



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Факультет экологической медицины
Кафедра иммунологии

ИММУНОЛОГИЯ

Лабораторный практикум для студентов 3 курса
1-80 02 01 Медико-биологическое дело
1-33 01 05 Медицинская экология
1-33 01 01 Биоэкология

Минск
2016

УДК 502.502.3(075)

ББК 20.18я73+65.28я73

Рекомендовано к изданию Научно-методическим советом МГЭУ им. А. Д. Сахарова
(протокол № 9 от 19 мая 2015 г.)

Авторы-составители:

канд. мед. наук, зав. кафедрой иммунологии, доцент *М. М. Зафранская*;
канд. мед. наук, доц. кафедры иммунологии *Т. Р. Романовская*;
старш. препод. кафедры иммунологии *И. В. Коктыш*;
старш. препод. кафедры иммунологии *Я. И. Мельникова*;
препод. кафедры иммунологии *Т. В. Кондратович*

Рецензенты:

д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГУО
БелМАПО *В. С. Камышиников*;
канд. мед. наук, доц., доц. кафедры экологической медицины и радиобиологии
МГЭУ им. А. Д. Сахарова *И. П. Меркулова*

Иммунология: лабораторный практикум для студентов 3 курса специальностей 1-80 02 01 «Медико-биологическое дело», 1-33 01 05 «Медицинская экология», 1-33 01 01 «Биоэкология» / авт.-сост. *М. М. Зафранская, Т. Р. Романовская, И. В. Коктыш, Я. И. Мельникова, Т. В. Кондратович.* – Минск: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2016. – 88 с.

ISBN 978-985-551-037.

Лабораторный практикум предназначен для проведения лабораторных занятий по курсу «Иммунология» для студентов факультета экологической медицины. Практикум включает теоретический материал и указания для осуществления заданий согласно теме занятий.

УДК 502.502.3(075)

ББК 20.18я73+65.28я73

ISBN 978-985-551-037

© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2016

Список сокращений

ANA	antinuclear antibodies (антиядерные аутоантитела)
CD	cluster of designation
CR2	Complement receptor type 2 (рецептор к комплементу 2-го типа)
EBV	Epstein-Barr virus (вирус Эпштейна-Барр)
FITC	fluorescein isothiocyanate (изотиоционат флуоросцеин)
HLA	human leucocyte antigens (антигены лейкоцитов человека)
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид)
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (молекула клеточной адгезии)
IgA	immunoglobulin A (иммуноглобулин класса А)
IgD	immunoglobulin D (иммуноглобулин класса D)
IgE	immunoglobulin E (иммуноглобулин класса E)
IgG	immunoglobulin G (иммуноглобулин класса G)
IgM	immunoglobulin M (иммуноглобулин класса M)
LT	leukotrienes (лейкотриены)
MAST- CLA	Multiple allergosorbentny test using chemiluminescence analysis (множественный аллергосорбентный тест с применением хемилюминесцентного анализа)
N-CAM	neural cell adhesion molecule (нейрональная молекула клеточной адгезии)
НК- лимфоциты	natural killer (естественные киллеры)
PBS	phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)
PWM	митоген фитолакки
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (среда для культур клеток и тканей)
TCR	T-cell receptor (Т-клеточный рецептор)
TGFβ	transforming growth factor beta (трансформирующий ростовой фактор бета)
Аг	антиген
АДА	аденозиндезаминаза
АИЗ	аутоиммунные заболевания
Ат	антитело
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
дцДНК	двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАС	комплекс «эритроцит - антитело - комплемент»
Е-РОК	розеткообразующая клетка (Е - эритроцит)
ИДС	иммунодефицитное состояние
ИК	иммунного комплекса
ИЛ	интерлейкин
ИП	индекс пролиферации
ИФА	иммуноферментный анализ
ИХА	иммунохимический анализ
Кг-Е	конъюгат с ферментом

КЕ	калибровочная единица
ЛПС	липолисахариды
МАСТ	множественный аллергосорбентный тест
МКАТ	моноклональные антитела
МНС	main histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид
ОВИН	общая вариабельная иммунологическая недостаточность
ОП	оптическая плотность
оцДНК	одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
ПИД	первичные иммунодефициты
ПНФ	пурипнуклеотидфосфорилаза
ППС	полной питательной среда
РА	реакции агглютинации
РИА	радиоиммунный анализ
РИФ	реакция иммунофлуоресценции
РНК	рибонуклеиновая кислота
РПГА	реакция пассивной гемагглютинации
РПН	реакция повреждения нейтрофилов
РСК	реакция связывания комплемента
РТМЛ	реакция торможения миграции лейкоцитов крови
РФ	ревматоидный фактор
СЗСТ	системные заболевания соединительной ткани
СН50	complement hemolytic activity (количество комплемента, которое будет лизировать 50% эритроцитов, сенсублизированных антителами к ним)
СПИД	синдром приобретенного иммунодефицита
ТКИН	тяжелая комбинированная иммунологическая недостаточность
ФГА	фитогемагглютинин
ФП	фагоцитарный показатель
ФЧ	фагоцитарное число
ФЭК	фотоэлектроколориметр
ЦАСК-тест	цитометрический аллергенстимулирующий клеточный тест
ЦИК	циркулирующие иммунные комплексы
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

Лабораторное занятие № 1

Введение в иммунологические исследования: основные процедуры иммунологического исследования

Цель работы: освоить базовые методики и процедуры, применяемые при исследовании в области иммунологии.

Оборудование, приборы, принадлежности: центрифуга, термостат, холодильник, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, микроскоп, механический счётчик клеток, 24-часовая культура *S.aureus*, лабораторные пробирки, камера для фиксирования мазков крови, предметные стёкла, иммерсионное масло, краситель Романовского-Гимзы, смесь Никифорова, изотонический раствор NaCl, образцы крови, эритроциты барана.

