRMA πιο συγκεκριμένη από τη RIA (Sharma et al., 2014). Οι Addison και Hales (1971) ανέπτυξαν την τεχνική “two – site” IRMA, η οποία αυξάνει την ευαισθησία και την εξειδίκευση της αρχικής μεθόδου. Η τεχνική αυτή μπορεί να είναι στερεάς ή υγρής φάσης, αναλόγως με το που εντοπίζονται τα αντισώματα και το αντιγόνο, ενώ η τεχνική όπου το αντιγόνο βρίσκεται στερεωμένο σε στερεά φάση και το αντίσωμα είναι στην υγρή χαρακτηρίζεται ως “one – site” IRMA (Σκορίλας, 2009).



Εικόνα

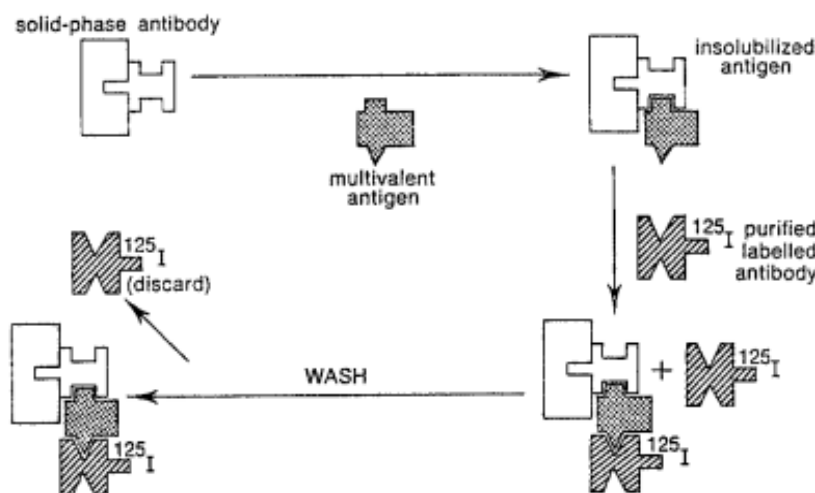
Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (IRMA) – μη ανταγωνιστική μέθοδος (Miles, 1975)

4.9

Στην τεχνική “two – site” IRMA (ή αλλιώς “sandwich” IRMA), χρησιμοποιούνται δύο ειδικά για το ίδιο αντιγόνο μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία συνδέονται με δύο διαφορετικούς επιτόπους. Το ένα αντίσωμα επικαλύπτεται στη στερεά φάση και χρησιμοποιείται ως ανοσοεκχυλιστικό για το αντιγόνο στο οποίο και συνδέεται, ενώ το δεύτερο είναι σημασμένο συνήθως με ^{125}I και προστίθεται στη στερεά φάση. Αυτό το επισημασμένο αντίσωμα

συνδέεται και αυτό με το αντιγόνο. Η ποσότητα του αντιγόνου που θα προσκολληθεί στο συζευγμένο αντίσωμα προσδιορίζεται έπειτα από επώαση με το επισημασμένο αντίσωμα. Στο τέλος της αντίδρασης, το επισημασμένο αντίσωμα που δεν αντέδρασε αναρροφάται και η στερεά φάση ξεπλένεται (4.10). Η ραδιενέργεια στη στερεά φάση είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας (Sharma et al., 2014). Στην “Two – site” υγρή φάση τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται βρίσκονται στην υγρή φάση. Η διαδικασία είναι ίδια με την προηγούμενη με τη διαφορά ότι γίνεται καταβύθιση του συμπλόκου με δευτερογενές αντίσωμα που είναι συνήθως αντι – IgG (Σκορίλας, 2009).

Η τεχνική IRMA 2 θέσεων περιορίζεται σε αντιγόνα που μπορούν είτε α) να δεσμευτούν ταυτόχρονα σε τουλάχιστον 2 αντισώματα, είτε β) να συνδεθούν σε ένα επισημασμένο αντίσωμα μετά από κάποια διαδικασία μη ανοσολογικής αδιαλυτοποίησης. Τόσο η IRMA όσο και η IRMA 2 θέσεων έχουν προσαρμοστεί στη χρήση επισημασμένου anti-IgG ως πρόσθετου “καθολικού” αντιδραστήριου, αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη παρασκευής ραδιενεργών αντισωμάτων ειδικών για το άγνωστο αντιγόνο (Miles, 1975).



Εικόνα 4.10 “2 θέσεων” Ανοσοραδιομετρική ανάλυση (2-site IRMA) (Miles, 1975)

Τα αντιγόνα που προσδιορίζονται από τη μέθοδο IRMA περιλαμβάνουν: αγγειοτενσίνη, καλσιτονίνη, ACTH, ινσουλίνη, παραθυρεοειδική ορμόνη, HGH, FSH, LH, τοξίνη τετάνου, IgG, φερριτίνη και αντι-αιμοφιλικό παράγοντα.

Τα αντιγόνα που προσδιορίζονται από τη μέθοδο 2 θέσεων IRMA περιλαμβάνουν: αυξητικό παράγοντα νεύρου παραθυρεοειδούς ορμόνης, HGH, LH, FSH άρα, ωοαλβουμίνη HCG, τοξίνη τετάνου και λευκωματίνη, IgE, αντιγόνο ηπατίτιδας B, TSH, αντιγόνο X, φερριτίνη, GFAP, s-100, α-εμβρυοπρωτεΐνη και αντι-θυμοκυτταρική σφαιρίνη (Miles, 1975).

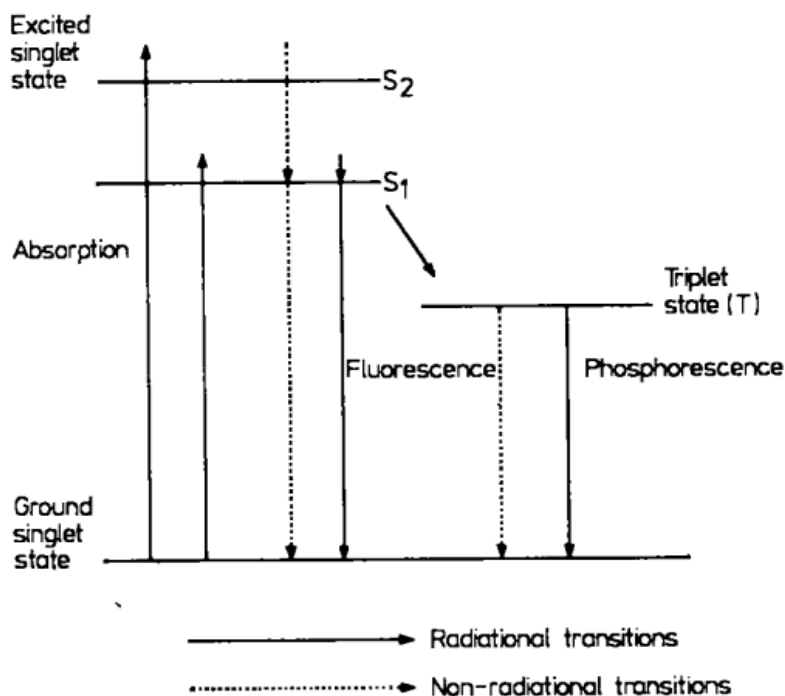
4.3 Ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού (Fluorescence immunoAssays, FIA)

Ο ανοσοπροσδιορισμός φθορισμού προσφέρει ένα σύστημα παραγωγής και ανίχνευσης σήματος, εναλλακτικό της μεθόδου RIA, με δυνητικά μεγαλύτερη ευαισθησία, συνδυάζοντας την υψηλή εξειδίκευση των αντισωμάτων με την ευαισθησία της φθορισμομετρίας χρησιμοποιώντας φθορίζουσες ουσίες ως ιχνηθέτες στο εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα (Smith and Eremin, 2008; Routledge and Hutchings, 2013). Η απεικόνιση τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού, φθορόμετρο, σαρωτή φθορισμού ή κυτταρόμετρο ροής. Τα φθοροφόρα διεγείρονται από το φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και απελευθερώνουν την επιπλέον ενέργεια εκπέμποντας φως σε άλλο, μεγαλύτερο μήκος κύματος (Koivunen and Krosgrud, 2006). Η πιο συνηθισμένη φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιείται στους ανοσοφθορισμομετρικούς προσδιορισμούς ως ιχνηθέτης είναι η φλουορεσκεΐνη. Η φλουορεσκεΐνη εκπέμπει στα 520 nm και το δείγμα ακτινοβολείται σε μήκος κύματος πολωμένου φωτός στα 490 nm (Smith and Eremin, 2008; Kricka and Park, 2014). Άλλο φθοροφόρο είναι η ροδαμίνη B η οποία ακτινοβολείται στα 550 nm και εκπέμπει στα 585 nm (Kricka and Park, 2014).

Όπως παρουσιάζεται στην 4.11, ένα φωτόνιο κατάλληλης ενέργειας και συγκεκριμένου μήκους κύματος διέγερσης (μήκος κύματος απορρόφησης), προκαλεί διέγερση του μορίου σε διάφορα επίπεδα υψηλότερης ηλεκτρονικής στάθμης (S_1 , $S_2...$) από την αρχική του κατάσταση (S_0) στην οποία πάλι επιστρέφει με μη ακτινοβολικές μεταβάσεις. Κατά την επιστροφή του μορίου στην αρχική του κατάσταση, απελευθερώνεται ενέργεια με εκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος (μήκος κύματος εκπομπής). Η απευθείας μετάβαση του μορίου στην αρχική του κατάσταση λέγεται φθορισμός, ενώ στην περίπτωση που επιστρέφει μέσω μιας ενδιάμεσης κατάστασης (T) τότε το φαινόμενο λέγεται φωσφορισμός (Smith et al., 1981; Hemmilä, 1985; Chan, 1987). Η αποτελεσματικότητα του διεγερμένου μορίου για την απελευθέρωση της ενέργειας υπο μορφή φωτός ονομάζεται κβαντική απόδοση (q) και

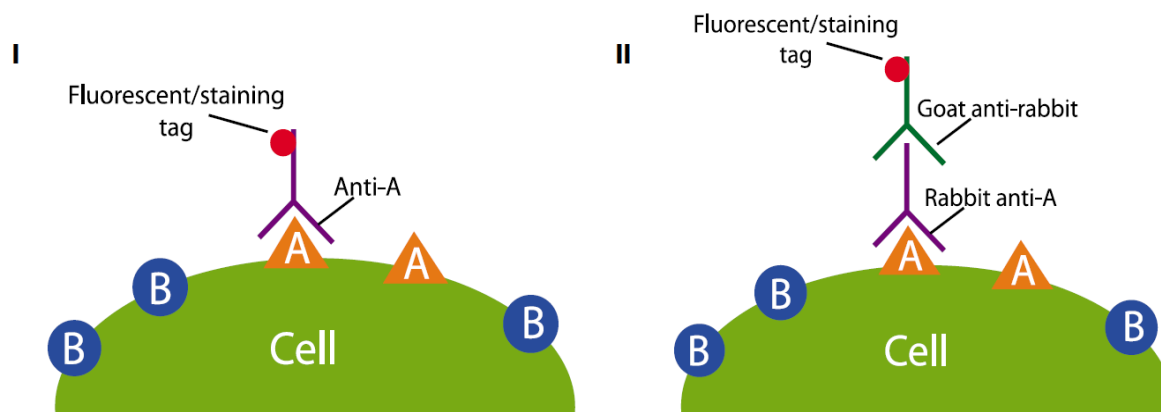
ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των ποσοτήτων που εκπέμπονται προς τον αριθμό των ποσοτήτων που απορροφώνται. Η ένταση του φθορισμού και ειδικά το q εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία, τον διαλύτη (π.χ. την πολικότητα, pH), τη συγκέντρωση. Τα φθορίζοντα μόρια χαρακτηρίζονται επίσης από την απορροφητικότητα τους, τα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης, την κβαντική απόδοση και το χρόνο ζωής φθορισμού, δηλαδή το χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης (Hemmilä, 1985; Chan, 1987).

