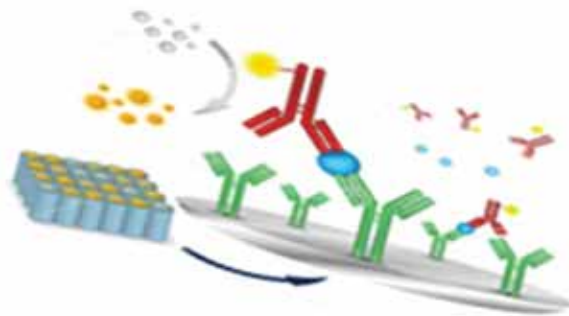
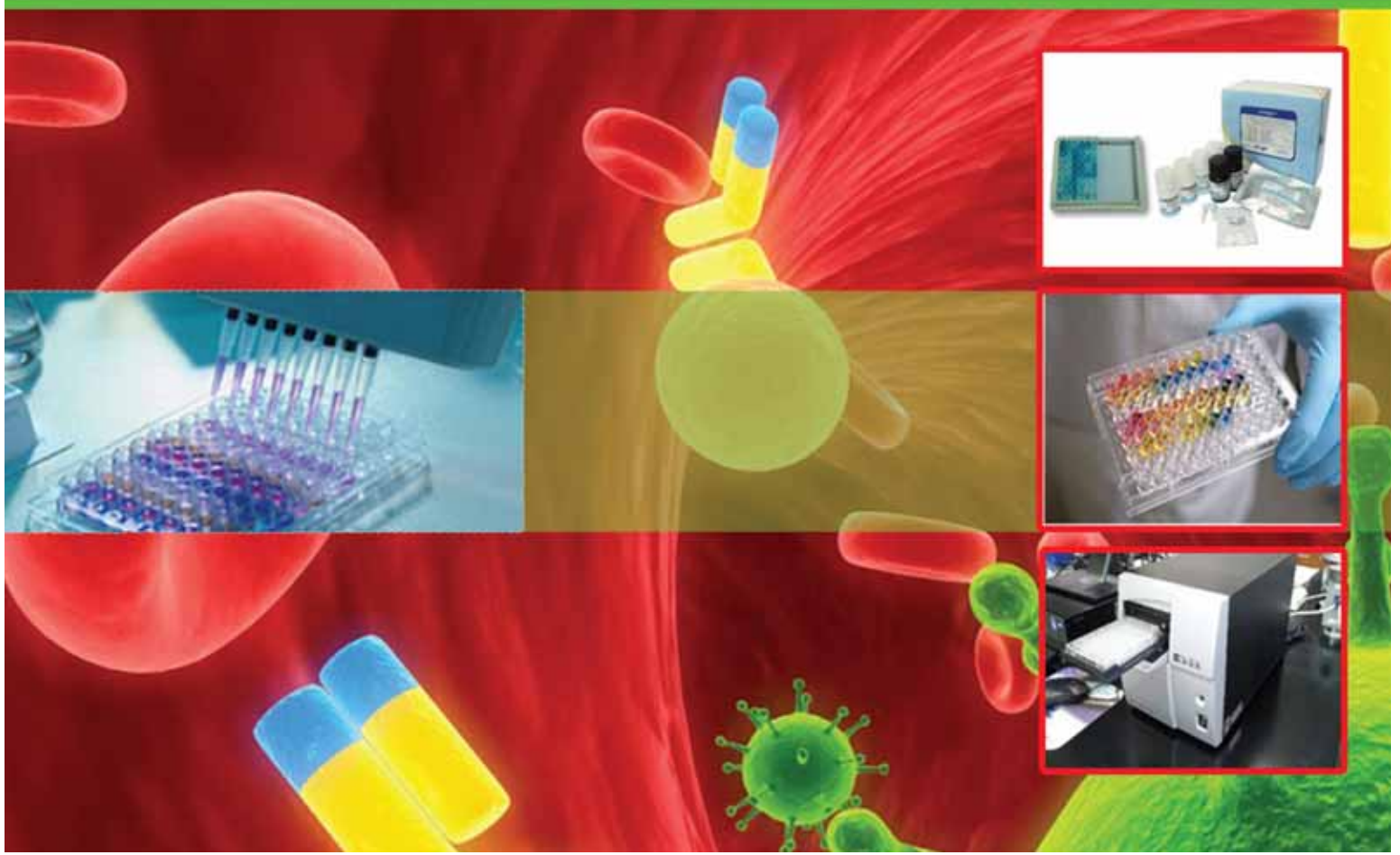