I. Теоретическая часть

Проведение любых лабораторных процедур предполагает использование специального оснащения, включая лабораторную посуду, лабораторный инструментарий и лабораторное оборудование.

В иммунологических лабораториях используют широкий спектр лабораторной посуды.



Рисунок 1.1 – Виды пробирок для лабораторных исследований: слева – химические пробирки, справа – центрифужные пробирки (конические)

Для отбора, хранения, центрифугирования биологических образцов, а также проведения иммунологических и биохимических реакций используются:

А) стеклянные или пластиковые пробирки объемом от 5 до 15 мл (рис. 1.1). Пробирки могут быть с круглым или плоским дном, круглого диаметра или конические по форме, иметь специальные крышки. Каждый вид

таких пробирок имеет специальные характеристики, требуемые особенностями протокола выполняемой реакции или исследования. Например, при работе с клетками применяют пробирки из материалов, предотвращающих адгезию клеток, либо обрабатывают стеклянные пробирки силиконом. Все пробирки устанавливают в штатив, подходящего размера и с определённым количеством мест для пробирок (рис. 1.2).



Рисунок 1.2 – Виды штативов для установки пробирок

Данные виды пробирок широко применяются для забора первичных биологических образцов жидкости (кровь, лимфа), используются для всех видов иммунологического анализа, пригодны для хранения проб при пониженных температурах, пригодны для кипячения и автоклавирования, используются для центрифугирования.

Б) пластиковые или стеклянные пробирки для микроанализа объемом от 0,5 до 2 мл. Пробирки этого типа могут быть с круглым, плоским или острым дном и иметь специальные крышки (рис. 1.3).



Рисунок 1.3 – Виды пробирок для микроанализа

Эти пробирки применяются для всех видов иммунологического анализа, для хранения проб при пониженных и отрицательных температурах. Их можно подвергать автоклавированию (для стерилизации), помещённый в них биологический материал можно центрифугировать в специальных центрифугах.



Рисунок 1.4 – Полистироловые планшеты (слева) и стрипы (справа)

В) полистироловые планшеты для микроанализа с круглодонными или плоскодонными лунками (рис. 1.4). Объем лунок составляет 250–300 мкл, планшеты изготавливаются из специального полистирола, обладающего повышенной адсорбционной способностью для фиксирования на поверхности лунок клеток или белковых компонентов иммунохимических систем. Стандартный полистироловый планшет состоит из 96 лунок, расположенных горизонтальными рядами. Лунки имеют буквенную и цифровую нумерацию по горизонтали и вертикали соответственно. Полистироловые планшеты используются для проведения иммунохимического анализа (например, ИФА), а также для клеточных иммунологических тестов.

Кроме 96-луночных планшетов применяют и стрипы. Они представляют собой вариант полистиролового планшета, в котором каждый ряд ячеек фиксируется отдельно на планшетной рамке и анализ может проводиться в небольшом количестве лунок.

Для точного дозирования объемов биологических жидкостей, химических реактивов и компонентов иммунологических тест систем используются:

А) пипетки мерные стеклянные на полный слив предназначены для отмеривания точного объема жидкости, верхняя отметка соответствует номинальной вместимости, прямые и с расширением. Минимальный точно отмеряемый объем – в пределах 1 мл (рис. 1.5, слева). Пипетки мерные пластиковые с расширением и без также предназначены для точной дозировки компонентов реакционной смеси (рис. 1.5, справа). Минимальный точно отмеряемый объем – в пределах 1 мл.

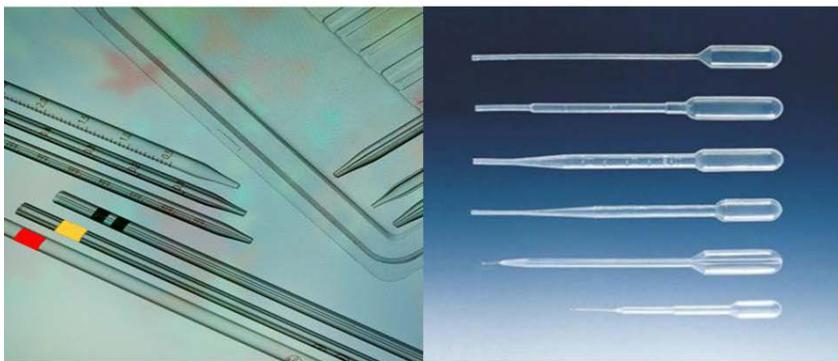


Рисунок 1.5 – Мерные пипетки

Б) для точного дозирования малых (и не только) объемов используются полуавтоматические и автоматические дозирующие устройства – пипетки с фиксированным или переменным объемом (рис. 1.6). Минимальный точно отмеряемый объем – в пределах 1 мкл.



Рисунок 1.6 – Автоматические одноканальная (слева) и многоканальная (справа) пипетки (дозаторы) переменного объема с полистироловыми наконечниками

Данные пипетки могут быть одно- и многоканальными, а также иметь электронный блок управления. Пипетки (дозаторы) снабжаются сменными полистироловыми наконечниками.

При работе с автоматической пипеткой необходимо соблюдать следующие правила:

- пластиковый наконечник необходимо плотно зафиксировать на держателе автоматической пипетки;

- во время работы пипетка должна находиться постоянно в вертикальном положении;

- после набора жидкости в наконечник автоматической пипетки категорически запрещается переводить пипетку в горизонтальное положение или оставлять ее на столе;

- при внесении первого компонента иммунохимической реакции в пробирку или в лунку полистиролового планшета наконечник пипетки должен касаться дна пробирки или лунки;

- при внесении каждого последующего компонента иммунохимической реакции в пробирку или в лунку полистиролового планшета наконечник пипетки должен касаться стенки пробирки или лунки над поверхностью жидкости;

- освобождение жидкости из пипетки осуществляется плавным нажатием на поршень до ощутимого упора.