Η επισημάνση αντισωμάτων με ανιχνευτές φθορισμού αναπτύχθηκε από τον Albert Coons το 1941 για την απόδειξη ύπαρξης πνευμονιοκοκκικών αντιγόνων σε δείγμα ιστού. Χρησιμοποιείται από τότε ως ποιοτική τεχνική χρώσης. Ωστόσο, οι ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον στον τομέα της κλινικής ανοσολογίας, και ως μια εναλλακτική μέθοδο των ραδιοανοσοδοκιμασιών, αλλά και κυρίως λόγω παραγωγής φθηνών, σταθερών και ασφαλών αντιδραστηρίων για γρήγορες και ευαίσθητες δοκιμασίες. Ένας από τους κύριους στόχους ήταν η ανάπτυξη ομοιογενών προσδιορισμών με βάση την πόλωση φθορισμού, και τη μεταφορά ενέργειας φθορισμού για στην παρακολούθηση του επιπέδου φαρμακευτικών ουσιών (Hemmilä, 1985). Επιπλέον, δύναται να πραγματοποιηθεί ποιοτική και ποσοτική ανάλυση υπολειμμάτων φαρμάκου σε ένα δείγμα με τη μέτρηση φθορισμού διαφορετικών εντάσεων (Wu et al., 2020).



Εικόνα 4.11. Απορρόφηση και εκπομπή ενέργειας φωτονίου προκαλώντας φθορισμό (με άμεση μετάβαση) ή φωσφορισμό (μέσω μιας ενδιάμεσης κατάστασης) (Smith et al., 1981).

Σε ανάλυση άμεσου ανοσοφθορισμού (direct immunofluorescence assay, DFA), η οποία χρησιμοποιείται για ιστοχημεία, ένα σημασμένο με φθορίζουσα ουσία αντίσωμα, ειδικό του προς ανίχνευση αντιγόνου, εφαρμόζεται σε παρασκεύασμα του προς εξέταση ιστού σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου, επωάζεται, πλένεται και παρατηρείται το δείγμα σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στην ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού (indirect immunofluorescence assay, IFA), το πρωτεύον αντίσωμα δεν επισημαίνεται, αλλά προστίθεται ένα δευτερεύον σημασμένο με φθορίζουσα ουσία το οποίο αντιδρά με το πρωτεύον μη επισημασμένο αντίσωμα. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για τον εντοπισμό αντισωμάτων που στρέφονται έναντι γνωστών πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε κύτταρα και ιστούς (4.12) (Koivunen and Krosgrud, 2006).



Εικόνα 4.12 (I) Ανάλυση άμεσου ανοσοφθορισμού: χρησιμοποιεί αντισώματα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην κυτταρική επιφάνεια. (II) Ανάλυση έμμεσου ανοσοφθορισμού: η ανίχνευση βασίζεται σε ένα δευτερεύον αντίσωμα σημασμένο με μια φθορίζουσα ουσία (Koivunen and Krosgrud, 2006).

Οι ανοσοφθορισμομετρικοί προσδιορισμοί διακρίνονται στους ομοιογενείς και τους ετερογενείς. Οι ετερογενείς μέθοδοι απαιτούν ένα στάδιο διαχωρισμού του ελεύθερου από το δεσμευμένο ιχνηθέτη πριν την μέτρηση του φθορισμού, καθώς η δραστηριότητα του φθοροφόρου δεν επηρεάζεται από τη δέσμευσή του με αντισώματα. Αντίθετα, το φθοροφόρο στην ομοιογενή ανάλυση επηρεάζεται από την προσκόλλησή του στο αντίσωμα αναστέλλοντας σημαντικά το σήμα εκπομπής φθορισμού. Όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του ελεύθερου επισημασμένου αντιγόνου τόσο χαμηλότερη θα είναι η εκπομπή φθορισμού και επομένως τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα. Κατά συνέπεια δεν απαιτεί βήμα διαχωρισμού, καθιστώντας το ιδιαίτερα χρήσιμο για συστήματα κλινικής χημείας και επιτρέποντας ταχύτερους χρόνους ανάλυσης (Smith et al., 1981; Routledge and Hutchings, 2013).

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται σε κλινικά εργαστήρια για την ανίχνευση βακτηριακών, ιικών και μυκητιακών λοιμώξεων, καθώς και για τη βιοαπεικόνιση δειγμάτων ιστού. Ένα συστηματικό αυτοάνοσο που αποτελεί διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ο λύκος (ή αλλιώς συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ΣΕΛ). Στον λύκο, το ανοσοποιητικό σύστημα υπερλειτουργεί και επιτίθεται σε δικά του κύτταρα και ιστούς. Ο λόγος που ονομάζεται συστηματικός είναι γιατί η χρόνια φλεγμονή που προκαλείται μπορεί να επηρεάσει πολλά συστήματα του σώματος. Η διάγνωσή του είναι δύσκολη και συχνά

λανθασμένη, με εξαίρεση την ύπαρξη χαρακτηριστικών συμπτωμάτων, όπως εξάνθημα σε σχήμα πεταλούδας πάνω από τα μάγουλα. Επιπλέον, δεν υπάρχει ενιαία οριστική εξέταση αίματος, ενώ για τη διάγνωση γίνεται συχνότερα ιστολογικός έλεγχος στον οποίο περιλαμβάνεται προσυμπτωματικός έλεγχος με συχνότερη την εξέταση αντιπυρηνικών αντισωμάτων (ANA). Ο προσδιορισμός ANA πραγματοποιείται με την καλλιέργεια ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων (Hep-2) πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία αντιδρούν τα ANA που βρίσκονται στον ορό του ασθενούς, αραιωμένο 1:40, και του αντιγόνου που υπάρχει στον κυτταρικό πυρήνα. Η αντίδραση πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα ανιχνεύεται μικροσκοπικά με τη βοήθεια ενός σημασμένου δευτερεύοντος αντισώματος. Ο πιο έντονος φθορισμός των πυρήνων με ευδιάκριτο μοτίβο, σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα, δηλώνει θετική αντίδραση. Υψηλοί τίτλοι, μεγαλύτεροι από 1:160, συνήθως υποδηλώνουν την παρουσία αυτοάνοσης νόσου. Εκτός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αντισωμάτων, μπορεί να γίνει ταυτοποίηση μοτίβων αντισωμάτων που υποδηλώνουν συγκεκριμένες ασθένειες (Koivunen and Krosgrud, 2006).

Ο συνδυασμός της υψηλής ευαισθησίας της μέτρησης φθορισμού και της ευαισθησίας του ανιχνευτή σε περιβαλλοντικές μεταβολές προσφέρει δυνατότητες για την ανάπτυξη ετερογενών αναλύσεων, καθώς και απλών και γρήγορων ομοιογενών ανοσοδοκιμασιών, όπου η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας μπορεί απ' ευθείας να ανιχνευτεί στο μίγμα αντίδρασης. Η δυνατότητα χρήσης φθορισμού σε ετερογενείς δοκιμασίες για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών, ιών, αλλά και μικρών απτενίων, έχει διευκολυνθεί πολύ με την ανάπτυξη τεχνικών διαχωρισμού στερεής φάσης (Hemmilä, 1985). Επιπλέον, η ανάπτυξη συστημάτων διαχωρισμού στερεάς φάσης, καθώς και νέες φθορίζουσες ουσίες για ανιχνευτές βοηθούν στην αντιμετώπιση παρεμβολών που μπορεί να προκύψουν στο σήμα φθορισμού από την ύπαρξη άλλων φθορίζόντων ουσιών ή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων ουσιών που προκαλούν διάχυση του φωτός, όπως επίσης και η ανάπτυξη νέων οργάνων που μειώνουν το σήμα υποβάθρου της ανάλυσης. Οι παρεμβολές στο σήμα φθορισμού από άλλες ουσίες αποτελεί το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου (Smith et al., 1981).

Συγκεντρωτικά, τα μειονεκτήματα και κατ' επέκταση τα προβλήματα που προκύπτουν στις μετρήσεις φθορισμού είναι:

1. Ενδογενή φθορίζοντα μόρια, όπως η χολερυθρίνη και οι πρωτεΐνες, μπορεί να προκαλέσουν αύξηση του σήματος μη ειδικού φθορισμού υποβάθρου μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της FIA.
2. Μείωση του σήματος φθορισμού από υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων σωματιδίων στον ορό.
3. Απόσβεση του σήματος φθορισμού εάν αλληλο καλυφθούν τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής δύο ανιχνευτών φθορισμού σε μια πρωτεΐνη λόγω στενής εγγύτητας (φαινόμενα που παρατηρούνται στην αιμοσφαιρίνη και την λευκωματίνη).
4. Απόσβεση λόγω μη ειδικής δέσμευσης της αλβουμίνης (Hemmilä, 1985; Chan, 1987).
5. Υποκειμενικότητα ερμηνείας των αποτελεσμάτων, με αποτέλεσμα να απαιτείται καλά εκπαιδευμένο, έμπειρο εργαστηριακό προσωπικό ώστε να μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ της αντιδραστικότητας του φόντου και του ειδικού φθορισμού.

Στα πλεονεκτήματα των τεχνικών ανοσοπροσδιορισμού με φθορισμό περιλαμβάνεται η υψηλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα, η ευκολία στην εκτέλεση και το χαμηλό κόστος, πόσο μάλλον σε σύγκριση με την ενόργανη ανάλυση και τη συμβατική ενζυμική ανοσοδοκιμασία. Επιπλέον, έχουν χαμηλά όρια ανίχνευσης, ασφαλή και εύχρηστα αντιδραστήρια και ευκολία προσδιορισμού πολλών βιομορίων από πρωτεΐνες έως πολύ μικρά απτένια. Τα πλεονεκτήματα αυτά αποτελούν τα δυνατά σημεία της μεθόδου τα οποία εξασφαλίζουν μια ευρεία προοπτική εφαρμογής της, αλλά και ο λόγος ανάπτυξης πολλών παραλλαγών ανοσοπροσδιορισμού με φθορισμό (Smith et al., 1981; Wu et al., 2020). Επιπλέον, οι αναλύσεις FIA ανιχνεύουν την προς εξέταση ουσία σε ένα συγκεκριμένο σημείο στον ιστό ή τη μονοστιβάδα των κυττάρων, το οποίο είναι ιδιαίτερης σημασίας και σημαντικής αξίας για μελέτες ιστοπαθολογίας. Ακόμα, οι FIA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του σταδίου μιας νόσου ή την ανταπόκριση σε θεραπεία. Από την άλλη, οι αναλύσεις μπορεί να είναι εξαντλητικές, ωστόσο, διατίθενται στο εμπόριο αυτοματοποιημένοι αναλυτές (Galanti et al., 1997).

