

UDK 37

ISSN 2545 - 4439
ISSN 1857 - 923X

INTERNATIONAL JOURNAL

Institute of Knowledge Management

KNOWLEDGE



Scientific Papers

Vol. 31. 4.

MEDICAL SCIENCES AND HEALTH



KIJ

Vol. 31

No. 4

pp. 811 - 1198

Skopje 2019

Global Impact & Quality Factor 1.822 (2107) <http://globalimpactfactor.com/knowledge-international-journal/>

DYABETTE CONTROL PROGRAM AND PREVENTION OF THEIR CONDITIONS - PROPOSALS AND GUIDELINES	959
Varvara Pancheva.....	959
Valentin Vassilev.....	959
ALGORITHM OF COMPLEX PROGRAM FOR TREATMENT AND REHABILITATION IN DEGENERATIVE DISEASES OF THE VERTEBRAL COLUMN IN THE CERVICAL AREA. PREVENTION OF CERVICAL ARTHROPATHY	963
Petya Kasnakova.....	963
THE DIAGNOSIS OF DAUCUS CAROTA AS ALERGOGEN ON THE IMMUNE SYSTEM IN WHITE LABORATORY RAT	969
Mire Spasov.....	969
Icko Gjorgoski	969
THE DIAGNOSIS OF PHLEUM PRATENSE AS ALERGOGEN ON THE IMMUNE SYSTEM IN WHITE LABORATORY RAT	975
Hristijan Spasov.....	975
Mire Spasov.....	975
Icko Gjorgoski	975
Majlinda Ademi.....	975
INCREASED MEASLES MORBIDITY AND PUBLIC AWARENESS OF THE RISKS OF REFUSING IMMUNIZATION FOR THIS DISEASE	981
Ivelina Dobрева	981
Pavlina Teneva	981
Tsvetana Bojkova	981
PERSPECTIVES IN HEALTH CARE FOR CHILDREN WITH SPECIAL NEEDS IN CHILDREN'S AND SCHOOL HEALTH.....	985
Monika Obreykova	985
Galina Terzieva.....	985
MYOPIA IN PRE-SCHOOL CHILDREN AND MOBILE PHONES	991
Aleksandar Dodevski.....	991
Strahil Gazepov	991
Biljana Dodevska.....	991
Alen Georgijev	991
VISUAL SCREENING OF SCHOOL CHILDREN IN THE MUNICIPALITY OF SAPAREVA BANYA IN SOUTHWESTERN BULGARIA.....	995
Slavena Stoykova	995
Ekaterina Petrova.....	995
WETTABILITY – ANOTHER PARAMETER FOR GOOD FITTING OF A SILICONE-HYDROGEL DAILY DISPOSABLE CONTACT LENS	1001
Nikola Peev	1001
SUCCESSFUL COGNITIVE AGING - COGNITIVE RESERVE AND NEUROPLASTICITY	1005
Antonia Yaneva	1005
Kristina Kilova	1005
Teodora Dimcheva	1005
THE ROLE OF ACUPUNCTURE IN THE REHABILITATION OF PARALYSIS OF N.FACIALIS	1009
Lence Nikolovska.....	1009
Stefanija Gjorgieva.....	1009
Mire Spasov.....	1009

THE DIAGNOSIS OF PHLEUM PRATENSE AS ALERGOGEN ON THE IMMUNE SYSTEM IN WHITE LABORATORY RAT

Hristijan Spasov

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University „St. Cyril and Methodius“- Skopje, Republic of North Macedonia, spasov.hristijan@gmail.com

Mire Spasov

Faculty of Medical Science, University „Goce Delcev“- Stip, Republic of North Macedonia, mire.spasov@ugd.edu.mk

Icko Gjorgoski

Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University „St. Cyril and Methodius“- Skopje, Republic of North Macedonia, icko.gjorgoski@gmail.com

Majlinda Ademi

Faculty of Medical Science, University „Goce Delcev“- Stip, Republic of North Macedonia

Abstract: Allergic reactions in the body are initiated by non-pathogenic allergens that cause hypersensitivity to the immune system of the type I hypersensitivity group, characterized by excessive activation of the cells of the white blood cell, mast cells and basophils by IgE, resulting in an inflammatory response. The particles of the allergen in the body mainly penetrate the mucous membranes of the body openings causing a series of reactions by activating T cells and B cells. The main symptoms of allergic reactions are secretion from the mucous membrane, irritation, swelling with itching and redness.