تکنیک الایزا

اصول کلی و تکنیک‌ها



مریم اسکندریان ** امیرحسین جهانگیری ** دکتر محمدطاهر طه‌پوری





📍 تهران، خیابان انقلاب، خیابان فخر رازی
نیش کوچه ماستری فراهانی، پلاک ۲۸
۶۶۹۷۱۹۷۰ - ۶۶۹۷۱۸۰۴ - ۶۶۱۷۵۰۵۳



📱 Lohebartar.ir
🌐 www.Lohebartar.ir
✉ Lohebartar@gmail.com
📺 @Lohebartarpub

سامانه پیامکی: ۳۰۰۰۵۳۶۴۰۰۰۵۳۶



تکنیک الایزا

اصول کلی و تکنیک های عملی

مؤلفان:

مریم اسکندریان، امیرحسین جهانگیری، دکتر محمدطاهر طهوری

انتشارات لوح برتر



سرشناسه :	اسکندریان، مریم، ۱۳۶۴ -
عنوان و نام پدیدآور :	تکنیک الایزا: اصول کلی و تکنیک‌های عملی / مولفان مریم اسکندریان، امیرحسین جهانگیری، محمدطاهر طه‌پوری؛ [برای] دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد.
مشخصات نشر :	تهران : لوح برتر،
مشخصات ظاهری :	۱۱۴ ص.: مصور (رنگی).
شابک :	۹۷۸-۶۰۰-۷۴۱۲-۴۹-۷
وضعیت فهرست نویسی :	فیپا
موضوع :	ایمنی سنجی با آنزیم‌های نشاندار
موضوع :	Enzyme-linked immunosorbent assay
موضوع :	میکروب‌شناسی تشخیصی
موضوع :	Diagnostic microbiology
شناسه افزوده :	جهانگیری، امیرحسین، ۱۳۷۰ -
شناسه افزوده :	طه‌پوری، محمدطاهر، ۱۳۶۲ -
شناسه افزوده :	دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
شناسه افزوده :	Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services
رده‌بندی کنگره :	۱۳۹۷ الف ۵ الف ۹ / ۹ / ۵۱۹ QP
رده‌بندی دیویی :	۶۱۶/۰۷۵۶
شماره کتابشناسی ملی :	۵۱۳۸۲۰۶

شماره پروانه نشر: ۹۶۹۷



حقوق چاپ و نشر، محفوظ و مخصوص ناشر است.

فهرست

مقدمه	۹
-------	---

فصل اول

الایزا	۱۲
مراحل الایزا	۱۴
وسایل و تجهیزات جهت انجام روش الایزا، عبارتند از	۱۷
الف- کیت الایزا که خود متشکل از موارد ذیل است	۱۷
دستگاه تکان دهنده الایزا	۱۹
دستگاه شستشودهنده الایزا	۲۰
خوانش گر الایزا	۲۱
هدف اصلی در سنجش های الایزا	۲۵
نوع نمونه اولیه در الایزا	۲۶
سیستم های آنزیمی الایزا	۲۷
میزان اتوماسیون در الایزا	۲۷
انواع شستشوی چاهک ها	۲۸
ساختار اولیه چاک های الایزا	۲۹
مهم ترین مسائل در زمینه بهینه سازی الایزا	۳۰
انواع واکنش های الایزا بر اساس نوع آنالیت نشان دار	۳۰
مزایای روش IEMA نسبت به EIA	۳۳
تعریف نهایی روش الایزا	۳۶
الایزای همگن (هموژنوس)	۳۶
الایزای ناهمگن (هتروژنوس)	۳۷
انواع الایزا	۳۷
روش مستقیم (DIRECT)	۳۷
معایب الایزای مستقیم	۳۹