4.3.1 Ανοσοπροσδιορισμός Μεταφοράς Διέγερσης Φθορισμού (Fluorescence Excitation Transfer Immunoassay – FETIA)

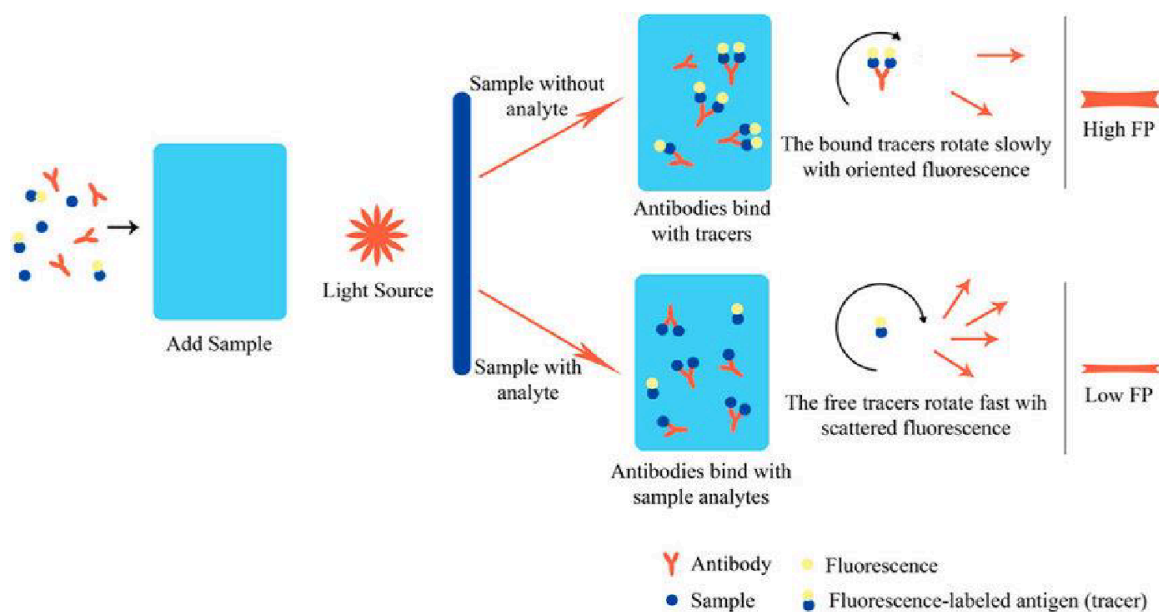
Η μέθοδος FETIA αναπτύχθηκε από τους Ullman et al. (1976) και αφορά τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ δότη και δέκτη και εξαρτάται από τη μεταξύ τους απόσταση. Η μεταφορά ενέργειας έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού του μορίου δότη. Ο φθορισμός του δέκτη κατά τη μεταφορά θα προκληθεί εφόσον έχει μέγιστη διέγερση κοντά σε εκείνη του μήκους κύματος εκπομπής του δότη. Ο ρυθμός μεταφοράς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την έκτη δύναμη της απόστασης μεταξύ των μορίων και εξαρτάται επίσης άμεσα από την κβαντική απόδοση φθορισμού του δότη και τον συντελεστή απόσβεσης του μορίου δέκτη στο μήκος κύματος εκπομπής του δότη (Price and Newman, 1991; Wild, 2013). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που προσδιορίζεται. Οι φθορίζουσες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις πρώτες εφαρμογές ήταν η FITCH για τον δότη (αντιγόνο) και η ισοθειοκυανική τετραμεθυλο-ροδαμίνη (TMRITC) για τον δέκτη φθορισμού (αντίσωμα) (Ullman et al., 1976; Hemmilä, 1985).

4.3.2 Ανοσοπροσδιορισμός Πόλωσης Φθορισμού (Fluorescence Polarization Immunoassay – FPIA)

Η φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση πολωμένης ακτινοβολίας ανήκει στις ομοιογενείς ανταγωνιστικές μεθόδους FIA κατά τις οποίες η εκπομπή φθορισμού αναστέλλεται σημαντικά από την δημιουργία του ανοσοσυμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου (Smith et al., 1981). Η αρχή της μεθόδου αφορά την εκπομπή επίπεδου πολωμένου φωτός κατά τη διέγερση ενός μορίου φθορίζουσας ένωσης (φλουορεσκεΐνης), η οποία εκπομπή εξαρτάται από τον ρυθμό περιστροφής του μορίου (Koivunen and Krosgrud, 2006; Kricka and Park, 2014). Τα χαμηλού μοριακού βάρους σημασμένα με φθορισμό απτένια, περιστρέφονται γρήγορα παράγοντας χαμηλό βαθμό πόλωσης φθορισμού (FP), ενώ η δέσμευση με αντίσωμα σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεγαλύτερου μεγέθους με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της περιστροφής και την αύξηση του βαθμού πόλωσης (4.13) (Koivunen and Krosgrud, 2006; Wu et al., 2020; Kricka and Park, 2014).

Σε μια ανοσοδοκιμασία αυτού του τύπου, το μη επισημασμένο αντιγόνο, το οποίο είναι η αναλυόμενη ουσία (φάρμακο), ανταγωνίζεται το σημασμένο με φθορισμό αντιγόνο για

συγκεκριμένη θέση δέσμευσης στο αντίσωμα, ρυθμίζοντας την πόλωση η οποία αλλάζει ανάλογα με τη συγκέντρωση του αντιγόνου (φαρμάκου) στο δείγμα (Routledge and Hutchings, 2013; Kricka and Park, 2014; Koivunen and Krosgrud, 2006). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου (φάρμακο) στο δείγμα, τόσο λιγότερο φάρμακο σημασμένο με φλουορεσκεΐνη δεσμεύεται σε αντίσωμα με αποτέλεσμα χαμηλότερη εκπομπή επίπεδου πολωμένου φωτός. Οι FPIA εφαρμόζονται ευρέως σε θεραπευτικά κέντρα ανίχνευσης φαρμάκων, νοσοκομεία και εγκαταστάσεις υγειονομικής περίθαλψης. Η ανάπτυξη συσκευών ανάγνωσης μικροπλακών εξοπλισμένων με πολωτικά οπτικά οδήγησε στην υιοθέτηση της πόλωσης φθορισμού ως λειτουργία ανάγνωσης για υψηλής απόδοσης προσυμπτωματικό έλεγχο (Koivunen and Krosgrud, 2006).



Εικόνα 4.13 Φθόρο-ανοσοχημική ανάλυση πολωμένης ακτινοβολίας (Fluorescent Polarisation Immunoassay, FPIA) (Wu et al., 2020).

Η FPIA έχει γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση μορίων διαφόρων κατηγοριών, όπως ορμόνες, τοξίνες (πχ μυκοτοξίνη) και μεταβολίτες (Σκορίλας, 2009; Raysyan et al., 2021). Διαθέτει σαφή υπεροχή σε ταχύτητα ανίχνευσης, υψηλή ευαισθησία (με περίπου 0,1 ng ελάχιστη

ανιχνεύσιμη ποσότητα αναλυόμενης ουσίας), υψηλή απόδοση ανάλυσης, ευκολία στη λειτουργία με δυνατότητα αυτοματοποίησης και θεωρείται κατάλληλη τεχνική για τον γρήγορο έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Smith and Eremin, 2008; Σκορίλας, 2009; Wu et al., 2020; Raysyan et al., 2021). Ωστόσο, η πιθανή επίδραση στη μέτρηση φθορισμού και στην απόδοση της ανάλυσης από διάφορα συστατικά του δείγματος θα πρέπει να αξιολογείται (Σκορίλας, 2009; Raysyan et al., 2021).

4.3.3 Ανοσοπροσδιορισμός Φθορισμού Συνδεδεμένου Ενζύμου (Enzyme-Linked Fluorescence Immunoassay, ELFIA)

Οι Yolken και Stopa, το 1976, πρότειναν παραλλαγή της μεθόδου ELISA (προσδιορισμός ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου ενζύμου) με χρήση φθορίζοντος υποστρώματος αντί για ένα χρωμογόνο και μέτρηση του φθορισμού. Η μέθοδος εξετάστηκε για την ανίχνευση του ανθρώπινου ροταϊού σε ένα πρότυπο εναιώρημα κοπράνων και αξιολογήθηκε ότι είναι περίπου 100 φορές πιο ευαίσθητη και από την αντίστοιχη ELISA και τον ραδιοανοσοπροσδιορισμό.

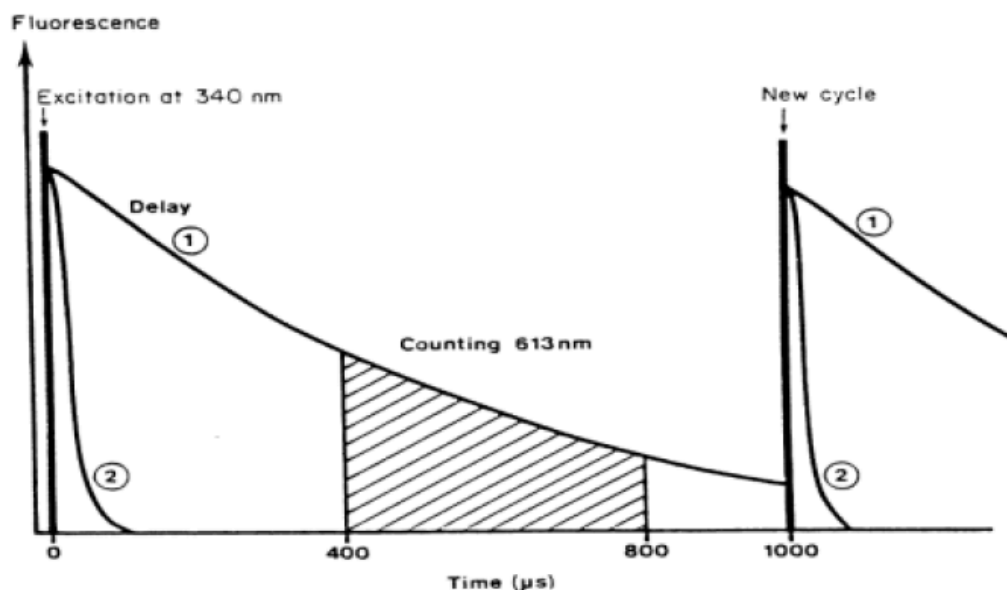
Η μέθοδος ELFIA έχει ευρέως εφαρμοστεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων IgG και IgM τοξοπλάσματος ενάντια της μόλυνσης του παρασίτου *Toxoplasma gondii* (Alvarado-Esquivel et al., 2017; El-Shqanqery et al., 2017; Mendoza-Larios et al., 2021). Η μέθοδος ELFIA είναι πλήρως αυτοματοποιημένη παραλλαγή της τυπικής μεθόδου ELISA, οικονομική και παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία, αναπαραγωγιμότητα, καθώς και ταχύτητα και ακρίβεια στη μέτρηση των επιπέδων αντισωμάτων IgG και IgM (Rostami et al., 2018). Έχει επίσης εφαρμοστεί στη μέτρηση ορμονών, όπως της θυροξίνης (T4), τριωδοθυρονίνης (T3), καθώς και της ορμόνης διέγερσης του θυρεοειδούς (TSH) (Koch et al., 2016; Manger et al., 2023).

4.3.4 Ανοσοπροσδιορισμοί Χρονικά Διαχωριζόμενου Φθορισμού (Time Resolved Fluorescence Immunoassays, TR-FIA)

Οι ανοσοπροσδιορισμοί χρονικά διαχωριζόμενου φθορισμού (TR-FIA) χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες σύμπλοκα ιόντων σπάνιων γαιών (λανθανίδες), συνήθως ευρώπιο (Eu^{3+}), τέρβιο

(Tb^{3+}) και σαμάριο (Sm^{3+}) , τα οποία έχουν υψηλή ένταση φθορισμού, ικανότητα υπέρβασης της απορρόφησης υποβάθρου και μεγάλο χρόνο χαλάρωσης (Qin et al., 2022). Οι εκπομπές φθορισμού των ενώσεων αυτών έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής φθορισμού (10-1000 μs σε σύγκριση με τα 1-20 ns των περισσότερων βιολογικών υλικών που έχουν φθορισμό βραχείας διάρκειας), επεκτείνοντας έτσι τον χρόνο μέτρησης του σήματος φθορισμού (Sellrie et al., 2010; Kricka and Park, 2014; Wu et al., 2020). Η φλουορεσκεΐνη δεν είναι κατάλληλη ως δείκτης για τον προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά υγρά, καθώς ο φθορισμός της χάνεται από υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης και επίσης αλλοιώνεται από σήματα υποβάθρου αυτοφθορισμού (Sellrie et al., 2010). Τα σύμπλοκα ιόντων του ευρωπαϊού έχουν σχετικά μεγάλη κβαντική απόδοση, μεγάλη μετατόπιση Stokes, με διέγερση στα 340 nm και εκπομπή στα 613 nm, καθώς και αμελητέες συγκεντρώσεις σε βιολογικά δείγματα και είναι βιοχημικώς αδρανείς. Οι μετρήσεις γίνονται με φθορισμόμετρο χρονικής ανάλυσης, όπου το φθορίζον μόριο διεγείρεται με έναν γρήγορο παλμό φωτός, με αποτέλεσμα να μετρηθεί η φθορίζουσα ουσία με τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, ενώ οι παρεμβαλλόμενες ουσίες με φθορισμό βραχείας διάρκειας θα απορριφθούν. Σε μια ανάλυση TR-FIA, μια ετικέτα χηλικής ένωσης ευρωπαϊού διεγείρεται από έναν παλμό φωτός διέγερσης, 0,5 μs , και η μακρόχρονη εκπομπή φθορισμού από τον ιχνηθέτη μετράται μετά από καθυστέρηση, 400–800 μs , κατά τον οποίο χρόνο οποιοδήποτε σύντομο σήμα υποβάθρου έχει εξασθενήσει και χαθεί (Kricka and Park, 2014) (4.14).