Иммунологические методы исследования являются составной частью общелабораторного дела. Проведение иммунологических методов исследования предполагает владение и использование таких процедур, как взвешивание на разных видах весов, приготовление растворов, расчёт концентраций и массовых объёмов при приготовлении растворов, определение рН растворов, доведение рН приготовленного раствора до необходимого уровня, центрифугирование и многое другое.

Но, кроме общелабораторных, в области иммунологии применяются и специализированные процедуры, без освоения которых невозможно проведение ни одного метода и методики иммунологического исследования.

Эти процедуры охватывают этапы предварительной подготовки исследуемого материала собственно к исследованию и промежуточные процедуры.

Для иммунологического исследования чаще всего используется периферическая кровь. Кроме неё, иммунологическому исследованию могут подвергаться самые разные секреты и экскреты организма человека, биоптаты из разных тканей, отделяемые из ран. Но по приемлемости и уровню информативности полученных результатов исследование крови занимает первую позицию.

При иммунологическом исследовании крови изучению подвергают как клетки, так и молекулы, то есть исследуют отдельно клеточную часть крови и её гуморальную фракцию.

Для обеспечения возможности исследования клеточной части крови и её гуморальной фракции взятие крови осуществляют в 2 пробирки: в сухую, стерильную и химически чистую пробирку помещают порцию крови, которая предназначена для получения сыворотки крови. В стерильную, химически чистую пробирку с антикоагулянтом (гепарином, калиевой или натриевой солью ЭДТА) помещают порцию крови, которая не свернётся, и клетки останутся доступными для исследования.

Обычно для иммунологического исследования у человека забирают 10 мл крови: 5 мл для получения сыворотки крови и 5 мл для возможности исследования клеток. Объём забираемой крови может быть увеличен, но нужно помнить о том, что кроме иммунологического исследования, обследуемый человек нуждается и в других анализах, которые также проводятся с использованием крови.

Кровь для исследования забирается путём пункции локтевой вены, обычно натощак, утром. При необходимости кровь для иммунологического исследования забирается и в другое время суток.

Полученную кровь (2 пробирки – для получения сыворотки крови и для исследования клеток) подвергают процедурам предварительной обработки (предобработки):

- 1) кровь инкубируют для последующего отделения сыворотки крови;
- 2) в образце крови определяют количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Эта информация необходима для дальнейших исследований, она составляет предмет обычного гематологического анализа (или анализа крови), но может быть проведена и самостоятельно в рамках подготовки образца крови для иммунологического исследования. В этом случае речь идёт об определении концентрации клеток (например, лимфоцитов или нейтрофилов) в подготавливаемой к исследованию суспензии и об определении клеточного состава образца суспензии по морфологии клеток;
- 3) образец крови с антикоагулянтом подвергают разделению на фракции на градиенте плотности или другим способом.

Процедура получения сыворотки крови

Кровь в количестве 5 мл, помещенную в стерильную, химически чистую, сухую пробирку, оставляют на 2 часа при комнатной температуре для свертывания. Затем стеклянной палочкой отделяют сгусток от стенок пробирки и помещают пробирку на 1 час в холодильник (+4°C), центрифугируют 10–15 мин при 1500 об/мин. Сыворотку отбирают в стерильную пробирку. При необходимости образец сыворотки крови сохраняют в течение 2–3-х месяцев в замороженном состоянии (–18 ... –20 °C). Размораживать образец можно только однократно, поэтому сыворотку одного обследуемого индивида замораживают в несколько порций, используя пластиковые микропробирки на 1,5 мл или меньшего объёма. В сыворотке крови определяют концентрацию иммуноглобулинов и антигенспецифических антител, концентрацию и функциональную активность системы комплемента, концентрацию других иммуноактивных молекул.

Процедура определения количества клеток в исследуемом материале

Процедура определения концентрации лейкоцитов в периферической крови необходима при проведении любой реакции и любого метода с использованием клеток, подвергаемых изучению. Так как образцы клеток огра-

ничены по численности клеток и объёму имеющегося материала, то применяется рутинный подсчёт количества клеток в счётной камере Горяева.

Принцип процедуры заключается в разведении клеточной суспензии значительным объёмом солевого буферного раствора, что снижает концентрацию клеток в суспензии, упрощая их микроскопическую визуализацию при достаточном уровне точности. При определении количества лейкоцитов в крови вместо солевого буферного раствора используют 3–5%-ную уксусную кислоту с добавлением метиленового синего для лизиса эритроцитов, мешающих визуализации лейкоцитов и контрастирования лейкоцитов в поле зрения.

Камера Горяева представляет собой специальное стекло (рис. 1.7), в углублении которого (0,1 мм) нанесена сетка с большими и малыми квадратами строго определенного размера (рис. 1.8).

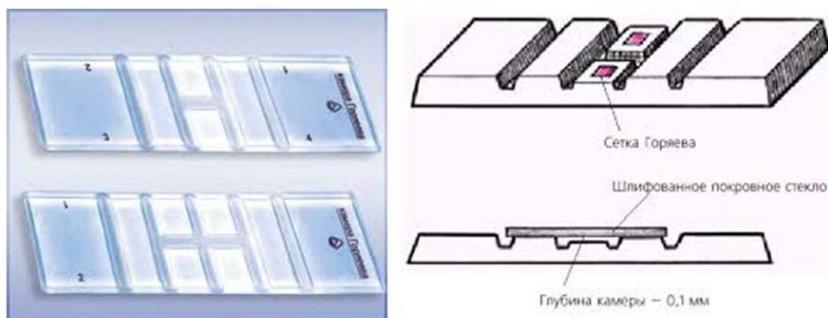


Рисунок 1.7 – Камера Горяева для подсчёта клеток: слева – общий вид, справа – устройство камеры и камера в собранном виде

Сетка камеры Горяева изготавливается специальным путём и представляет собой ряд перекрещивающихся линий, образующих большие и малые квадраты (рис. 1.8). Большие квадраты используют для определения количества лейкоцитов, лимфоцитов, а малые – для определения количества эритроцитов, тромбоцитов. Всего в камере Горяева 100 больших квадратов, которые собраны по 4 в группы, располагающиеся по 5 штук по вертикали и горизонтали.