۴۰	 روش غیرمستقیم (INDIRECT)
۴۲	 افزایش حساسیت در روش غیرمستقیم
۴۲	 بیوتین یا ویتامین B7
۴۳	 اویدین
۴۳	 کمپلکس اویدین - بیوتین
۴۳	 مزایای استفاده از کمپلکس اویدین - بیوتین
۴۴	 روش ساندویچ
۴۸	 کاربرد روش ساندویچ
۴۸	 الایزا رقابتی
۵۰	 کاربرد الایزا رقابتی
۵۱	 الایزای مهار رقابتی

فصل دوم

۵۴	 پلیت الایزا
۵۴	 ساختار پلی استایرن
۵۵	 پلیت با قدرت اتصال ضعیف و یا متوسط (LOW AND MEDIUM BINDING)
۵۶	 پلیت با قدرت اتصال بالا (HIGH BINDING)
۵۸	 سطوح بدون قدرت اتصال
۵۸	 پلی استارین با قابلیت اتصال کووالانسی
۵۹	 نیروهای شرکت کننده در اتصال پروتئین به کف پلیت الایزا
۶۰	 ویژگی های فیزیکی
۶۰	 مهم ترین ویژگی های فیزیکی
۶۰	 اندازه چاهک ها
۶۲	 شکل چاک ها
۶۵	 رنگ پلیت
۶۶	 نقش تغییرات دما

انتخاب فرمت مناسب جهت الایزا	۶۷
۱) کمی یا کیفی بودن تست	۶۷
۲) نوع آنالیت مورد مطالعه	۶۷
۲- چه آنالیتی قرار است مورد سنجش قرار گیرد؟	۶۸
تشخیص کوچک مولکول‌های (SMALL MOLECULES)	۶۹
۳- انتخاب کمی یا کیفی بودن اندازه‌گیری	۷۱
۴- تعیین میزان حساسیت مورد انتظار	۷۲
اتصال پروتئین (آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی) به کف پلیت الایزا (COATING)	۷۳
مقدار پروتئین	۷۳
نوع پروتئین	۷۳
نوع بافر	۷۴
PH	۷۴
دما و زمان	۷۴
درجه خلوص	۷۵
حذف واکنش‌های غیراختصاصی (BLOCKING)	۷۵
انواع بلاکرها	۷۵
دترجنت‌های یونی	۷۵
بلاک‌کننده‌های پروتئینی	۷۶
انواع بلاکرها پروتئینی	۷۶
ذخیره پلیت‌های کوت‌شده	۷۷
شستشو	۷۸
بافر شستشو	۷۹
انواع بافر شستشو	۸۰
آنتی‌بادی	۸۰
شکل آنتی‌بادی	۸۱
خلوص آنتی‌بادی	۸۱

۸۱	 روش‌های خالص‌سازی آنتی‌بادی
۸۳	 واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌ها
۸۴	 مولکول‌های شناساگر
۸۴	 Horseradish peroxidase (HRP) آنزیم
۸۵	 سوسترای HRP
۸۶	 آنزیم آلکالین فسفاتاز (AP)
۸۶	 سوسترای AP

فصل سوم

۹۰	 اساس تکنیک الایزا به اختصار
۹۱	 پلیت ۹۶ خان‌های کوتاه شده با آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی
۹۱	 محلول رقیق‌کننده
۹۱	 کنترل
۹۲	 کونژوگه
۹۲	 سوستر
۹۲	 محلول شستشو
۹۲	 محلول متوقف‌کننده واکنش
۹۳	 تجهیزات مورد استفاده در تکنیک الایزا
۹۳	 سمپلر
۹۳	 دستگاه شستشو
۹۴	 خوانشگرها (ELISA READER)
۹۴	 سایر تجهیزات
۹۴	 نگهداری و کالیبراسیون تجهیزات
۹۵	 آماده‌سازی محلول‌ها
۹۷	 آماده‌سازی نمونه
۹۷	 نمونه خون