Με τη μέθοδο TR-FIA εξαλείφεται σημαντικά η παρεμβολή του φθορισμού υποβάθρου στο δείγμα από παρεμβαλλόμενες ουσίες, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη ευαισθησία από την FIA (Kricka and Park, 2014; Wu et al., 2020).



Εικόνα 4.14. Αρχή μέτρησης Χρονικά διαχωριζόμενου Φθορισμού (Diamandis, E.P., 1988).

4.4 Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassay, CLIA)

Η χημειοφωταύγεια είναι το φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο παράγεται φωτεινή ακτινοβολία από μία εξώθερμη χημική αντίδραση (A+B). Μια χημική αντίδραση που παράγει φως προκαλείται με την προσθήκη είτε υδροξειδίου του νατρίου είτε υπεροξειδίου του υδρογόνου (Koivunen and Krosgsrud, 2006; Καρκαλούσος κα., 2015). Συγκεκριμένα, κατά την οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση παράγεται ένα ενδιάμεσο προϊόν στο οποίο έχει μεταφερθεί υψηλή ενέργεια ώστε αυτό να διεγερθεί (C*). Το ενδιάμεσο αυτό υψηλής ενέργειας προϊόν αμέσως διασπάται και αποδιεγείρεται επιστρέφοντας σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση (C) και απελευθερώνοντας φωτεινή ακτινοβολία (hv), όπως παρουσιάζεται απλοποιημένα στην παρακάτω εξίσωση (Καρκαλούσος κα., 2015):



Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ετερογενής και κάθε μέθοδος μπορεί να είναι ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική. Επιπλέον, οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας μπορεί να είναι άμεσες, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες φωτοφόρα μόρια, ή έμμεσες, όπου χρησιμοποιούνται ενζυμικοί δείκτες σε ενώσεις χημειοφωταύγειας ως υπόστρωμα και αναφέρονται ως ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί χημειοφωταύγειας (Cinquanta et al., 2017).

Τα πιο δημοφιλή υποστρώματα στις άμεσες μεθόδους είναι η λουμινόλη, η ισολουμινόλη και τα παράγωγά τους και οι εστέρες του ακριδινίου, ενώ στις έμμεσες μεθόδους οι ενζυματικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι η αλκαλική φωσφατάση, με παράγωγα διοξετανίου ως υπόστρωμα, και η υπεροξειδάση χρένου, με λουμινόλη ή τα παράγωγά της ως υπόστρωμα (Chen et al., 2012; Cinquanta et al., 2017). Οι αναλύσεις που χρησιμοποιούν ισολουμινόλη είναι ακόμη πιο ευαίσθητες από τις αναλύσεις που χρησιμοποιούν ακριδίνιο και η αντίδραση αναπτύσσεται με την προσθήκη ενός μείγματος υπεροξειδίου του υδρογόνου και ενός καταλύτη στο δείγμα με ετικέτα ισολουμινόλης (Koivunen and Krossrud, 2006).

Ο ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταύγειας (CL) είναι πολύ δημοφιλής, χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές διαφορετικές μορφές ανάλυσης, έχει υψηλή ευαισθησία, χαμηλά όρια ανίχνευσης, υψηλή εξειδίκευση και δυνατότητα αυτοματοποίησης (Koivunen and Krossrud, 2006; Chen et al., 2012; Καρκαλούσος κα., 2015). Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ορμονών, φαρμάκων, βιταμινών, καρκινικών δεικτών, δεικτών βλάβης του μυοκαρδίου και λοιμωδών νοσημάτων και αυτοαντισωμάτων (Cinquanta et al., 2017).

Τα βασικά πλεονεκτήματα των αναλυτικών μεθόδων χημειοφωταύγειας σύμφωνα με τους Cinquanta et al. (2017) είναι η ευρεία δυναμικότητά της, η ταχεία λήψη του αναλυτικού σήματος, καθώς και η υψηλή ένταση του, η απουσία παρεμβολικών εκπομπών που δηλώνει υψηλή ειδικότητα, η υψηλή σταθερότητα των αντιδραστηρίων και των συζυγών τους, η μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων, η τυχαία πρόσβαση, ο μειωμένος χρόνος επώασης και η πλήρη συμβατότητα με πρωτόκολλα ανοσολογικής ανάλυσης (ομογενή ή μη). Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αφορούν περιορισμένη ανίχνευση αντιγόνων, υψηλό κόστος λόγος αυτοματοποίησης, περιορισμένο πλαίσιο δοκιμών, κλειστά αναλυτικά συστήματα.

Ο ανοσοενζυμικός προσδιορισμός χημειοφωταύγειας συνδυάζει την υψηλή ευαισθησία της χημειοφωταύγειας με την υψηλή ειδικότητα της ανοσοδοκιμασίας. Η μέθοδος είναι το ίδιο γρήγορη και απλή στη λειτουργία σε σύγκριση με την ELISA, ωστόσο έχει υψηλότερη ευαισθησία και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανίχνευση υπολειμμάτων φαρμάκων. Επίσης, έχει ουσιαστικά την ίδια διαδικασία με την ELISA, με τη διαφορά της χρήσης ενός παράγοντα φωταύγειας ως υποστρώματος για την ενζυμική αντίδραση (Wu et al., 2020).

4.5 Ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί (Enzyme ImmunoAssays, EIA)

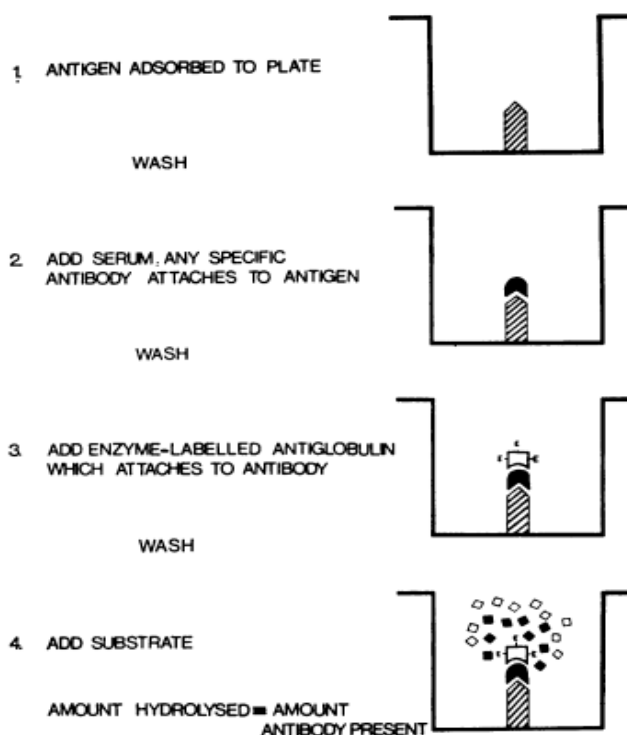
Οι Nakane and Pierce (1966) χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά συζευγμένο ένζυμο με αντίσωμα ή αντιγόνο ως ιχνηθέτη για εφαρμογή σε ανοσοϊστολογικές αναλύσεις (Koivunen and Krosgrud, 2006).

Στους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς (EIA) μετά την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος, το δημιουργηθέν σύμπλοκο συνδέεται με το συζευγμένο με δευτερεύον αντίσωμα ένζυμο το οποίο αντιδρά με το κατάλληλο υποστρώμα που προστίθεται (4.15). Στη συνέχεια παράγεται ένα έγχρωμο τελικό προϊόν, το οποίο μπορεί να αναλυθεί με ένα συνηθισμένο μικροσκόπιο φωτός ή με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και να προσδιοριστεί ποσοτικά (Koivunen and Krosgrud, 2006). Τα υποστρώματα των ενζύμων μπορεί να είναι χρωμογόνα ή φθορισμογόνα. Τα χρωμογόνα υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε αυτοματοποιημένες και σε χειροκίνητες μεθόδους, ενώ αντίθετα τα φθορισμογόνα υποστρώματα χρησιμοποιούνται αποκλειστικά πλέον σε αυτόματους αναλυτές (Καρκαλούς et al., 2015). Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι η αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση και η υπεροξειδάση χρένου (4.4) (Καρκαλούς et al., 2015; Sakamoto et al., 2018). Η υπεροξειδάση απαιτεί μικρότερη επώαση από τα άλλα δύο ένζυμα, τα οποία, όμως, παρόλο το μεγάλο χρόνο επώασης, εξασφαλίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα (Καρκαλούς et al., 2015).

Τα κριτήρια επιλογής ενζύμων συζευγμένων με αντίσωμα ή αντιγόνο όπως τα αναφέρουν οι O'Sullivan et al. (1979) είναι τα εξής:

1. Διαθεσιμότητα καθαρισμένων ομοιογενών ενζυμικών παρασκευασμάτων χαμηλού κόστους
2. Υψηλή ειδική δραστηριότητα
3. Παρουσία υπολειμμάτων μέσω των οποίων το ένζυμο μπορεί να διασταυρωθεί με άλλα μόρια με ελάχιστη απώλεια τόσο ενζυμικής όσο και αντιγονικής δραστηριότητας
4. Σταθερά ενζυμικά συζεύγματα
5. Απουσία βιολογικών υγρών
6. Μέθοδος ανάλυσης απλή, φτηνή, ευαίσθητη, ακριβής και δεν επηρεάζεται από παράγοντες που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά

7. Ένζυμο, υπόστρωμα, συμπαράγοντες, κ.λπ., δεν πρέπει να αποτελούν δυνητικό κίνδυνο για την υγεία.



Εικόνα 4.15. Αρχή των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών (Voller et al., 1976).

Πίνακας 4.4. Ένζυμα που χρησιμοποιούνται στους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς και τα χαρακτηριστικά τους (Καρκαλούσος et al., 2015)

Ένζυμο	Είδος Ενζύμου	Χρωμογόνα Υποστρώματα	Συντόμευση	Μήκος Κύματος (nm)
Υπεροξειδάση (HRP)	Οξειδάση	2,2 -άζινο δις-3-αυθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)	ABTS	415
		3,3,5,5-τετραμέθυλοβενζιδίνη	TMB	450
		Όρθο-φαινολενοδιαμίνη	OPD	492
		φθορίζοντα υποστρώματα		
		π-υδροξυφαινοξυλοξικό οξύ	HPAA	
		3-(π-υδροξυφαινοξυλο)προπιονικό οξύ	HPPA	
Αλκαλική φωσφατάση (ALP)	Υδρολάση	Χρωμογόνα Υποστρώματα		
		π-φωσφορική νιτροφαινόλη	pNPP	405
		φθορίζοντα υποστρώματα		
		4-μεθυλο φωσφορική ουμπελιφερόνη	MUP	
β-γαλακτοζιδάση (β-GAL)	Υδρολάση	Χρωμογόνα Υποστρώματα		
		ο-νιτροφαινυλ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	oNPG	420
		Ερυθρό χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης	CPRG	571
		φθορίζοντα υποστρώματα		
		4-μεθυλουμπελιφερολ-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη	MUG	

Οι ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί προσφέρουν εύκολη και κυρίως ασφαλή ανίχνευση αντιγόνων ή αντισωμάτων σε σύγκριση με την RIA, την οποία έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό σε πολλά κλινικά εργαστήρια λόγω της επικινδυνότητας σχετικά με την απόρριψη των ραδιενεργών αποβλήτων, ενώ τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων είναι συγκρίσιμα. Επίσης, η μέθοδος EIA προτιμάται όλο και περισσότερο από τις αναλύσεις FIA, λόγω της αντικειμενικότητας των αποτελεσμάτων, της εύκολης προσαρμογής στον αυτοματισμό και της υψηλότερης απόδοσης με λιγότερο πρακτικό χρόνο (Koivunen and Krosgsrud, 2006). Οι ανοσοενζυμικές τεχνικές διακρίνονται σε ομοιογενείς, με βασική την Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) και σε ετερογενείς, με βασική την Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ανάλογα με την ενζυμική ενεργότητα κατά την ανοσολογική αντίδραση (Castelli et al., 2022).