The aim of the research came from the assume that in the white laboratory rat, when treated with an allergen isolated from the pollen of the Phleum pratense plant, there may be an allergic reaction, and hence a change in some parameters of the immune system. As a result of these assumptions the following specific goals were set. To determine the change in the concentration of immunoglobulins in serum from the blood taken from the rats every week for a month, to determine the variation in the total number of leukocytes, determine the number of basophils that compared to the reference value will indicate whether there are certain changes. The basophils were the target of the study because it is known that their number is the same with the number of mast cells that also increase during the allergic reaction. Our goal was also to determine the changes in the above parameters in relation to the different concentration of the allergen. As an experimental model we used white laboratory rats from the Wistar kind. All of them were female at the age of 6 to 9 weeks. The chosen age is due to their genetic predisposition to develop Th2-type cells that are involved in the immune response to the model of the allergy that has been studied. The rats were divided into three groups of six animals, the first group of rats being treated with an allergen in a quantity of 5 µL, adsorbed in 100 µl Al (OH) 3 (Serva, Heidelberg, Germany, 2 mg / mL) in a total volume of 150 µl sterile PbS., treated with a recombinant allergen from Phleum pratense at room temperature, a second group treated with an allergen in an amount of 2.5 µl, and a third group of control rats that are not treated and serve to compare the results. Our studies have shown that in the treatment with an allergen isolated from the pollen of the plant Phleum pratense at concentrations of 5 µl and 2.5 µl, the white laboratory rat develops an allergic reaction with a change in the concentration of immunoglobulins, changes in the total number of leucocytes, the percentage of lymphocytes, monocytes and basophils. The results obtained by the ELISA test of the two volumes show that the concentrations of immunoglobulins during the experimental period of day by day, are continuously increasing, and are proportional to the volume of the allergen.

Keywords: allergen, Phleum pratense, lymphocytes, basophils, immunoglobulins.

ВЛИЈАНИЕТО НА PHLEUM PRATENSE КАКО АЛЕРГЕН ВРЗ ИМУНИОТ СИСТЕМ КАЈ БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ

Христијан Спасов

Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“- Скопје, Република Северна Македонија, spasov.hristijan@gmail.com

Мире Спасов

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Северна
Македонија, mire.spasov@ugd.edu.mk

Ицко Ѓорѓоски

Природно-математички факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ - Скопје, Република
Северна Македонија, icko.gjorgoski@gmail.com

Мајлинда Адеми

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Северна
Македонија

Резиме: Алергиските реакции во организмот се иницирани од непатогени алергени кои предизвикуваат преосетливо нарушување на имуниот систем од групата на хиперсензитивност тип I, кои се карактеризираат со прекумерна активација на клетките од белата крвна лоза, мастоцитите и базофилите од страна на IgE, што резултира со инфламаторен одговор. Честиците од алергенот во организмот главно навлегуваат преку мукозните мембрани на телесните отвори предизвикувајќи низа реакции со активирање на T-клетките и B-клетките. Главните симптоми при алергиските реакции се лачење од мукозната мембрана, надразнетост, оток со чешање и црвенило.