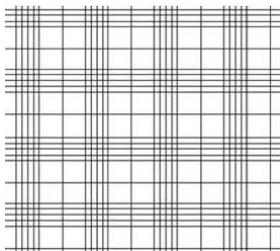


Рисунок 1.8 – Сетка камеры Горяева

Перед работой камеру Горяева тщательно протирают сухой салфеткой и притирают к ее поверхности покровное стекло таким образом, чтобы по его краям появились радужные полосы.

Порядок подготовки образца крови для определения их числа (на примере подсчёта лейкоцитов цельной крови)

В химическую пробирку вносят 0,4 мл 3 % уксусной кислоты. Затем в этот объём уксусной кислоты вносят 0,02 мл (20 мкл) периферической крови. Перемешивают, наблюдая за просветлением раствора за счёт разрушения эритроцитов. После этого переходят к заполнению камеры Горяева суспензией лейкоцитов в уксусной кислоте.

Для этого к краю покровного стекла подносят каплю суспензии лейкоцитов пастеровской пипеткой или дозатором (рис. 1.9). Благодаря силам поверхностного натяжения суспензия втягивается в нужном количестве в пространство между камерой Горяева и покровным стеклом. Излишки убирают фильтровальной бумагой.



Рисунок 1.9 – Внесение суспензии клеток в камеру Горяева

Камеру оставляют на горизонтальной поверхности около 1 минуты для оседания клеток крови и затем микроскопируют на малом увеличении светового микроскопа при опущенном конденсоре и прикрытой диафрагме для лучшего контрастирования клеток. Определение **количества лейкоцитов** проводят в 100 больших квадратах, переводя поле зрения микроскопа последовательно по всем группам больших квадратов (рис. 1.10). Часто клетки располагаются по границе больших квадратов. В этом случае принимают причисление клеток только по нижней и левой границам или только по верхней и правой границам.

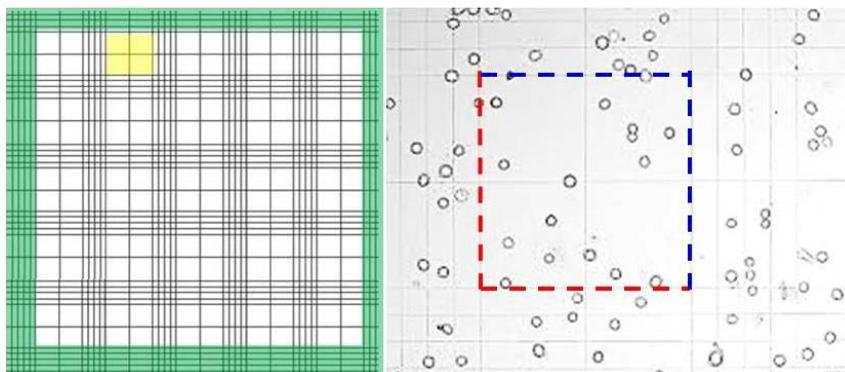


Рисунок 1.10 – Слева: общий вид сетки камеры Горяева на малом увеличении (зелёным показано всё рабочее поле, подлежащее исследованию, жёлтым цветом выделена группа из 4 больших квадратов, в которых и сосчитывают лейкоциты). Справа: лейкоциты в больших квадратах (большое увеличение), показана методика включения лейкоцитов, располагающихся по границе больших квадратов – к сосчитываемым причисляют те клетки, которые располагаются только по нижней и левой границе (красный пунктир) или по верхней и правой границе (синий пунктир)

Обычно определение количества клеток в камере Горяева проводят с использованием клавишного механического счётчика клеток (рис. 1.11, существуют их разные модели). Увиденную клетку регистрируют, делая нажатие на клавишу, при этом прибор фиксирует это нажатие прибавлением 1. В конце исследования всех 100 квадратов достаточно прочесть образованное число на панели счётчика.



Рисунок 1.11 – Некоторые модели механического счётчика клеток крови

Расчет количества лейкоцитов в 1 мкл крови проводят, исходя из разведения крови (20), числа сосчитанных квадратов (100) и объема 1 большого квадрата (1/250 мкл), по следующей формуле:

$$X = (a \times 250 \times 20) / 100 = a \times 50,$$

где a – количество сосчитанных лейкоцитов.

Для определения количества лейкоцитов в 1 мл или в 1 л крови полученный показатель соответственно умножают на 10^3 или 10^6 .

Процедура морфологической идентификации клеток крови в микроскопическом препарате окрашенным стандартным методом

Применяется для оценки степени гомогенности популяционного состава приготавливаемой суспензии клеток. Например, фагоцитоз удобнее изучать на суспензии изолированных нейтрофилов. Промежуточное исследование подготавливаемой суспензии помогает понять качество последующего результата.

В рамках обычного анализа крови эту процедуру используют для определения так называемой лейкоцитарной формулы, то есть выраженного в процентах по каждой популяции лейкоцитов состава.

Для приготовления микроскопического препарата каплю крови наносят на край предметного стекла (сухого и тщательно обезжиренного), плотно прикасаются к ней краем шлифованного стекла – кровь распределяется по его длине. Быстрым движением растягивают кровь по всей поверхности предметного стекла – микроскопический препарат крови готов после высыхания к дальнейшей обработке.