Οι ανοσοενζυμικοί μέθοδοι είναι πλέον πιο διαδεδομένες λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν από τη χρήση των ενζύμων:

1. Περισσότερη ευαισθησία στις αναλύσεις από την επίδραση ενίσχυσης του ενζύμου.
2. Τα αντιδραστήρια είναι σχετικά φθηνά με μεγάλη διάρκεια ζωής.
3. Ποικιλία ενζύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες, κατά συνέπεια:
 - i. είναι δυνατές πολλαπλές ταυτόχρονες αναλύσεις.
 - ii. οι ιχνηθέτες μπορούν να παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών σύζευξης.
 - i. μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία συστημάτων για την ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας.
2. Ο εξοπλισμός μπορεί να είναι φθηνός και εύκολα διαθέσιμος.
3. Δεν υπάρχουν κίνδυνοι ακτινοβολίας κατά την επισήμανση ή την απόρριψη των απορριμμάτων.
4. Οι ομοιογενείς αναλύσεις είναι γρήγορες και εύκολα αυτοματοποιημένες (καθώς δεν απαιτείται το στάδιο του διαχωρισμού των ελεύθερων από τα επισημασμένα αντιγόνα, επειδή η μέθοδος εξαρτάται από την αναστολή ή την ενεργοποίηση της σήμανσης του ενζύμου) (O'Sullivan et al., 1979).

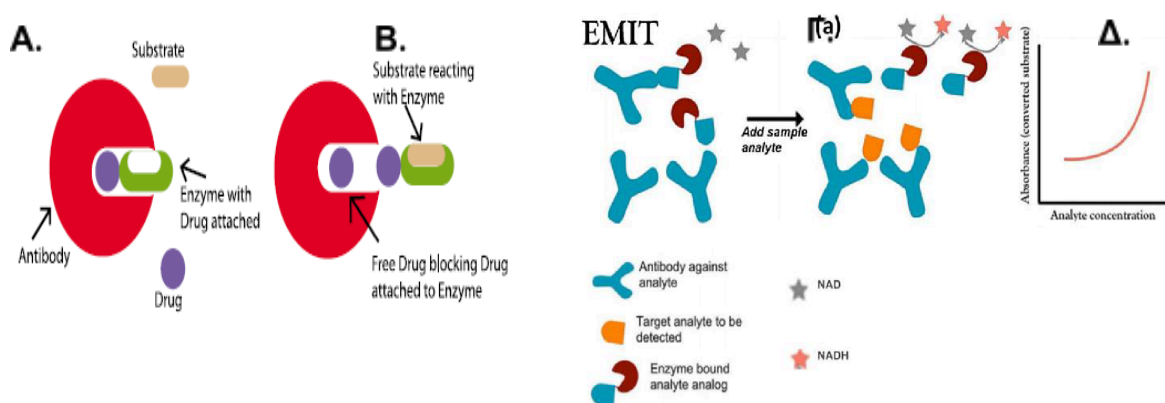
Ωστόσο, η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας μπορεί να είναι πιο περίπλοκη από τη μέτρηση της δραστηριότητας ορισμένων τύπων ραδιοϊσοτόπων (O'Sullivan et al., 1979).

4.5.1 Ενισχυμένη Ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)

Η Ενισχυμένη Ανοσοενζυμική Μέθοδος είναι μια ανταγωνιστική τεχνική ομοιογενούς φάσης που χρησιμοποιείται στις κλινικές αναλύσεις. Έχουν ευρεία εφαρμογή στην παρακολούθηση θεραπευτικών και παράνομων φαρμάκων, ορμονών (T3, T4) και κυρίως για την ταχεία ανίχνευση ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (Koivunen and Krosgrud, 2006; Καρκαλούσος, 2015; Castelli et al., 2022). Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πλήρης ανάλυση σε αίμα, ορό ή ούρα, είναι ταχύτατη (3 λεπτά) και έχει τη δυνατότητα πλήρης αυτοματοποίησης και χρήσης ενός απλού φασματοφωτόμετρου. Έχει ευρεία χρήση σε εργαστήρια που ειδικεύονται στην παρακολούθηση θεραπευτικών φαρμάκων, όπως η κυκλοσπορίνη σε λήπτες μεταμόσχευσης (Koivunen and Krosgrud, 2006). Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η μικρότερη ευαισθησία, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη ανάλυση πολλών φαρμάκων, καθώς επίσης η ανάλυση μπορεί να παρεμποδιστεί από ορισμένα συστατικά του ορού (Voller et al., 1978; O'Sullivan et al., 1979).

Σε αυτή τη μέθοδο προσδιορισμού, η προσδιοριζόμενη ουσία (φάρμακο), σταθερής ποσότητας, συνδέεται με ένα ένζυμο (αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, G6-PD) σχηματίζοντας τον ιχνηθέτη ένζυμο-ουσία και δημιουργεί σύμπλοκο με το αντίσωμα κατά του φαρμάκου που προστίθεται στο σύστημα. Ο σχηματισμός ανοσοσυμπλόκου αναστέλλει την ενεργότητα του ενζύμου, το οποίο είναι ανενεργό, καθώς παρεμποδίζεται η σύνδεση του υποστρώματος με το ενεργό του κέντρο. Έτσι δεν παράγεται φως ή άλλο σήμα. Με την προσθήκη δείγματος που περιέχει την προς εξέταση ουσία (φάρμακο), αυτή ανταγωνίζεται τον ιχνηθέτη και δεσμεύεται στο αντίσωμα. Ο ελεύθερος ιχνηθέτης συνδέεται με το νικοτιναμίδιο-αδενινωδινουκλεοτίδιο (NAD) που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα παράγοντας NADH το οποίο ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm (4.16). Μετρήσεις απορρόφησης του σήματος λαμβάνονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Όσο πιο ελεύθερο φάρμακο στο δείγμα, τόσο πιο γρήγορη είναι η αντίδραση του ενζύμου,

επειδή μόνο τα μη δεσμευμένα σύμπλοκα ενζύμου-φαρμάκου είναι ικανά να δεσμεύσουν το υπόστρωμα. Όση είναι η συγκέντρωση/ενεργότητα του ιχνηθέτη (η ποσότητα του παραγόμενου NADH) τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ένωσης στο δείγμα (Koivunen and Krosgrud, 2006; Καρκαλούσος, 2015; Castelli et al., 2022).



Εικόνα 4.16. Αρχή της EMIT. Α) ο ιχνηθέτης (αναλυόμενη ένωση/φάρμακο δεσμευμένο στο ένζυμο) δεσμεύεται από το αντίσωμα, οπότε το ένζυμο είναι ανενεργό. Β) η αναλυόμενη ένωση ανταγωνίζεται τον ιχνηθέτη και δεσμεύεται αυτή στο αντίσωμα. Ο ελεύθερος ιχνηθέτης ενώνεται με το υπόστρωμα, γίνεται ενεργός και παράγεται μετρούμενο σήμα (Koivunen and Krosgrud, 2006), Γ) συμπαράγοντας NAD και παραγόμενο NADH, Δ) πρότυπη καμπύλη (Castelli et al., 2022).

4.5.2 Προσδιορισμοί ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου ενζύμου (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

Η μέθοδος προσδιορισμού ανοσοπροσρόφησης δεσμευμένου ενζύμου (ELISA) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη από τις μεθόδους ενζυμικών ανοσοπροσδιορισμών. Χρησιμοποιείται στην επιστημονική και κλινική έρευνα και τη διάγνωση διαφόρων λοιμώξεων, όγκων και καρκινικών βλαβών, πρωτεϊνών, ορμονών και άλλων μικρών ουσιών σε βιολογικά υγρά. Η μέθοδος είναι εύκολη στην εφαρμογή, μεγάλης ευαισθησίας και περισσότερο ακριβής, καθώς τα αποτελέσματα των αναλύσεων μπορούν να αποδοθούν και ποσοτικά (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

1. Απλή, εύκολη και γρήγορη διαδικασία.
2. Υψηλή ειδικότητα, ακρίβεια και ευαισθησία, λόγω αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.
3. Υψηλή απόδοση, καθώς μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονες αναλύσεις χωρίς περίπλοκη προεπεξεργασία δείγματος.
4. Διάγνωση περίπλοκων περιπτώσεων, καθώς δεν απαιτείται καθαρισμός του αντιγόνου για την ανίχνευσή του.
5. Ασφαλές και φιλική προς το περιβάλλον, επειδή δεν απαιτούνται ραδιενεργές ουσίες και μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών.
6. Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια χαμηλού κόστους (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αφορούν:

1. Εντατική και δαπανηρή εργασία για την παρασκευή αντισωμάτων, λόγω των ακριβών κυτταρικών μέσων καλλιέργειας που απαιτούνται για τη λήψη συγκεκριμένου αντισώματος.
2. Υψηλή πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω ανεπαρκούς μπλοκαρίσματος του ακινητοποιημένου αντιγόνου.
3. Αστάθεια αντισωμάτων, επειδή ένα αντίσωμα είναι μια πρωτεΐνη που απαιτεί μεταφορά και αποθήκευση στο ψυγείο (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).
4. Τα συστατικά του πλάσματος μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου στο δείγμα (Midhun et al., 2021).

Η δοκιμή ELISA συνήθως πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης από πολυστυρένιο, οι οποίες περιέχουν 96 μικροπηγαδάκια (Καρκαλούσος, 2015; Midhun et al., 2021). Τα βασικά στάδια της ELISA, όπως παρουσιάζονται στην 4.17, είναι:

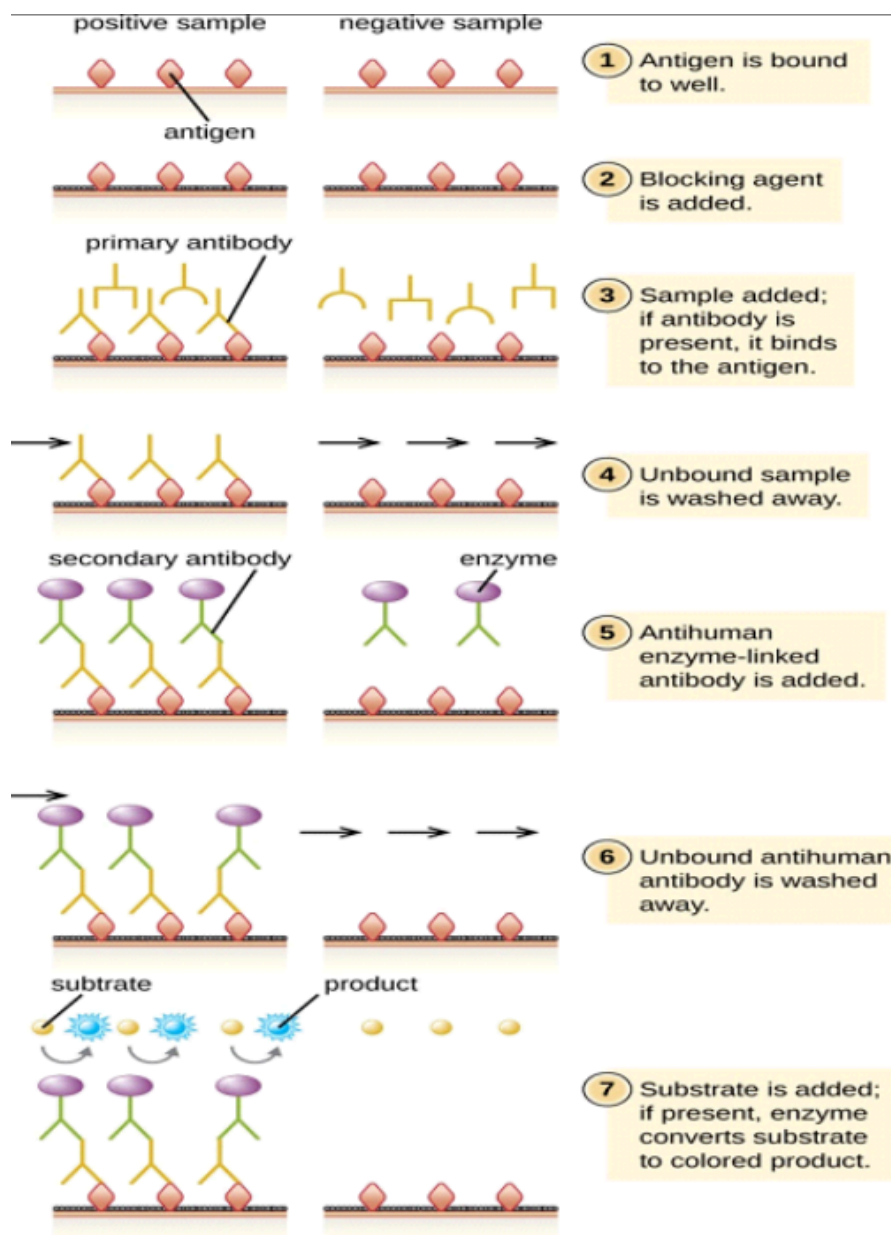
- 1) **Ακινητοποίηση σε στερεά επιφάνεια**, όπως μια πλάκα μικροτιτλοδότησης που αποτελείται από άκαμπτο πολυστυρένιο, πολυβινυλοχλωρίδιο και πολυπροπυλένιο, ή μαγνητικά σφαιρίδια ή σφαιρίδια πολυακρυλαμίδης, κυτταρίνης, αγαρόζης ή γυάλινα