۹۷	 نمونه سرم
۹۸	 شیر
۹۸	 عصاره گوشت
۹۹	 ذخیره سازی نمونه
۹۹	 انتخاب، نگهداری و کالیبراسیون تجهیزات
۱۰۰	 انتخاب پیپت
۱۰۰	 انواع روش های PIPETTING
۱۰۰	 روش Forward
۱۰۱	 روش Reverse
۱۰۲	 روش Pre – wetting
۱۰۲	 روش Co – WASHING
۱۰۳	 مواردی که باید در زمان Pipetting به آن ها توجه داشت
۱۰۵	 دستگاه تکان دهنده (SHAKER)
۱۰۵	 شستشو
۱۰۵	 شستشوی خودکار و نیمه خودکار
۱۰۶	 روش شستشوی دستی
۱۰۷	 خواندن نتایج PLATE READER
۱۰۹	 رسم نمودار استاندارد و تعیین غلظت
۱۰۹	 تأثیر سرعت عمل بر کیفیت تکنیک الایزا
۱۰۹	 تأثیر رطوبت و جریان هوا بر کیفیت تکنیک الایزا
۱۱۲	 خطا (TROUBLESHOOTING) در سیستم الایزا

به نام آفریننده قلم

مقدمه مؤلفان

تکنیک الایزا از جمله روش‌هایی است که به‌طور گسترده در زمینه تحقیق و تشخیص‌های بالینی به‌کار می‌رود. کارایی، دقت بسیار بالا و حساسیت روش الایزا در زمینه سنجش متابولیت‌ها، جایگاه منحصر به فردی در علوم زیستی به این روش بخشیده است. با توجه به عدم وجود منابع عملی فارسی در زمینه تکنیک الایزا، تلاش کرده‌ایم تا اطلاعات و تجارب موجود در غالب یک مجموعه منظم، تدوین و در دسترس علاقه‌مندان قرار گیرد.

کتاب پیش‌رو حاصل تلاش جمعی از اساتید و دانشجویان دانشگاه‌های علوم پزشکی کشور می‌باشد که به بحث در مورد تکنیک آزمایشگاهی الایزا می‌پردازد. با توجه به افزایش روزافزون شاخص‌های مورد سنجش توسط آزمایشگاه‌های بالینی کشور و لزوم بومی‌سازی روش‌های تشخیصی، وجود یک منبع کاربردی در این زمینه، ضروری به‌نظر می‌رسد. امید است مطالب این کتاب برای پژوهش‌گران و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی سراسر کشور مفید واقع شود.

لازم به ذکر است مجموعه پیش‌رو توسط دانشگاه شهید صدوقی یزد مورد بازبینی قرار گرفته و با حمایت‌های مالی این دانشگاه به مرحله چاپ رسیده است.

مقدمه

پیش از پیدایش تکنیک الایزا، تنها روش برای انجام سنجش ایمنی، ایمنی‌سنجی رادیویی بود، که از آنتی‌ژن^۱ و آنتی‌بادی‌هایی^۲ که به صورت رادیواکتیو ممیز شده بودند استفاده می‌شد. تئوری روش ایمنی‌سنجی رادیویی اولین بار در سال ۱۹۶۰ توسط Rosalyn Sussman Yalow و Solomon Berson مطرح شد. از آنجایی که رادیواکتیویته خطرات زیستی زیادی داشت، پیشنهاد امن‌تر و ایمن‌تری مبنی بر جایگزینی سیگنال‌های غیررادیواکتیو به جای سیگنال‌های رادیواکتیو ارائه و از یک آنزیم مشخص مانند پراکسیداز که می‌تواند با زیر لایه مناسب واکنش دهد و منجر به تغییر رنگ و ایجاد سیگنال شود استفاده شد. در سال ۱۹۶۶ توسط Wide و Porath این روش تکمیل‌تر شد و نهایتاً در سال ۱۹۷۱ Eva Engvall و Peter Perlmann به روش الایزا امروزی دست پیدا کردند.

الایزا امروزی مزایای زیادی نسبت به روش‌های ایمنی‌سنجی رادیویی دارد. از جمله عدم وجود خطر تشعشع، امکان اتوماسیون، امکان افزایش حساسیت روش، عمر طولانی کیت‌های آنزیمی، سرعت خوانش بالا و قیمت ارزان‌تر دستگاه‌ها و معرف‌ها. از مزیت دیگر این تکنیک عبارتند از: آسان بودن، صحت بالا، ارزان بودن و در دسترس بودن آن می‌باشد.