Приготовленный мазок крови высушивают на воздухе и фиксируют, помещая предметное стекло в ёмкость с фиксатором. Фиксация осуществляется спиртами или иными специальными составами, от которых зависит время фиксации. При использовании метанола достаточно 5 минут инкубации, при использовании этанола или смеси Никифорова (этанол : эфир = 1:1) – 15 минут.

Затем мазок помещают в кювету с красителем либо наливают краситель на препарат. В основном для окрашивания мазков крови используют краситель Романовского-Гимзы, азур II-эозин, краситель Май-Грюнвальд. Время окрашивания определяют для каждой серии красителя опытным путем, обычно оно составляет 20–30 минут. После окрашивания мазок промывают водой, просушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют на масляной иммерсии на большом увеличении светового микроскопа.

Микроскопию начинают, отступя 3–5 полей зрения от края мазка и передвигаясь по нему в перпендикулярных направлениях, проходя по 3–5 полей зрения. Для регистрации результатов используют 11-клавишный счетчик клеток (рис. 1.11). Всего подсчитывают не менее 100 лейкоцитов, определяя по счетчику процентное содержание каждой популяции.

При идентификации клеток крови используют морфологические признаки клеток (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Морфологическая характеристика лейкоцитов периферической крови человека

Параметр	Нейтрофилы		Эозинофил	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
	п/я	с/я				
Размер, мкм	10–15	10–15	12–15	8–12	15–20	7–10
Ядро: - форма	узкое, вытянуто в виде палочки	узкое, состоит из 3–5 сегментов	Шире, чем у нейтрофила, состоит из 2–3 сегментов	неопределенное, иногда в виде листа растения	полиморфное, округлое, бобовидное с вдавлениями	округлое или бобовидное
- структура	неравномерная или крупноглыбчатая				равномерная сетчатая	неравномерная крупноглыбчатая
- окраска	тёмно-фиолетовая	фиолетовая		светло-фиолетовая	темно-фиолетовая	
Цитоплазма	розоватая		бледно-розовая		обильная бледно-голубая или сероватая	в виде узкого ободка иногда широкая зона, голубая
Зернистость, ее окраска, характер	обильная, мелкая, светло-фиолетовая		обильная, крупная, розовая	необильная, неравномерная, фиолетовая	непостоянная иногда мелкая, бледно-фиолетовая	изредка единичные фиолетовые гранулы

Процедура разделения крови на фракции клеток на градиенте плотности фиколл-верографин

Градиент плотности – это раствор определенного вещества, имеющего при разной концентрации разную плотность, которая может быть измерена специальным прибором – ареометром, и способные обеспечить оптимальные для клеток условия осмотичности среды.

Градиенты плотности широко применяются в разных областях медико-биологических наук. Так, в биохимии для выделения митохондрий и др. субклеточных органелл применяют градиент из раствора сахарозы, в вирусологии для выделения вирионов – из растворов солей кремния или цезия. В иммунологии наиболее широко применяют растительный полисахарид – фиколл, дополняемый рентгеноконтрастным препаратом верографином (визотрастом и проч.), а также растворы перколла (частицы кремния диаметром 15–30 нм, покрытые поливинил-пирролидоном). Многие фирмы выпускают готовые градиенты плотности с заданными свойствами, либо их можно приготовить из отдельных ингредиентов. При этом рассчитывают необходи-

мое количество порошка градиента, растворяют его в дистиллированной воде, проверяют плотность и при необходимости стерилизуют.

Метод выделения мононуклеаров основан на разной плавучести различных форменных элементов крови. Применение градиента определенной плотности (табл. 1.2) позволяет отделить мононуклеары (лимфоциты, моноциты, бластные клетки) от эритроцитов и гранулоцитов.

Таблица 1.2

Используемые градиенты плотности при выделении клеток человека
(Cell separation methods and applications, edited by D. Recktenwald, 1997)

Тип клеток	Плотность градиента, г/см ³
Лимфоциты (Т- и В-)	1,077
Моноциты	1,064
Гранулоциты	1,093
НК-лимфоциты	1,06
Эритроциты	1,115

В результате центрифугирования суспензии клеток на градиенте плотности, происходит разделение клеток на фракции, схематично представленное на рис. 1.12.

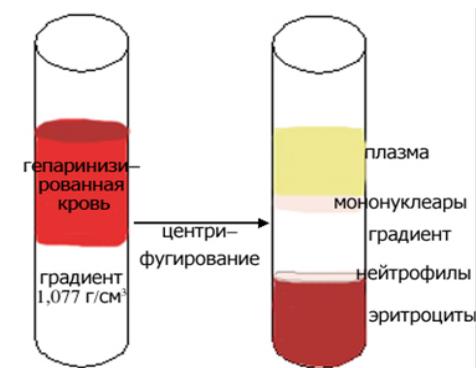


Рисунок 1.12 – Седиментация клеток периферической крови при центрифугировании на градиенте плотности 1,077 г/см³

Разделение клеток крови на градиенте плотности приводит к тому, что каждый тип клеток находится на том или ином месте градиента, откуда нужные клетки можно изъять пастеровской пипеткой или обычным дозатором в отдельную пробирку.

В большинстве ситуаций выделенные клетки требуют процедуры отмывания для избавления от примесей в виде обломков клеток и ненужных

веществ (белки плазмы крови, вещество градиента). После отмывания определяют концентрацию клеток. При необходимости изучают морфологию клеток для понимания степени гомогенности выделенной клеточной популяции.