Целта на истражувањето произлезе од претпоставката дека кај белиот лабораторискиот стаорец при третманот со алерген изолиран од поленот на растението *Phleum pratense* можно е да дојде до алергиска реакција, а со самото тоа и до промена на некои параметри од имуниот систем. Како резултат на овие претпоставки се поставија следните конкретни цели. Да се определи промената на концентрацијата на имуноглобулините во серумот од крвта која беше земена од стаорците на секоја недела во текот на еден месец, да се определи варијацијата на вкупниот број на леукоцитите, да се определи бројот на базофилите кој спореден со референтната вредност ќе покаже дали има одредени промени. Базофилите беа цел на истражувањето бидејќи се знае дека нивниот број е ист со бројот на мастоцитите, кои исто така се зголемуваат при алергиската реакција. Цел ни беше и да се одредат промените на горе наведените параметри во однос на различната концентрација од алергенот. Како експериментален модел беа користени бели лабораториски саорци од сојот Wistar. Сите беа од женски пол на возраст од 6 до 9 недели. Избраната возраст е поради нивните генетски предиспозиции да развиваат клетки од типот T_H2 , кои се вклучени во имуниот одговор на моделот на алергијата која беше предмет на изучувањето. Стаорците беа распределени во три групи од по шест животни и тоа, прва група стаорци кои се третирали со алерген во количина од $5\mu\text{L}$, адсорбиран во $100\mu\text{l Al(OH)}_3$ (Serva, Heidelberg, Germany, 2mg/mL) во вкупен волумен од $150\mu\text{l}$ стерилан PbS., третирали со рекомбинантен алерген од *Phleum pratense* на собна температура, втора група третирали со алерген во количина од $2,5\mu\text{l}$, и трета група на контролни стаорци, кои не се третирали и служат за споредба на резултатите. Нашите истражувања покажаа дека при третманот со алерген изолиран од поленот на растението *Phleum pratense*, во концентрации од $5\mu\text{l}$ и $2,5\mu\text{l}$, кај белиот лабораторискиот стаорец доаѓа до алергиска реакција со промена во концентрацијата на имуноглобулините, промени во вкупниот број на леукоцитите, процентот на лимфоцитите, моноцитите и базофилите. Резултатите добиени со ELISA тестот од двата волумени покажуваат дека концентрациите на имуноглобулините за време на експерименталниот период од ден на ден континуирано растат, а се пропорционални со волуменот на алергенот.

Клучни зборови: алерген, *Phleum pratense*, лимфоцити, базофили, имуноглобулини.

1. ВОВЕД

Алергиските реакции претставуваат преосетливо нарушување на имуниот систем и спаѓаат во групата на хиперсензитивност тип I. Таа се карактеризира со прекумерна активација на клетките од белата крвна лоза, од страна на IgE, што резултира со инфламаторен одговор [8]. Алергиските реакции се карактеризираат со два типа на синдроми, благи алергиски синдроми и тешки алергиски синдроми. Во благите алергиски синдроми спаѓаат покачената телесна температура, конјуктивитис, чешање, течење на нос и сл. [1]. Тешките алергиски синдроми се јавуваат на респираторниот систем и можат да предизвикаат астма или анафилактички реакции кои се опасни, а во некои случаи и фатални [5]. Алергиските реакции се предизвикани од материи наречени алергени и истите не се паразитски антигени. Една од главните карактеристики на хиперсензитивноста од тип I е тоа што плазма-клетките лачат IgE, како резултат на активирањето на T_H2 клетките [3]. Честиците од алергенот во организмот се движат кон мукозните мембрани и навлегуваат во внатрешноста на организмот преку отворите. Таму се прифаќаат од страна на клетки

претставнички на антигените, одосно Т-клетките кои го прифаќаат алергенот со помош на своите Т-клеточни рецептори [4,10]. Откако алергенот ќе биде прифатен Т-клетките ги активираат В-клетките кои ослободуваат IgE антигени [7,11]. Овие IgE антигени се наоѓаат на надворешната страна на маст клетките кои содржат гранули богати со хемиски медијатори, хистамини и простагландини, што предизвикува дегрануирање на маст клетките и испуштање на истите во околното ткиво [2], кои пак се врзуваат за медијаторските места на површината на крвните садови и го зголемуваат волуменот на крвниот сад и протокот на крвта низ него [9]. Ова предизвикува солзење на мукозната мембрана, црвенило, оток и чешање, што претставуваат основни симптоми на алергиската реакција [6]. За таа цел во организмот има антихистамини кои ги блокираат сврзните места на хистаминот на мембраните од крвните садови, со што го намалуваат степенот на алергиската реакција во организмот.

2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Конкретни цели на трудот:

- да се определи промената во концентрацијата на имуноглобулините во серумот од третираниите стаорци на секоја недела во текот од еден месец.
- да се определат промените во вкупниот број на леукоцитите, споредени со референтните вредности. Посебно базофилите беа цел на истражувањето, бидејќи се знае дека нивниот број е ист со бројот на мастоцитите, кои исто така се зголемуваат при алергиска реакција.
- да се одредат промените на параметрите во функција од различната концентрација на алергенот.