σωληνάρια. Η ακινητοποίηση γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις ή στην περίπτωση των σφαιριδίων και της πλαστικής πλάκας με χημικό δεσμό (χρήση σε αυτόματες μεθόδους) και υδρόφοβες δυνάμεις, αντίστοιχα. (Καρκαλούσος, 2015).

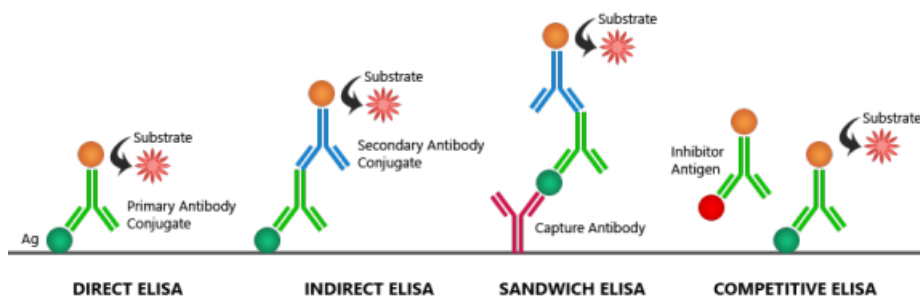
- 2) **Προσθήκη παράγοντα αποκλεισμού στην επιφάνεια:** πρωτεΐνες, όπως αλβουμίνη, ζελατίνη, καζεΐνη και αποβουτυρωμένο γάλα (Sakamoto et al., 2018).
- 3) **Προσθήκη ειδικού αντισώματος**, το οποίο αντιδρά με το αντιγόνο.
- 4) **Πλύση.**
- 5) **Προσθήκη δευτερεύοντος αντισώματος σημασμένου με ένζυμο**, για την ανίχνευση του πρωτεύοντος αντισώματος (για τις έμμεσες μεθόδους).
- 6) **Πλύση.**
- 7) **Προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος.**
- 8) **Ανίχνευση προϊόντος** (έγχρωμου ή φθορίζοντος) χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης. Η ανάπτυξη χρώματος δηλώνει την παρουσία του αντισώματος στο δείγμα (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Μεταξύ των σταδίων της μεθόδου πραγματοποιούνται πλύσεις ώστε να απομακρύνονται όσα συστατικά δεν δεσμεύονται στο ανοσοσύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος (Midhun et al., 2021).

Οι αναλύσεις ELISA διαφοροποιούνται σε άμεση (direct), έμμεση (indirect), διπλή (sandwich) και ανταγωνιστική (competitive) για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό είτε του αντιγόνου είτε του αντισώματος (4.18) (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).



Εικόνα 4.17 Βασικά στάδια τεχνικής ELISA (Midhun et al., 2021).



Εικόνα 4.18 Διαγραμματική προβολή όλων των τύπων ELISA (Midhun et al., 2021).

Οι 4 τύποι της μεθόδου ELISA παρουσιάζονται στην 4.18 και αναλύονται παρακάτω:

Άμεση ELISA

Η άμεση μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Engvall and Perlmann (1971) και ήταν η βάση για την ανάπτυξη των υπόλοιπων τύπων ELISA (Sakamoto et al., 2018). Σε αυτή τη μέθοδο, το ακινητοποιημένο εξεταζόμενο αντιγόνο ή αντίσωμα συνδέεται απευθείας με το αντίστοιχο σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα ή αντιγόνο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση της συγγένειας και της ειδικότητας των αντισωμάτων και στις ανασταλτικές αλληλεπιδράσεις (Midhun et al., 2021).

Η άμεση μέθοδος είναι απλή και σύντομη, καθώς απαιτείται μόνο ένα αντίσωμα και ολοκληρώνεται σε μια φάση. Επιπλέον, οι πιθανότητες για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross-reactivity) είναι μικρότερες από τη μέθοδο με χρήση δύο αντισωμάτων. Ωστόσο, η μέθοδος είναι λιγότερο ειδική, απαιτείται χρόνος για τη σήμανση των αντισωμάτων για κάθε συγκεκριμένο αντιγόνο και είναι δύσκολη η εφαρμογή της σε πολλαπλά πειράματα (Midhun et al., 2021).

Έμμεση ELISA

Σε αυτή τη μέθοδο, το προς ανάλυση αντιγόνο επικαλύπτεται σε μια πλάκα πολλαπλών μικροπηγαδιών και ανιχνεύεται έμμεσα από το δευτερεύον αντίσωμα, το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο. Στην ουσία η ανάλυση απαιτεί δύο στάδια, στο πρώτο, ένα μη επισημασμένο πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για το αντιγόνο, εφαρμόζεται στην πλάκα και στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η δέσμευση και αντίδρασή του με ένα επισημασμένο με ένζυμο δευτερεύον αντίσωμα που προστίθεται (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Με τη χρήση αντιορών ως πρωτεύοντος αντισώματος, μπορεί να αξιολογηθεί η παρουσία αντισώματος που σχετίζεται με την ασθένεια στους αντιορούς. Έτσι, η έμμεση ELISA χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για τη διάγνωση ενδοκρινικών νοσημάτων (Sakamoto et al., 2018).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αφορούν τη μεγάλη ποικιλία των διαθέσιμων επισημασμένων δευτερογενών αντισωμάτων, τη μεγάλη ευελιξία χρήσης τους και αυξημένη ευαισθησία, καθώς κάθε πρωτογενές αντίσωμα περιέχει πολλούς επιτόπους που μπορούν να δεσμευτούν από το επισημασμένο δευτερεύον αντίσωμα, επιτρέποντας την ενίσχυση του σήματος. Ωστόσο, λόγω του δευτερεύοντος αντισώματος απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο επώασης στη διαδικασία, αλλά κυρίως υπάρχει η πιθανότητα διασταυρούμενη αντιδραστικότητας (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Διπλή (Sandwich) ELISA

Σε αυτή τη μέθοδο, το εξεταζόμενο αντιγόνο ανιχνεύεται αφού εγκλωβιστεί μεταξύ δύο αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους. Το πρώτο αντίσωμα (αντίσωμα αιχμαλώτισης) ακινητοποιείται στα πηγαδάκια τιτλοδότησης, όπου προστίθεται το προς ανάλυση δείγμα, ακολουθούμενο από την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος (αντίσωμα αντίχνευσης). Τέλος προστίθεται το υπόστρωμα και μετράται το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης ακολουθεί, όπου υπολογίζεται η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ευελιξία, υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, και μικρό χρόνο καθαρισμού του δείγματος. Ωστόσο, ως μέθοδος είναι πολύπλοκη, δαπανηρή και απαιτείται εντατική εργασία για την παρασκευή δύο διαφορετικών αντισωμάτων (Sakamoto et al., 2018; Midhun et al., 2021).

Ανταγωνιστική ELISA

Στη μέθοδο αυτή το αντιγόνο ή αντίσωμα προσκολλάται στην στερεή φάση και προστίθεται το δείγμα με το εξεταζόμενο αντίσωμα ή αντιγόνο, αντίστοιχα, το οποίο ανταγωνίζεται το σημασμένο με ένζυμο αντιγόνο ή αντίσωμα. Με την προσθήκη του υποστρώματος μετράται φασματοφωτομετρικά το σήμα του προϊόντος, το οποίο είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή είναι ιδανική για ανάλυση μικρομορίων και ορμονών. Είναι γρήγορη, καθώς απαιτείται ελάχιστος καθαρισμός του δείγματος και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση μεγάλου εύρους αντιγόνων. Ωστόσο, έχει χαμηλή ειδικότητα, οπότε δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αραιωμένα δείγματα (Midhun et al., 2021).

5. Συμπεράσματα

Το ανοσοποιητικό μας σύστημα αποτελεί ένα πολύπλοκο και πολυσύνθετο δίκτυο ιστών, κυττάρων και οργάνων, το οποίο εκτελεί μυριάδες ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες. Ρόλος του είναι η προστασία του οργανισμού και η άμυνά του στις επιθέσεις των ξένων εισβολέων, όπως βακτήρια, ιοί και παράσιτα, ή την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, με τη συνεργασία της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσοπροστασίας και, κυρίως, μέσω της δράσης των Β και Τ λεμφοκυττάρων του προσαρμοστικού συστήματος. Ωστόσο, οι συντονισμένες αλληλεπιδράσεις του συστήματος μπορεί να δυσλειτουργούν, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να υπερλειτουργεί ή να υπολειτουργεί, προκαλώντας διαταραχές, όπως αυτοανοσία, υπερευαισθησία, αλλεργίες, οι οποίες διαταραχές οδηγούν σε καρκίνο, αυτοάνοσα νοσήματα και άλλες μη μεταδοτικές ασθένειες. Σημαντικοί παράγοντες, τόσο στην πρόκληση όσο και στην πρόληψη των διαταραχών αυτών, είναι οι εξής:

Κληρονομικότητα

Φύλλο/ορμόνες

Διατροφή

Τρόπος ζωής/άθληση

Στρες

Περιβάλλον (ρύπανση, κάπνισμα)

Από τους παραπάνω παράγοντες, η διατροφή, συγκεκριμένα η κατανάλωση λειτουργικών τροφίμων, και ο τρόπος ζωής (άθληση ή καθιστική ζωή) αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες για την πρόληψη, τη διατήρηση και βελτίωση της υγείας, ενώ η έλλειψη βασικών θρεπτικών συστατικών επηρεάζει αρνητικά το ανοσοποιητικό σύστημα και επιδεινώνει την οποιαδήποτε υπάρχουσα ασθένεια.

Η διάγνωση μιας ασθένειας είναι βασική αρχή για την αποτελεσματικότητα και τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκάστοτε θεραπείας. Η επιλογή της καταλληλότητας της μεθόδου αφορά την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, την επαναληψιμότητα, την ευαισθησία, το εύρος ανίχνευσης, αλλά εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι και η ασφάλεια χειρισμού της μεθόδου και το κόστος εκτέλεσης.