الایزا یک روش آزمایشگاهی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به طور همزمان فراهم می‌نماید. از تکنیک الایزا به عنوان ابزاری تشخیصی در پزشکی، پاتولوژی و همچنین تست کنترل کیفیت در بسیاری از صنایع استفاده می‌شود.

1. antigene

2. antibodies

با وجود تمام ویژگی‌های مثبت تکنیک الایزا از جمله اینکه وجود یا عدم وجود یک آنالیت و مقدار آن را نشان می‌دهد، اطلاعاتی از ویژگی‌های بیوشیمیایی یک ملکول مانند وزن مولکولی و نوع توزیع آن ملکول را در بافت مشخص نمی‌کند. برای به دست آوردن چنین اطلاعاتی می‌توان از روش‌هایی مانند بلاتیگ، ایمونوهیستوشیمی و... استفاده کرد.

این تکنیک به منظور پی بردن به آنتی‌ژن ناشی از وجود یک میکروارگانیسم عفونی در بدن یا ترکیبات بیگانه‌ای که معرف برخی از بیماری‌ها هستند به کار می‌رود. همچنین آنتی‌بادی‌هایی که در پاسخ به برخی عفونت‌ها یا بیماری‌ها به وجود آمده نیز توسط این تست قابل تشخیص هستند. تکنیک الایزا اولین آزمایش غربال‌گری برای بیماری ایدز است. علاوه بر بیماری ایدز از الایزا برای تشخیص بیماری‌هایی مانند هیپاتیت، تب استخوان شکن، عفونت انگلی، تبخال، سرخچه و دیگر عفونت‌های ویروسی و باکتریایی استفاده می‌شود. این تکنیک در ایمونولوژی (ایمنی‌شناسی) کارایی بسیار بالایی دارد. امروزه الایزا یکی از قدرتمندترین روش‌های آزمایشگاهی برای پی بردن به اختلالات سیستم ایمنی است.

فصل اول

الایزا:



الایزا مخفف عبارت Enzyme-Linked Immunosorbent Assay یک روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت هم‌زمان فراهم می‌کند. این روش در ایمنولوژی (ایمنی شناسی) برای تشخیص وجود یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن در نمونه مورد آزمایش استفاده می‌شود که عموماً به عنوان ابزاری تشخیصی در پزشکی و پاتولوژی و همچنین تست کنترل کیفیت در بسیاری از صنایع کاربرد دارد.



الایزا بر پایه اندازه‌گیری کمپلکس رنگی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی استوار است. به این ترتیب که نمونه مورد آزمایش با مقدار نامشخصی آنتی‌ژن روی فاز جامد (معمولاً پلیت پلی‌استیرن) ریخته می‌شود، سپس آنتی‌بادی ثانویه اضافه می‌شود تا با آنتی‌ژن واکنش داده و ترکیبی ایجاد کند. آنتی‌بادی ثانویه با آنزیم پیوندی کووالانسی برقرار می‌کند. بین هر مرحله، پلیت با محلول پاک‌کننده شسته می‌شود تا هر پروتئین یا آنتی‌بادی

اضافه در محیط خارج شود. پیش از آخرین مرحله شستشو، پلیت با اضافه کردن زیر لایه آنزیمی کشت داده می‌شود و ماده رنگی تولید می‌شود. طول موج رنگ به دست آمده توسط یک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و ثبت می‌شود که این طول موج معرف حضور یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن و نیز غلظت آن است. در الایزاهای قدیمی‌تر سوبسترا رنگ‌زا به کار گرفته می‌شد درحالی‌که در تست‌های جدیدتر سوبستراهای فلوروزنیک با حساسیت بسیار بالاتر مورد استفاده قرار می‌گیرند.