3. МАТРИЈАЛ И МЕТОДИ

Како алерген се користеше поленот од *Phleum pratense*, растение кое спаѓа во групата на повеќегодишни треви. За експериментот беа користени бели лабараториски саорци од сојот Wistar, сите од женски пол (n=18) на возраст од 6 до 9 недели. Избраната возраст е поради нивните генетски предиспозиции да развиваат клетки од типот T_H2 , кои се вклучени во имуниот одговор на алергијата, која беше предмет на изучување. Стаорците беа распределени во три групи од по шест животни:

- прва група стаорци кои се третирани со алерген во количина од $5\mu\text{L}$, адсорбиран во $100\mu\text{L}$ $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Serva, Heidelberg, Germany, 2mg/mL) во вкупен волумен од $150\mu\text{L}$ стерилен PbS. Phl I (1-6), третирани со рекомбинантен алерген од *Phleum pratense* на собна температура.
- втора група стаорци, третирани со алерген во количина од $2,5\mu\text{L}$ Phl II (1-6).
- трета група на контролни стаорци К (1-6), кои не се третирани и служат за споредба на резултатите.

Сите стаорци, освен контролните, беа сензибилизирани со инекции кои содржат $5\mu\text{L}$ и $2,5\mu\text{L}$ рекомбинантен алерген. Алергенот им беше инјектиран субкутано во пределот на задните нозе периодично, на секои седум дена. Крвта се земаше од опашката на стаорците и се испитуваше со стандардни хематолошки анализи, а за биохемиските анализи се собираше во епендорфи во кои претходно се ставаше антикоагуланс 3,8% цитрат во сооднос 9:1. Во меланџери се земаше крвта за подготовка на крвните препарати каде се броеја базофилите и леукоцитите по леукоцитарната формула. Боењето на крвните препарати се вршеше по Gimza. Определување на концентрацијата на IgE и IgG во серумот со помош на ELISA тестовите се добиваа со комерцијални китови на хемилуминисцентниот анализатор Immulite.

4. РЕЗУЛТАТИ

Резултати добиени од имунизација со алергенот Daucus Carota

4.1. Графички приказ и споредба на резултатите добиени од имунизацијата на стаорците со два волумена; $5\mu\text{L}$ (I) и $2,5\mu\text{L}$ (II) на алергенот *Phleum pratense*, со резултатите од контролните стаорци:

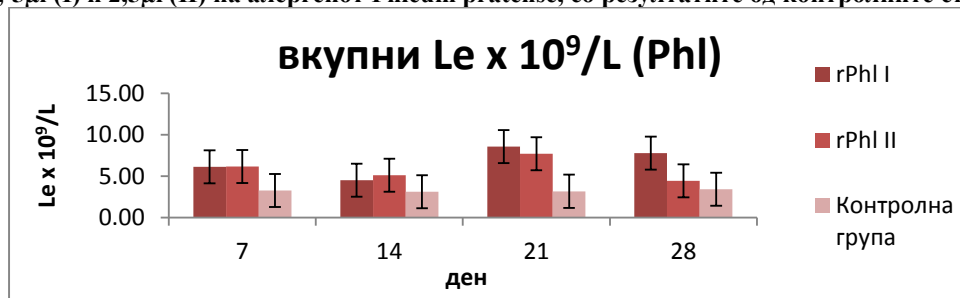


График бр.1 Споредба на вкупниот број леукоцити кај *P.pratense* (I и II) со контролната група

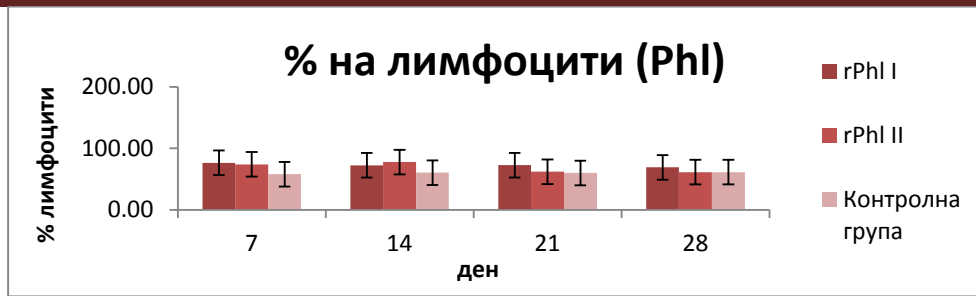


График бр.2 Споредба на процентот на лимфоцитите кај *P.pratense* (I и II) со контролната група