Процедура отмывания клеток буферным солевым раствором или изотоническим раствором хлорида натрия

В пробирку с отмываемыми клетками добавляют отмывающий буферный раствор (обычно к осадку клеток добавляют 10 мл отмывающего буферного раствора), клетки ресуспендируют последовательным набором жидкости с последующим выпуском назад, избегая появления пузырей, которые повреждают клетки. Затем пробирку с клеточной суспензией подвергают центрифугированию. Режим центрифугирования зависит от вида отмываемых клеток и общего объема отмываемой суспензии. При отмывании эритроцитов применяют центрифугирование при 3000 об./мин в течение 10 минут, при отмывании лимфоцитов – 1500 об./мин в течение 5–7 минут.

После центрифугирования клетки оседают на дне пробирки, образуя клеточный осадок. Сверху располагается супернатант. Он содержит клеточные обломки, молекулы разных веществ. Супернатант при отмывании эритроцитов окрашен в розовато-оранжевый цвет за счёт выделившегося из разрушенных эритроцитов гемоглобина.

Супернатант изымают из пробирки. Иногда для этого достаточно перевернуть пробирку, и супернатант выливается из неё, но чаще его убирают дозатором или пастеровской пипеткой.

Обычно клеточную суспензию подвергают 2–3-кратному отмыванию. При последнем отмывании супернатант должен быть совершенно прозрачным.

После последнего отмывания осадок выделенных клеток разводят 1 мл питательной среды или буферного раствора. Тщательно ресуспендируют и определяют число клеток для того, чтобы понять, какой численностью клеток мы располагаем для дальнейшего исследования и как осуществить разведение этой клеточной суспензии для доведения её концентрации до уровня, требуемого по методике исследования.

Процедура расчёта для приготовления клеточной суспензии нужной концентрации или растворов жидкостей

В отмытой и приготовленной в 1 мл буферного солевого раствора или питательной среды суспензии клеток определяют их концентрацию по приведенной выше методике в камере Горяева. Так как приготовленная суспензия клеток занимает объём в 1 мл, то определённая в камере Горяева концентрация отражает абсолютное число имеющихся клеток.

Если методика, проведение которой планируется выполнить с этими клетками, требует концентрации клеток ниже, чем полученное значение, то

имеющееся количество клеток разводят тем же буферным раствором или питательной средой до достижения нужной концентрации.

Например, в процессе выделения лимфоцитов на градиенте плотности фиколл-верографин, после отмывания суспензии и доведения её объёма до 1 мл получено 20 млн. клеток. Предполагаемая в проведении методика требует использовать суспензию лимфоцитов в концентрации 2 млн. клеток в 1 мл. Значит, имеющуюся суспензию нужно развести в 10 раз.

Этого можно достигнуть двумя путями: к имеющемуся 1 мл суспензии лимфоцитов добавить 9 мл буферного раствора или питательной среды (до общего объёма 10 мл). Второй путь заключается во внесении 0,1 мл суспензии клеток в 0,9 мл буферного раствора или питательной среды.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику определения концентрации клеток в клеточной суспензии или лейкоцитов в образце крови путём подсчёта клеток в камере Горяева.

2. Освоить методику приготовления микроскопического препарата периферической крови и методику микроскопирования этого препарата.

3. Изучить морфологию основных типов клеток крови с зарисовкой клеток.

4. Освоить методику выделения мононуклеарных клеток крови на градиенте фиколл-верографин.

5. Освоить методы отмывания клеток (выделенных из крови мононуклеаров и эритроцитов)

6. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.

2. Краткое описание этапов процедуры подсчёта клеток в камере Горяева, приготовление микроскопического препарата из крови, определения морфологии клеток крови, использования градиента плотности для выделения мононуклеарных клеток из крови, процедуру отмывания клеток.

3. Результаты исследований (схема подсчёта клеток в камере Горяева, микроскопическое изучение препаратов с их зарисовкой и заключением).

4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Иммунология как наука. Отрасли иммунологии.
2. Задачи иммунологии.
3. Иммунная система, принципы её организации.
4. Клетки и молекулы иммунной системы.
5. Иммунитет, виды иммунитета.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 15–46.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 19–27, 31–34.
4. Новиков, Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 17–117.
5. Плейфэр, Дж. Наглядная иммунология: пер. с англ. / Дж. Плейфэр – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – С. 8–11, 14–15, 42–43, 46–47.

Лабораторное занятие № 2

Факторы видового иммунитета: фагоцитарная реакция. Методы исследования фагоцитоза

Цель работы: освоить метод определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови с использованием микробной суспензии в качестве тест-объекта.

Оборудование, приборы, принадлежности: центрифуга, термостат, холодильник, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, микроскоп, 24-часовая культура *S.aureus*, стандарт мутности, лабораторные пробирки, камера для фиксирования мазков крови, предметные стёкла, иммерсионное масло, краситель Романовского-Гимзы, смесь Никифорова, изотонический раствор NaCl, образцы гепаринизированной крови, механический счётчик клеток.

I. Теоретическая часть

Для определения активности фагоцитарных клеток используют ряд реакций, основанных на контроле разных этапов фагоцитоза, а также оценке основного эффекта фагоцитарной реакции, а именно: определение численности клеток, способных к фагоцитозу и количества поглощенных объектов фагоцитоза.

В основе определения фагоцитарной активности фагоцитов – биологический метод, предполагающий воспроизведение фагоцитоза в условиях *in vitro* путём смешивания суспензии клеток-фагоцитов и объектов фагоцитоза. После инкубации этой суспензии (время определяется конкретными условиями и особенностями фагоцитов) осуществляется регистрация результатов.

Общая схема исследования фагоцитоза

Выбор клеток-фагоцитов. Как известно, клетками-фагоцитами являются нейтрофилы и макрофаги. Поскольку для макрофагов характерна тканевая локализация, то использование их в качестве клеток-фагоцитов в условиях *in vitro* не представляется возможным. Поэтому основной популяцией фагоцитов, используемых для научных исследований и для иммунодиагностики, являются нейтрофилы периферической крови.