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση του αντισώματος έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου που εμπλέκεται με τη νόσο. Συγκεκριμένα, η υψηλή εξειδίκευση οφείλεται στην χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κυρίαρχες τεχνικές είναι αυτές που χρησιμοποιούν ως ιχνηθέτες ραδιοϊσότοπα, ένζυμα ή εκπέμπουν φθορισμό και οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας.

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί εμφανίστηκαν πριν από αρκετά χρόνια, με κύρια μέθοδο την RIA για τον προσδιορισμό της ινσουλίνης. Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί βρίσκουν εφαρμογή κυρίως σε κλινικές μελέτες και σε εξετάσεις ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια νοσοκομείων. Η χρήση τους, ωστόσο, έχει επεκταθεί και σε βιοχημικά και μικροβιολογικά εργαστήρια για διάγνωση ασθενειών και ταυτοποίηση καρκινικών όγκων. Οι ανοσοπροσδιορισμοί παρουσιάζουν μεγάλη ακρίβεια και χαμηλά όρια ανίχνευσης, τα οποία τις καθιστούν στις πιο ευρέως διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές σε επίπεδο έρευνας και ανάλυσης σε κλινικά εργαστήρια και νοσοκομεία. Με την ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων επιτεύχθηκε στις μεθόδους αυτές υψηλή ακρίβεια λόγω της υψηλής εξειδίκευσης του αντισώματος έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου που σχετίζεται με τη νόσο.

Οι ανοσοπροσδιορισμοί χωρίζονται σε ισοτοπικούς και μη ισοτοπικούς, οι οποίοι επιπλέον χωρίζονται σε ομογενείς και ετερογενείς, ανταγωνιστικές και μη ανταγωνιστικές. Οι ετερογενείς και οι ομογενείς αναλύσεις είναι λίγο πιο χρονοβόρες, καθώς απαιτείται ένα βήμα διαχωρισμού και μεγαλύτερος χρόνος επώασης για επίτευξη ισορροπίας, αντίστοιχα.

Η μέθοδος RIA, ήταν η πρώτη ανοσοδοκιμασία που αναπτύχθηκε και θα μπορούσε να θεωρηθεί ο προπάτορας της σύγχρονης ανοσοδοκιμασίας. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης με μεγάλη εξειδίκευση. Ωστόσο, η χρήση και η απόρριψη των ραδιοϊσοτόπων είναι βλαβερή και επικίνδυνη για την υγεία και το περιβάλλον και απαιτείται η τήρηση και παρακολούθηση νομοθετικών κανόνων χειρισμού και απόρριψης, όπως επίσης και εξειδικευμένο προσωπικό στα εργαστήρια. Τα μειονεκτήματα αυτά των ραδιοανοσοχημικών προσδιορισμών, κυρίως οι κίνδυνοι από την έκθεση στη ακτινοβολία των αντιδραστηρίων, οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη διάθεση των ραδιενεργών υλικών, συμπεριλαμβανομένου και της σύντομης διάρκειας ζωής των επισημασμένων αντιδραστηρίων, καθιστούσαν δύσκολη την εφαρμογή τους με αποτέλεσμα την ανάγκη ανάπτυξης νέων μη-ισοτοπικών προσδιορισμών με μη επικίνδυνους ιχνηθέτες σήμανσης.

Παρόλα αυτά, υπάρχουν σύγχρονα βιοχημικά εργαστήρια που χρησιμοποιούν τη RIA στις διαγνωστικές εξετάσεις.

Οι ανοσοπροσδιορισμοί έχουν εξελιχθεί και υποστεί σημαντικές αλλαγές τα τελευταία χρόνια που αντιστοιχούν στην εξέλιξη της τεχνολογίας επισημάνσης ανοσοπροσδιορισμού. Οι μη ισοτοπικές ανοσοδοκιμασίες έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τις προσεγγίσεις RIA λόγω της απλότητάς τους. Έτσι, με βάση τη μέθοδο RIA, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές, πιο ασφαλείς, που εξακολουθούν να στηρίζονται στην υψηλή εξειδίκευση του αντισώματος έναντι ενός συγκεκριμένου αντιγόνου, χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτες ένζυμα, και ονομάζονται ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί, φθορίζοντα μόρια, οι οποίες ονομάζονται ανοσοπροσδιορισμοί φθορισμού και τεχνικές χημειοφωταύγειας.

Η ανάπτυξη των μεθόδων των ανοσοχημικών τεχνικών εξαρτάται σημαντικά από παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη σύνδεση των αντιγόνων και των ειδικών για αυτά αντισωμάτων. Τέτοιοι παράγοντες είναι το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών του διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί στη ανάλυση. Σκοπός είναι η επίτευξη σταθερού ανοσοσυμπλόκου και η παρεμπόδιση σύνδεσης με άλλα συστατικά του δείγματος, καθώς θα παρεμποδιστεί η ανάλυση και θα ληφθούν λανθασμένα αποτελέσματα. Η ανίχνευση του ανοσοσυμπλόκου με χρήση του κατάλληλου ιχνηθέτη, οδηγεί σε ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυόμενης ουσίας. Οι μέθοδοι ανοσοπροσδιορισμού και χημειοφωταύγειας δεν επηρεάζονται από τις περιβαλλοντικές μεταβολές.

Οι προτιμήσεις στους ανοσολογικούς προσδιορισμούς οφείλονται στην υψηλή ευαισθησία και τη μεγάλη ακρίβεια (λόγω υψηλής εξειδίκευσης) που παρουσιάζουν, των χαμηλών ορίων ανίχνευσης, στην ταχύτητα εκτέλεσής τους, στο χαμηλό κόστος του εργαστηριακού εξοπλισμού τους, στην απλότητα και ευκολία εκτέλεσης και χρήσης των οργάνων, στη μεγάλη ποικιλία των αναλυτών που μπορούν να προσδιοριστούν. Επιπλέον σημαντικό χαρακτηριστικό είναι πως οι περισσότεροι μέθοδοι δεν απαιτούν απόλυτα εξειδικευμένο προσωπικό, λόγω της απλότητας των μηχανημάτων, αλλά και της δυνατότητας αυτοματισμού. Ακόμα, με τους αυτόματους αναλυτές και τη χρήση των μικροπλακιδίων ανάλυσης πολλών θέσεων, υπάρχει η δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Επίσης η ανάπτυξη έτοιμων κιτ έχει βελτιώσει σημαντικά τον χρόνο και το κόστος της ανάλυσης. Έτσι αυτές οι μέθοδοι κυριαρχούν σε εργαστήρια βιοχημείας, έρευνας, κλινικά εργαστήρια και νοσοκομεία.

Βιβλιογραφία

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2018). Cellular and Molecular Immunology, 9e.
- Acquah, C., Ohemeng-Boahen, G., Power, K.A. and Tosh, S.M., (2021). The effect of processing on bioactive compounds and nutritional qualities of pulses in meeting the sustainable development goal 2. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, p.681662.
- Addison, G.M. and Hales, C.N., (1971). Two site assay of human growth hormone. *Hormone and Metabolic Research*, 3(01), pp.59-60.
- Ahmad, T., Cawood, M., Iqbal, Q., Ariño, A., Batool, A., Tariq, R.M.S., Azam, M. and Akhtar, S., (2019). Phytochemicals in *Daucus carota* and their health benefits. *Foods*, 8(9), p.424.
- Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., Gaspar, H.B., Holland, S.M. and Klein, C., (2014). Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in immunology*, 5, p.162.
- Alongi M. and Anese M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods* 81, 1-13.
- Alroqi, F., Alsultan, A., Essa, M. (2019). Primary Immunodeficiency Diseases. In: Duncan, C., Talano, JA., McArthur, J. (eds) *Critical Care of the Pediatric Immunocompromised Hematology/Oncology Patient*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01322-6_5.

Alvarado-Esquivel, C., Martínez-Martínez, A.L., Sánchez-Anguiano, L.F., Hernández-Tinoco, J., Castillo-Orona, J.M., Salas-Martínez, C., Sifuentes-Álvarez, A., Sandoval-Carrillo, A.A., Salas-Pacheco, J.M., Liesenfeld, O. and Antuna-Salcido, E.I., (2017). Lack of association between *Toxoplasma gondii* exposure and depression in pregnant women: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 17, pp.1-4.

Anuradha S., Rajeshwari K., (2005), Probiotics in Health and Disease, *JIACM*, 6(1) 67-72.

Arbitrio, M., Scionti, F., Di Martino, M.T., Caracciolo, D., Pensabene, L., Tassone, P. and Tagliaferri, P., (2021). Pharmacogenomics biomarker discovery and validation for translation in clinical practice. *Clinical and Translational Science*, 14(1), pp.113-119.

Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. and Omar, A.K.M., (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), pp.426-436.

Bailey, I., (2011). Edward Jenner, benefactor to mankind. In *History of Vaccine Development* (pp. 21-25). New York, NY: Springer New York.

Batista, A., Gouveia, L., Bandarra, N., Franco, J. and Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2, 164- 173.

Behbehani, A.M., (1983). The smallpox story: life and death of an old disease. *Microbiological reviews*, 47(4), pp.455-509.

Bernhoft, A., (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals, 50, pp.11-17.

Bhagavati, S., (2021). Autoimmune disorders of the nervous system: pathophysiology, clinical features, and therapy. *Frontiers in neurology*, 12, p.664664.

Bishop, M.L., (2020). *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations, Enhanced Edition: Principles, Techniques, and Correlations*. Jones & Bartlett Learning.

Breman, J.G. and Henderson, D.A., (2002). Diagnosis and management of smallpox. *New England Journal of Medicine*, 346(17), pp.1300-1308.

Califf, R.M., (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), pp.213-221.

Castelli, F.A., Rosati, G., Moguet, C., Fuentes, C., Marrugo-Ramírez, J., Lefebvre, T., Volland, H., Merkoçi, A., Simon, S., Fenaille, F. and Junot, C., (2022). Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 414(2), pp.759-789.

Chan, D.W., (1987). General principle of immunoassay. *Immunoassay: a practical guide*, Academic Press:London, pp.1-23.

Chang, W., Chen, L. and Hatch, G.M., (2015). Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: from mechanism of action to clinical studies. *Biochemistry and cell biology*, 93(5), pp.479-486.

Chen, W., Jie, W.U., Chen, Z.O.N.G., Jie, X.U. and Huang-Xian, J.U., (2012). Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(1), pp.3-10.

Cinquanta, L., Fontana, D.E. and Bizzaro, N., (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?. *Autoimmunity highlights*, 8, pp.1-8.

Czernek, L. and Döchler, M. (2017). Functions of cancer-derived extracellular vesicles in immunosuppression. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 65, pp.311-323.

Dasgupta, A. and Wahed, A., (2013). Clinical chemistry, immunology and laboratory quality control: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice. *Elsevier*, p.19-34.

Deszyński, P., Młokosiewicz, J., Volanakis, A., Jaszczyszyn, I., Castellana, N., Bonissone, S., Ganesan, R. and Krawczyk, K. (2022). INDI—integrated nanobody database for immunoinformatics. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), pp.D1273-D1281.

Dhingra, R. and Vasan, R.S., (2017). Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. *Trends in cardiovascular medicine*, 27(2), pp.123-133.

Diamandis, E.P., (1988). Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. *Clinical biochemistry*, 21(2), pp.139-150.

Dwivedi B., (2022). Radioimmunoassay (RIA)- Definition, Principle, Procedure, Results, Uses. Ανακτήθηκε από: <https://edscl.in/mod/url/view.php?id=877>.

El-Shqanqery, H.E., Ibrahim, H.M., Mohamed, A.H. and El-Sharaawy, A.A., (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors among asymptomatic pregnant females in Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 47(1), pp.93-100.

Engvall, E. and Perlmann, P., (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), pp.871-874.

Galanti, L.M., Dell'Omo, J., Wanet, B., Guarin, J.L., Jamart, J., Garrino, M.G., Masson, P.L. and Cambiaso, C.L., (1997). Particle counting assay for anti-toxoplasma IgG antibodies. Comparison with four automated commercial enzyme-linked immunoassays. *Journal of immunological methods*, 207(2), pp.195-201.

Gemedede, H.F. and Ratta, N., (2014). Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International journal of nutrition and food sciences*, 3(4), pp.284-289.