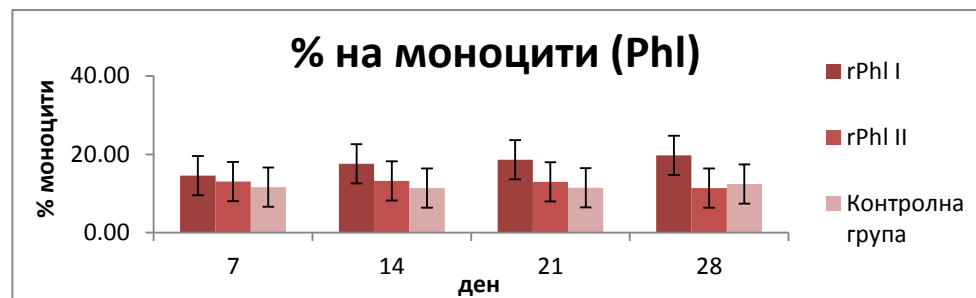


График бр.3 Споредба на процентите на моноцити кај *P.pratense* (I и II) со контролната група

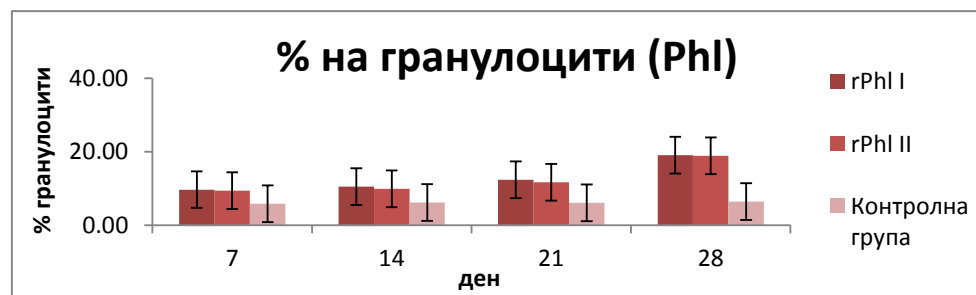


График бр.4 Споредба на процентот на гранулоцити кај *P.pratense* (I и II) со контролната група

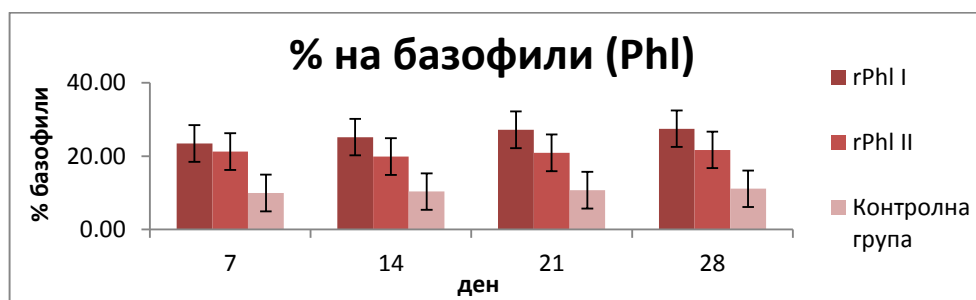


График бр.5 Споредба на процентите на базофили кај *P.pratense* (I и II) со контролната група

4.2. Графички приказ на резултатите добиени од ELISA тестот по имунизацијата на стаорците со двата волумена; 5 μ l и 2,5 μ l на алергенот *Phleum pratense*:

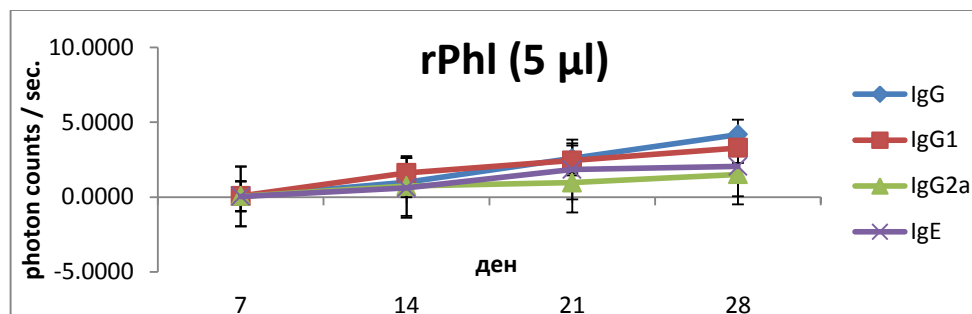


График бр.6 Споредба на резултатите од ELISA тестот кај *P.pratense* со волумен на алергенот од 5 μ L