Условия получения клеток-фагоцитов. Обычно для изучения фагоцитоза используют гепаринизированную венозную или капиллярную кровь, но удобнее работать с лейкоцитарной взвесью. При необходимости используют фракционирование лейкоцитов (или периферической крови) для получения чистой суспензии нейтрофилов.

Выбор объекта фагоцитоза. В качестве тест-объекта для изучения фагоцитоза могут использоваться как суспензия микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* или *E. coli*) так и частицы латекса диаметром 3 мкм.

В последнем случае недостатком является невозможность определения параметров завершенности фагоцитоза (т. е. уничтожения и деструкции объекта фагоцитоза).

Условия приготовления объекта фагоцитоза. Со скошенного питательного агара, на котором растет культура *S.aureus* или *E. coli* (суточная) физиологическим раствором смывают колонии микробов. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов связаны с концентрацией объекта фагоцитоза, т. е. с концентрацией микробной суспензии или суспензии частиц латекса, поэтому для стандартизации проводимых исследований нужно использовать одинаковую концентрацию объектов фагоцитоза. Соотношение нейтрофилы: микробы должно составлять 1:100. Доведение суспензии микробов до необходимой (1×10^9 /мл) концентрации проводят с помощью оптического стандарта мутности.

Стандарт мутности представляет собой ампулированный препарат, содержащий суспензию инертных частиц диаметром 1–2 мкм в определенной концентрации (выпускаются стандарты мутности на 1×10^6 частиц в мл, 1×10^9 частиц в мл и др.). При доведении концентрации микробной суспензии до желаемого уровня проводят визуальное сравнение мутности стандарта с суспензией микробов, помещенных в пробирку такого же диаметра, что и ампула стандарта мутности (рис. 2.1, справа).

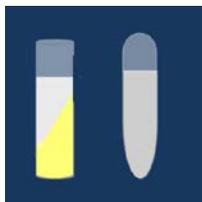


Рисунок 2.1 – Сравнение смыва бактериальной культуры со скошенного агара (слева) со стандартом мутности (справа)

При видимом превышении концентрации микробной суспензии (см. рис. 2.1) ее разводят физиологическим раствором. Основным недостатком данного подхода является субъективность учета, поэтому более приемлемым вариантом является автоматизированное определение концентрации микробной суспензии с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК).

Иногда, в связи с вирулентностью микроорганизмов, их инактивируют обработкой формалином. Для этого суспензию микроорганизмов смешивают с равным объемом 5 %-го формалина, инкубируют в течение 5 минут, затем отмывают 3 раза и доводят до необходимой концентрации.

Постановка реакции фагоцитоза.

В пробирке смешивают в равных объемах (100 мкл + 100 мкл или 50 мкл + 50 мкл) микробную и лейкоцитарную взвеси (или гепаринизированную кровь), перемешивают и инкубируют при 37 °С 30 мин (это время необходимо для миграции нейтрофилов, адгезии микробов на их цитоплазматической мембране и собственно фагоцитоза), затем центрифугируют (5 мин, 1500 об/мин.) и из осадка готовят мазки. Мазки высушивают, фиксируют этанолом 15 мин, окрашивают по Романовскому-Гимзе 20–30 мин (рН 7,2–7,4), ополаскивают в проточной воде и микроскопируют.

Регистрация результатов: учет результатов проводится под иммерсионной системой микроскопа с увеличением 10×90. Микробы окрашены в темно-фиолетовый (или темно-синий) цвет, хорошо контурируются. Среди 100–200 нейтрофилов подсчитывают число фагоцитирующих клеток и общее число поглощенных микробов (рис. 2.2).

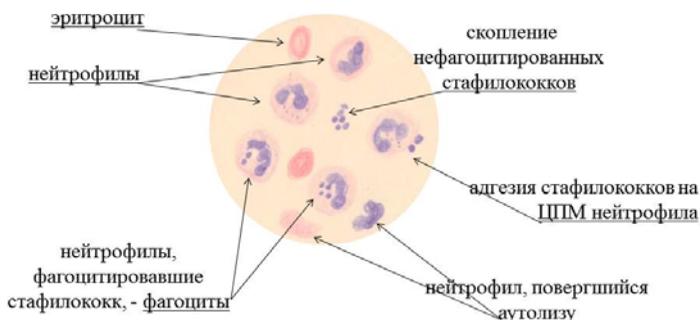


Рисунок 2.2 – Микроскопический препарат фагоцитоза стафилококка нейтрофилами

Показатели активности фагоцитоза

1. ФП – процент фагоцитирующих нейтрофилов – процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего их количества,

$$\text{ФП} = (\text{число фагоцитов} / \text{число всех нейтрофилов}) \times 100 \%$$

Например, среди 100 нейтрофилов фагоцитируют микробы 64 клетки, значит $\text{ФП} = (64 / 100) \times 100 \% = 64 \%$.

2. ФЧ – фагоцитарное число, среднее число поглощенных микробов – частное от деления общего количества поглощенных микробов на процент фагоцитоза. Например, 64 нейтрофила-фагоцита фагоцитировали 214 бактерий, тогда $\text{ФЧ} = 214 / 64 = 3,34$.