Grange, R.D., Thompson, J.P. and Lambert, D.G., (2014). Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *British journal of anaesthesia*, 112(2), pp.213-216.

Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Castillo-López, R.I. and Heredia, J.B., (2016). Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(2), pp.87-100.

Guzman, J.A., 2012. Carbon monoxide poisoning. *Critical care clinics*, 28(4), pp.537-548.

Hemmilä, I., (1985). Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clinical chemistry*, 31(3), pp.359-370.

Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E. and Mercenier, A., (2010). Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), pp.175-181.

Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. and He, X., (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(7), pp.377-392.

Keohane, E.M., Otto, C.N. and Walenga, J.M., (2019). Rodak's hematology-e-book: clinical principles and applications. *Elsevier Health Sciences*.

Kerry, R.G., Ukhurebor, K.E., Kumari, S., Maurya, G.K., Patra, S., Panigrahi, B., Majhi, S., Rout, J.R., del Pilar Rodriguez-Torres, M., Das, G. and Shin, H.S., (2021). A comprehensive review on the applications of nano-biosensor-based approaches for non-communicable and communicable disease detection. *Biomaterials Science*, 9(10), pp.3576-3602.

- Kindt, T., Goldsby, R. and Osborne, B., (2007). Tolerance and autoimmunity. Kuby immunology. 6th ed. *New York: WH Freeman and Company.*
- Koch, N., Kaur, J., Mittal, A., Gupta, A., Kaur, I.P. and Agarwal, S., (2016). Status of vitamin D levels in hypothyroid patients and its associations with TSH, T3 and T4 in north Indian population of Meerut, a cross sectional study. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research*, 3(3), pp.295-8.
- Koivunen, M.E. and Krogsrud, R.L., (2006). Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8), pp.490-497.
- Kricka, L.J. and Park, J.Y., (2014). Assay principles in clinical pathology. *Pathobiology of human disease: a dynamic encyclopedia of disease mechanisms*, Elsevier, pp.3207-3221.
- Lleo, A., Invernizzi, P., Gao, B., Podda, M. and Gershwin, M.E., (2010). Definition of human autoimmunity—autoantibodies versus autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 9(5), pp.A259-A266.
- Manger, P.T., Yadav, G.K., Tiwari, D., Awasthi, R. and Verma, D.P., (2023). Serum Copper, Iron, and Total Iron Binding Capacity in Hypothyroidism: A Case Control Study. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, 7(3), pp.141-6.
- Martins, N. and Ferreira, I.C., (2017). Wastes and by-products: Upcoming sources of carotenoids for biotechnological purposes and health-related applications. *Trends in Food Science & Technology*, 62, pp.33-48.
- Maspero, E., Fajner, V., Weber, J. and Polo, S., (2019). Chapter Thirteen - Detection of ubiquitinated targets in mammalian and *Drosophila* models, Editor(s): Mark Hochstrasser, In *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 619, pp. 293-318, ISSN 0076-6879, ISBN 9780128186671, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.12.030>.
- McCusker, C., Upton, J. and Warrington, R., (2018). Primary immunodeficiency. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14, pp.1-12.

Medina, K.L. (2016). Overview of the immune system. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 133, pp. 61-76). Elsevier.

Mendoza-Larios, L.A., García-Dolores, F., Sánchez-Anguiano, L.F., Hernández-Tinoco, J. and Alvarado-Esquivel, C., (2021). Association between suicide and *Toxoplasma gondii* seropositivity. *Pathogens*, 10(9), p.1094.

Midhun, N., Sonia Bai, J.K., Chakrapani, K.V., Haripriya, G., Pathuri, C.K.V.S. and Ramalakshmi, N.S., (2021). Enzyme linked immunosorbent assay-lab diagnosis: A review. *Indian J. Microbiol. Res*, 8, pp.10-14.

Miles, L.E., (1975). Properties, variants, and applications of the immunoradiometric assay method. *Ricerca in clinica e in laboratorio*, 5, pp.59-72.

Mohanty, S.K. and Leela, K.S., (2013). *Textbook of immunology*. JP Medical Ltd.

Muñoz-Carrillo, J.L., Castro-García, F.P., Chávez-Rubalcaba, F., Chávez-Rubalcaba, I., Martínez-Rodríguez, J.L., and Hernández-Ruiz, M.E. (2018). Immune System Disorders: Hypersensitivity and Autoimmunity. InTech. doi: 10.5772/intechopen.75794.

Nakane, P.K. and Pierce Jr, G.B., (1966). Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 14(12), pp.929-931.

Nicholson, L.B., (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), pp.275-301.

Ngo, S.T., Steyn, F.J. and McCombe, P.A., (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), pp.347-369.

Norman, R.A., Ambrosetti, F., Bonvin, A.M., Colwell, L.J., Kelm, S., Kumar, S., and Krawczyk, K. (2020). Computational approaches to therapeutic antibody design: established methods and emerging trends. *Briefings in bioinformatics*, 21(5), pp.1549-1567.

- O'sullivan, M.J., Bridges, J.W. and Marks, V., (1979). Enzyme immunoassay: a review. *Annals of Clinical Biochemistry*, 16(1-6), pp.221-239.
- Paliwal, C., Ghosh, T., George, B., Pancha, I., Maurya, R., Chokshi, K., Ghosh, A. and Mishra, S. (2016). Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research*, 15, 24-31.
- Pang, B., Zhao, L.H., Zhou, Q., Zhao, T.Y., Wang, H., Gu, C.J. and Tong, X.L. (2015). Application of berberine on treating type 2 diabetes mellitus. *International journal of endocrinology*, 2015:905749.
- Palta, S., Saroa, R. and Palta, A., (2014). Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia*, 58(5), p.515.
- Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A.R. and Harford, J.A., (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Analytical biochemistry*, 593, p.113608.
- Price, C.P. and Newman, D.J. eds., (1991). *Principles and practice of immunoassay*. Springer, Stockton Press: New York. p. 399-400.
- Qin, Y., Li, J., Kuang, J., Shen, S., Jiang, J., Zhang, Z., Zhao, C., Zhou, X., Huang, B. and Han, B., (2022). Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the quantitative detection of okadaic acid. *Frontiers in Marine Science*, 9, p.961751.
- Ray, P., Manach, Y.L., Riou, B., Houle, T.T. and Warner, D.S., (2010). Statistical evaluation of a biomarker. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 112(4), pp.1023-1040.
- Raysyan, A., Moerer, R., Coesfeld, B., Eremin, S.A. and Schneider, R.J., (2021). Fluorescence polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, pp.999-1007.

Riedel, S., (2005, January). Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *In Baylor University medical center proceedings* (Vol.18, No.1, pp.21-25). Taylor & Francis.

Rostami, A., Karanis, P. and Fallahi, S., (2018). Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *infection*, 46, pp.303-315.

Routledge, P.A. and Hutchings, A.D., (2013). Chapter 9.22 - Therapeutic Drug Monitoring (TDM), Editor(s): David Wild, *The Immunoassay Handbook* (Fourth Edition), *Elsevier*, pp. 945-962, ISBN 9780080970370, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00076-2>.

Sahoo, C.K., Sudhakar, M., Ramana, D.V., Satyanarayana, K. and Panda, K.C., (2018). Validation of analytical procedures-A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(2), pp.109-116.

Samtiya, M., Aluko, R.E. and Dhewa, T., (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2, pp.1-14.

Sellrie, F., Beck, M., Hildebrandt, N. and Micheel, B., (2010). A homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) using antibody mediated luminescence quenching. *Analytical Methods*, 2(9), pp.1298-1301.

Shakya, A.K., (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(4), pp.59-64.

Sharma, A., Pillai, M.R.A. Gautam, S. and Hajare, S.N. (2014). MYCOTOXINS: Immunological Techniques for Detection and Analysis, in *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Editors: Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, *Elsevier, Academic Press*, pp. 869-879, ISBN 9780123847331, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00233-0>.

Slagle, K.M. and Ghosn, S.J., (1996). Immunoassays: tools for sensitive, specific, and accurate test results. *Laboratory medicine*, 27(3), pp.177-183.

Smith, D.S., Al-Hakiem, M.H. and Landon, J., (1981). A review of fluoroimmunoassay and immunofluorometric assay. *Annals of Clinical Biochemistry*, 18(5), pp.253-274.

Smith, D.S. and Eremin, S.A., (2008). Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 391, pp.1499-1507.

Smith, K.A., (2011). Edward Jenner and the small pox vaccine. *Frontiers in immunology*, 2, p.21.

Sompayrac, L.M., (2022). *How the immune system works*. John Wiley & Sons.

Stojanovich, L. and Marisavljevich, D., (2008). Stress as a trigger of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 7(3), pp.209-213.

Tan, S.Y. and Bracha, A., (2019). Rosalyn Yalow (1921–2011): Madame Curie from the Bronx. *Singapore Medical Journal*, 60(7), p.337.

Tozzoli, R. and Bizzaro, N., (2020). The clinical and the laboratory autoimmunologist: Where do we stand?. *Autoimmunity Highlights*, 11(1), p.10.

Tripathi, M.K. and Giri, S.K., (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, pp.225-241.

Tsoukalas, D., Fragoulakis, V., Sarandi, E., Docea, A.O., Papakonstaninou, E., Tsilimidos, G., Anamaterou, C., Fragkiadaki, P., Aschner, M., Tsatsakis, A. and Drakoulis, N., (2019). Targeted metabolomic analysis of serum fatty acids for the prediction of autoimmune diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, p.120.

Tur, J. A. and Bibiloni, M. del Mar. (2016). Functional Foods. *Encyclopedia of Food and Health*. 10.1016/B978-0-12-384947-2.00340-8.

- Turvey, S.E. and Broide, D.H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), pp.S24-S32.
- Ullman, E.F., Schwarzbarg, M. and Rubenstein, K.E., (1976). Fluorescent excitation transfer immunoassay. A general method for determination of antigens. *Journal of Biological Chemistry*, 251(14), pp.4172-4178.
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M. and Massart, D.L., (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), pp.723-753.
- Vankar, P.S., (2004). Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, 9(4), pp.30-41.
- Van Wyk, B.E. and Wink, M., (2018). Medicinal plants of the world. CABI.
- Vashist, S.K. and Luong, J.H. eds., (2018). *Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications*. Academic Press, Elsevier.
- Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D.E., (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology*, 31(6), pp.507-520.
- Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.N.N., (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1), p.55.
- Walia, A., Gupta, A.K. and Sharma, V., (2019). Role of bioactive compounds in human health. *Acta Sci. Med. Sci*, 3(9), pp.25-33.
- Wild, D., (2013). The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. *Newnes, Elsevier*.

Wu, J. and Ju, H.X. (2012). 3.07 - Clinical Immunoassays and Immunosensing, in Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Ed. Janusz Pawliszyn, *Academic Press*, pp. 143-167, ISBN 9780123813749, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00071-5>.

Wu, W., Yang, S., Liu, J., Mi, J., Dou, L., Pan, Y., Mari, G.M. and Wang, Z., (2020). Progress in immunoassays for nitrofurans detection. *Food and Agricultural Immunology*, 31(1), pp.907-926.

Xiong, S. and Xu, W. (2014). 10.06 - Human Immune System, in Comprehensive Biomedical Physics, *Elsevier*, 10, pp. 91-114.

Yerlikaya, O., (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. *Food Science and Technology*, 34, pp.221-229.

Ελληνική βιβλιογραφία

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ.Ε. and Φούντζουλα, Χ., (2015). Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί. Βασικές αρχές ELISA. *Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*. Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/5386>.

Κουτελιδάκης, Α., (2019). Λειτουργικά Τρόφιμα. Η σημασία τους στην διατροφή, την υγεία και την ποιότητα ζωής. *Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΖΗΤΗ*.

Οικονομίδου, Ι., (2011). Η Ανοσολογία χθες-σήμερα-αύριο Μια σύντομη αναδρομή στην εξέλιξη της Ανοσολογίας. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 28(3), pp.403-414.

Σκορίλας, Α., (2009). Αρχές Κλινικής Χημείας και Μοριακής Διαγνωστικής.(σελ. 86-109). *Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία*.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.