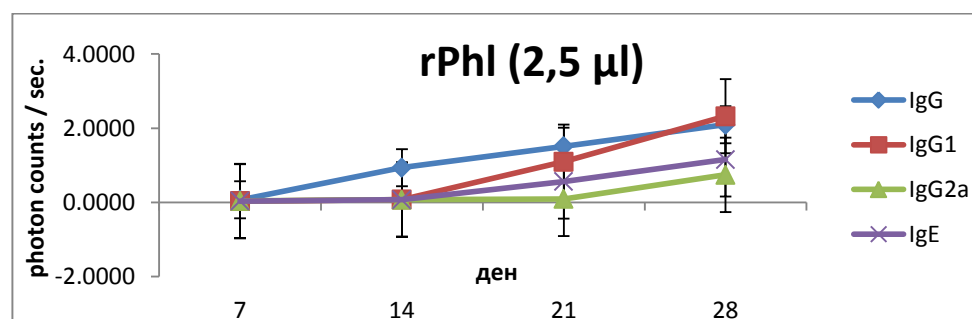


График бр.7 Споредба на резултатите од ELISA тестот кај *P.pratense* со волуме на алергенот од 2,5 μ L

5. ДИСКУСИЈА

За нашето истражување користевме волумен на алергенот од 5 μ l и 2,5 μ l. На почетокот од имунизацијата со 5 μ l од алергенот до 7-иот ден бројот на леукоцити двојно се зголемува во однос на контролната група. Веќе на 14-иот ден неговата вредност се намалува и изнесува 4,50x10⁹/L. За една недела истиот број се зголемува до вредноста од 8,57x10⁹/L, што е приближно двојно, за да на крајот од третманот вредноста добие благо намалување. Кај лимфоцитите од почетокот на имунизацијата нивниот процент е 76,40% а на крајот е 69,19%. На 7-иот ден вредноста за процентот на моноцитите е 14,58%, со константен пораст до 21-иот ден, кога е 19,72%. Кај гранулоцитите промената на вредноста е различна во споредба со промената на вредностите кај лимфоцитите, леукоцитите и моноцитите. До третата недела вредноста благо се покачува, а на 28-иот ден оваа вредност се зголемува драстично и изнесува 19,03%. Кај базофилите се забележува мало покачување на вредностите, но е од огромно значење за детекција и анализа на алергиската реакција која се случува во еден организам. Резултатите за леукоцитите од помалиот волумен на алергенот нотираат наизменичен раст и пад на вредностите. На 7-иот ден има зголемување на вредноста во споредба со контролните резултати, на 14-иот ден намалување, на 21-иот ден вредноста расте, а на 28-иот повторно опаѓа. Во почетокот од третирањето бројот на лимфоцитите расте се до вредност од 77,77%, на 14-иот ден, но потоа истата опаѓа. На 21-иот ден изнесува 61,94%, а на крајот од имунизацијата вредноста се намалува до 61,38%. Ова покажува дека максималниот на растот на бројот на лимфоцитите е во втората недела од имунизацијата. Истото се забележува и кај вредностите за моноцитите. Максималната вредност што ја достигнуваат моноцитите е 13,24%. Најмалата вредност се постигнува на крајот од третманот на 28-иот ден и изнесува 11,37%. Графикот на кој се претставени вредностите за гранулоцитите покажува постепено покачување до третата недела од имунизацијата до 11,65%, и 18,87% во четвртата недела. Базофилите на почетокот достигнуваат вредност од 21,25% која за една недела опаѓа и доаѓа до вредност од 19,90%. Споредбата на резултатите од имунизацијата со различен волумен од алергенот дава слика како алергенот во две различни концентрации делува врз организмот. Бројот на леукоцитите во првите две недели кај стаорците имунизирани со пониската концентрација (Phl II) е за нијанса повисок во однос на бројот кај оние стаорци имунизирани со повисока концентрација. Се забележува дека во втората недела од третманот бројот на лимфоцитите е повисок кај стаорците третирани со пониска концентрација од алергенот. Кај моноцитите

и гранулоцитите сите четири недели вредностите за соодветните клетки кај стаорците третирани со пониска концентрација е пониска споредбено со вредностите со повисока концентрација од алергенот. Вредностите за базофилите покажуваат дека повисока вредност има кај стаорците третирани со 5 μ l во однос на оние имунизирани со 2,5 μ l.