امروزه الایزا یکی از قدرتمندترین روش‌های آزمایشگاهی برای پی بردن به اختلالات سیستم ایمنی است، این تست به منظور پی بردن به آنتی‌ژن ناشی از ارگاناسم عفونی در بدن یا مواد غیر نرمالی که معرف برخی بیماری‌ها هستند انجام می‌شود. همچنین آنتی‌بادی‌هایی که در پاسخ به برخی عفونت‌ها یا بیماری‌ها به وجود آمده نیز توسط این تست قابل تشخیص هستند. به عنوان مثال آزمون الایزا اولین آزمایش متداول در غربال‌گری HIV است. در تست الایزا سرم فرد ۴۰۰ بار رقیق شده و به صفحه ای که حاوی آنتی‌ژن HIV است اضافه می‌شود. اگر آنتی‌بادی HIV در سرم وجود داشته باشد، به این آنتی‌ژن‌های HIV می‌چسبد. سپس به منظور از بین بردن دیگر اجزا سرم، پلیت شستشو داده می‌شود. یک "آنتی‌بادی ثانویه" به پلیت اضافه می‌شود. این آنتی‌بادی ثانویه به صورت شیمیایی به آنزیم از پیش تهیه شده می‌چسبد. این بار نیز زیر لایه‌ای مناسبی برای آنزیم اعمال شده و توسط آنزیم کاتالیز می‌شود که منجر به تغییر رنگ می‌شود.

تست الایزا با روش‌های گوناگونی انجام می‌شود که به صورت کلی به دو دسته الایزا مستقیم و غیرمستقیم تقسیم‌بندی می‌شود. در روش مستقیم آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد

نظر به‌طور مستقیم بر سطح فاز جامد پوشش داده می‌شود و سپس آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن مکمل نشاندار شده آن به سیستم اضافه می‌شود. با آنالیز سیگنال تولید شده می‌توان پی به وجود آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر در نمونه برد. این روش ارزش تشخیصی چندانی نداشته و بیشتر کاربرد تحقیقاتی دارد.

در روش غیرمستقیم سرم رقیق شده به آنتی‌ژن‌های پوشش داده شده در فاز جامد اضافه می‌شود، سپس نمونه را به آن اضافه کرده و پس از گذشت زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو، آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می‌شود. این روش برای تعیین آنتی‌بادی اختصاصی یا تیتراسیون آنتی‌بادی در سرم استفاده می‌شود.

روش‌های الایزا ساندویچ و الایزا رقابتی یا مهارتی از دیگر انواع متداول این تکنیک هستند. روش ساندویچ که متداول‌ترین روش الایزا است، یک آنتی‌ژن در بین دو آنتی‌بادی اختصاصی قرار می‌گیرد. روش‌های رقابتی نیز بر پایه رقابت دو آنتی‌ژن یا دو آنتی‌بادی برای اتصال لیگاند با مقدار محدود استوار است. اگر اضافه کردن هر دو آنالیت به سیستم همزمان انجام شود، روش را رقابتی می‌نامند ولی چنانچه ابتدا آنالیت اضافه شده و پس از یک دوره زمانی انکوباسیون آنالیت نشاندار اضافه گردد روش را مهارتی می‌نامند. تمامی روش‌های فوق در فصل بعدی به تفصیل توضیح داده می‌شوند.

مراحل الایزا:



مراحل انجام یک آزمون الایزا که تقریباً در تمام انواع آن مشترک است عبارتند از:



۱. پوشش‌دهی^۱، که به معنی جذب یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی با سطوح جامد است.
 ۲. اضافه کردن نمونه‌های مورد آزمایش.
 ۳. گذشت مدت زمان کافی برای انجام واکنش که به اصطلاح انکوباسیون واکنش‌گرها نامیده می‌شود.
 ۴. انجام عمل شستشو توسط روش دستی و یا دستگاه شستشو دهنده^۲ الایزا، به منظور جدا کردن واکنش‌گرهای متصل شده و واکنش داده از واکنش‌گرهای آزاد و متصل نشده.
 ۵. اضافه کردن عوامل لینک شده با آنزیم.
 ۶. مجدداً طی مدت زمان انکوباسیون برای واکنش‌گرها.
 ۷. شستشوی مجدد پلیت الایزا .
 ۸. افزودن سوبسترا آنزیم جهت تشخیص واکنش دهنده‌ها.
 ۹. طی زمان انکوباسیون.
 ۱۰. اتمام واکنش آنزیمی توسط متوقف‌کننده‌ها^۳
 ۱۱. خوانش دانسیته نوری به دست آمده توسط خواننده الایزا
- برای انجام تست الایزا باید نمونه خون از بیمار گرفته شود و سرم آن جدا شود. برای این کار باید به مواردی دقت داشت. مثلاً از بستن گارو برای مدتی طولانی باید اجتناب کرد