Според добиените резултати од ELISA тестот за волумен од 5 μ l се гледа дека имуноглобулините континуирано растат. Кај IgG се забележува дека зголемувањето на концентрацијата е значително помала во споредба со растот на концентрацијата кај IgG1 во втората недела, но во третата нивната концентрација е приближно иста, за да во четвртата таа концентрација кај IgG е поголема. На почетокот од имунизацијата концентрацијата на IgG2a и IgE растат скоро подеднакво се до втората недела. Крајните концентрации на имуноглобулините се: IgG 4,1820, IgG1 3,2833, IgG2a 1,5207 и IgE 2,0472. Вториот график прикажува промени во концентрациите на имуноглобулините кај стаорците имунизирани со 2,5 μ L. Концентрацијата на IgG има постепен раст и максималната концентрација која ја достигнува во четвртата недела е 2,0938. За разлика од IgG, IgG1 до втората недела има минимален раст со вредност 0,0757, но откако ќе ја достигне оваа концентрација вредноста почнува нагло да расте и на крај ја надминува и концентрацијата на IgG со вредност од 2,3237. Начинот на промената на концентрациите и за IgG2a и IgE е приближно исто како и за претходните имуноглобулини. Максималните концентрации за IgG2a и IgE се 1,1569 и 0,7439 соодветно.

6.ЗАКЛУЧОЦИ

Од направените анализи и добиените резултати можеме да ги извлечеме следните заклучоци:

- алергенот *Phleum pratense* предизвикува алергиски реакции кај стаорците.
- *Phleum pratense* може да се класифицира во алергени. Алергеноста, пред се, зависи од индивидуите кои ќе дојдат во контакт со нив, состојбата на имуниот систем и од концентрацијата на алергенот.
- вредностите за крвните параметри и концентрациите на имуноглобулините IgG, IgG1, IgG2a и IgE во серумите, покажуваат дека концентрацијата на истите е пропорционална со концентрацијата на алергенот.
- алергенот предизвикува алергиска реакција кај стаорците од сојот Wistar, која се класифицира во тип I хиперсензитивност.

ЛИТЕРАТУРА

- Buckley, R. H. (2002). *Primary immunodeficiency diseases: dissectors of the immune system*. Immunol Rev. 185:206. Excellent review of the molecular basis and therapy therapy of the major primary immunodeficiency diseases.
- Galli, S. J. et al. (2005). *Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances*. Annu Rev Immunol 23:749. Modern discussions of the activation and regulation of mast cells, and their roles in allergic diseases.
- Goodnow, C. C. et al. (2005). *Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity*. Nature 435:590. Mechanisms of self-tolerance and how they may break down to give rise to autoimmune disease.
- G.Virella. (2007). *Medical immunology* 6th ed.
- Johannes Ring. *Anaphylaxis, Chemical immunology and allergy*. vol. 95.
- John Viley. (2005). *Mast cells and basophiles, development activation and role in allergic diseases*.
- John R. Crowthed. (2005). *The ELISA guidebook, Methods in molecular biology*. vol. 149.
- Kay, A. B. (2001). *Allergy and allergic diseases*. First of two parts. N. Engl. J. Med. 344:30, 109. [Superb two-part review of the mechanisms type I hypersensitivity.]
- Libby, P., & Pober, J. S. (2001). *Chronic rejection*. Immunity 14:387. [Well-written summary of the mechanisms of allograft arteriopathy.]
- Schwartz, R. H. (2003). *T cell anergy*. Ann. Rev. Immunol. 21:305. [Excellent review of one of the important mechanisms of T-cell tolerance.]
- Walker, L. S., & Abbas, A. K. (2002). *The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery*. Nat. Rev. Immunol. 2:11. Review of the known molecular mechanisms of peripheral T-cell tolerance.