1. Coating

2. Washer

3. Stop solution

فصل دوم

پلیت الایزا:



جنس پلیت‌های الایزا پلی‌استرین و یا مشتقات آن می‌باشد. این پلیت‌ها حاوی ۹۶ چاهک هستند (۸ ردیف و ۱۲ ستون). هر چاهک مساحتی در حدود $2/5$ سانیمتر مربع دارد، که تقریباً 350 میکرولیتر محلول را در خود جای می‌دهد. امروزه پلیت‌های محتوی 384 و 1536 چاهک نیز ساخته و مورد استفاده قرار می‌گیرد. امروزه پلیت‌هایی ساخته شده که بین کف پلیت و دیواره‌ها زاویه 90° درجه دارد، این زاویه امکان شستشوی بهتر را فراهم می‌نماید. همچنین گزارش شده که این پلیت‌ها می‌توانند جذب آنتی‌بادی را در مرحله اتصال آنتی‌بادی به کف پلیت (Coating) 10° الی 20° درصد افزایش دهند.

در الایزا همانطور که اشاره شد بیشتر از پلیت‌های پلی‌استرین استفاده می‌شود. این پلیت‌ها هم در روش‌های دستی و هم در روش‌های اتوماتیک قابل استفاده‌اند. به کمک خاصیت ذاتی بیومولکول‌ها یعنی اتصالات غیرفعال، می‌توان این مولکول‌ها را به پلی استایرن متصل نمود. البته قدرت اتصال غیرفعال به ویژگی‌های مولکولی آنالیت از جمله اندازه، شارژ الکتریکی، وزن مولکولی و ... بستگی دارد.

ساختار پلی‌استایرن:



پلی‌استایرن یک زنجیره طولانی کربن دارد، که در هر زنجیره روی یک کربن یک بنزن قرار می‌گیرد. ساختار پلی‌استایرن آن را به یک ماده هیدروفوبیک تبدیل کرده است. اگر پلی‌استایرن دستکاری نشود، هیدروفوبیسیته خود را در ته چاهک حفظ می‌نماید. اما پلی‌استایرن به راحتی می‌تواند توسط اشعه و سایر تکنیک‌ها دستکاری شود. حلقه

فصل سوم

اساس تکنیک الایزا به اختصار:



۱. مرحله اتصال آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی به کف پلیت الایزا (coating)
۲. حذف مکان‌های غیر اختصاصی (blocking)
۳. اضافه نمودن نمونه بیمار محتوی آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی مورد سنجش به کف پلیت الایزا
۴. شستشو و خارج نمودن آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی های اتصال نیافته (Washing)
۵. اگر در مرحله اول به دنبال تعیین غلظت آنتی‌ژن باشیم در این مرحله آنتی‌بادی نشان‌دار به آنزیم برعلیه اپی‌توپ دیگری از همان آنتی‌ژن اضافه می‌گردد و اگر غلظت آنتی‌بادی را در نمونه بیمار بررسی می‌کنیم در این گام آنتی‌بادی نشان‌دار برعلیه آنتی‌بادی اتصال یافته موجود در سرم بیمار اضافه می‌گردد.
۶. شستشو و خارج نمودن آنتی‌بادی ثانویه (کونژوگه به آنزیم) اتصال نیافته
۷. اضافه کردن سوبسترا با در نظر گرفتن آنزیمی که به آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده است.
۸. شستشو
۹. ختم واکنش با اسید سولفوریک
۱۰. خواندن نتایج با دستگاه ELISA plate reader
۱۱. رسم نمودار استاندارد و تعیین غلظت نمونه