Физиологические показатели фагоцитоза при использовании суспензии стафилококка в соотношении нейтрофилы: микробы = 1:100 составляют по ФП – 45...75; по ФЧ – 4,5...7,5. При увеличении концентрации мик-

робной суспензии ФП и ФЧ увеличиваются. Потому для биологического метода определения фагоцитарной активности нейтрофилов важно поддержание стандартного соотношения нейтрофилы: микробы.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику приготовления смыва микробной суспензии.
2. Осуществить постановку реакции фагоцитоза.
3. Провести микроскопический учет реакции фагоцитоза.
4. Рассчитать показатели фагоцитарной активности нейтрофилов.
5. Изучить демонстрационные препараты фагоцитоза. Зарисовать и дать по ним заключение.
6. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
 2. Краткое описание этапов приготовления микроскопического препарата.
 3. Результаты исследований (схема постановки реакции по исследованию фагоцитоза нейтрофилами суспензии стафилококка, микроскопическое изучение препаратов с их зарисовкой и заключением).
 4. Выводы.
- Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Клетки-участники фагоцитарного процесса.
2. Этапы фагоцитоза.
3. Объекты фагоцитоза.
4. Исход фагоцитоза.
5. Физиологическая роль фагоцитоза.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 122–149.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 61–67.
4. Плейфэр, Дж. Наглядная иммунология: пер. с англ. / Дж. Плейфэр – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – С. 20–23.

Лабораторное занятие № 3

Гуморальные факторы видового иммунитета: система комплемента. Методы изучения системы комплемента

Цель работы: освоить метод 50 %-го гемолиза для определения общей активности системы комплемента.

Оборудование, приборы, принадлежности: термостат, холодильник, спектрофотометр, центрифуга, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, штативы для пробирок, химические пробирки на 10 мл, мединал-вероналовый буфер, изотонический раствор хлорида натрия, суспензия эритроцитов барана, гемолитическая сыворотка, дистиллированная вода, образцы сыворотки крови человека для исследования активности системы комплемента.

I. Теоретическая часть

Исследование системы комплемента представляет собой существенную проблему в силу особенностей её структурно-функциональной организации, включающей компонентный состав системы и каскадный механизм вовлечения компонентов в реакцию активации.

Наиболее приемлемым подходом оценки функциональной активности системы комплемента является биологический. Этот подход заключается в создании в условиях *in vitro* возможности проявления активности системой комплемента тестируемого образца крови (сыворотки крови) путём предоставления системе комплемента мишеней для сборки мембраноатакующего комплекса. По разрушению того или иного количества этих мишеней регистрируют активность системы комплемента в образце сыворотки крови.

Самыми доступными мишенями являются эритроциты барана, мыши, кролика или других видов животных. Их цитоплазматическая мембрана содержит полисахариды, активирующие комплемент. Эритроциты можно использовать и для создания комплекса антиген-антитело, являющегося основным активатором классического пути. В результате активации системы комплемента происходит лизис эритроцитов (гемолиз), по степени которого устанавливается активность системы комплемента тестируемого образца сыворотки крови. Поэтому данный метод получил название гемолитического.

В процессе проведения гемолитического метода оценки активности комплемента невозможно определить прямые количественные параметры, например, концентрацию компонентов комплемента. Определяемым параметром становится условная единица – единица CH₅₀, которая подразумевает способность определённого количества сыворотки крови, в которой находится некоторое количество комплемента, лизировать определённую часть эритроцитов-мишеней, представленных в виде суспензии, в течении определённого как инкубация времени.

Для достижения возможности определения единиц СН50 из тестируемой сыворотки крови создают ряд разведений, когда в каждой последующей пробирке находится увеличенная в сравнении с предыдущей пробиркой порция сыворотки (рис. 3.1).

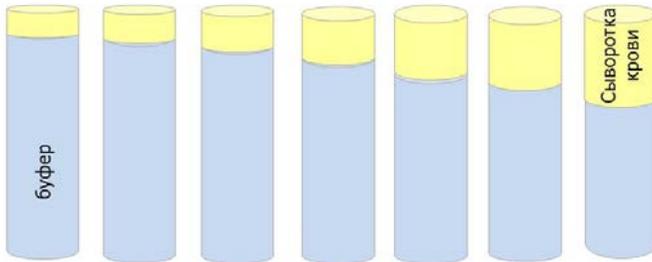


Рисунок 3.1 – Ряд разведений сыворотки крови для исследования активности комплемента методом 50 %-го гемолиза

Порция сыворотки крови смешивается с содержащимся в пробирке буферным раствором. Это приводит к нарастающему увеличению концентрации компонентов в ряду последующих пробирок. То есть, в каждой последующей пробирке больше комплемента, чем в предыдущей, что и определяет возможность регистрации активности системы комплемента в условных единицах СН50.

Затем в каждую пробирку добавляют определённый объём суспензии эритроцитов – мишеней для проявления активности системы комплемента. Эту суспензию называют «гемолитической системой», или гемсистемой.

Гемсистемы для оценки активности классического и альтернативного путей активации комплемента (рис. 3.2) различны: гемсистема для альтернативного пути представляет собой суспензию эритроцитов кролика или мыши в забуференном фосфатами солевом растворе (PBS), а гемсистема для классического пути – это суспензия эритроцитов барана, сенсibilизированных антителами к их мембране, желатин-вероноловом буфере с ионами кальция (рис. 3.2).

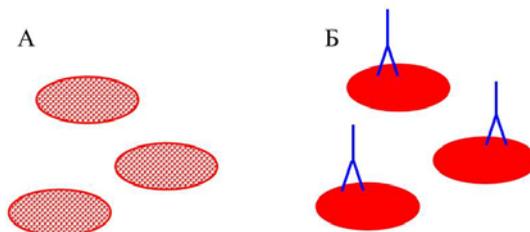


Рисунок 3.2 – Гемолитические системы для исследования альтернативного (А) и классического (Б) путей активации системы комплемента

В литературе принято обозначение гемсистемы для исследования классического пути активации системы комплемента – EA (erythrocyte–antibody, эритроцит-антитело к нему).

При высоком содержании в тестируемом образце сыворотки крови комплемента уровень его активации на эритроцитах-мишенях будет высок, а, следовательно, степень гемолиза эритроцитов будет значительна (рис. 3.3).

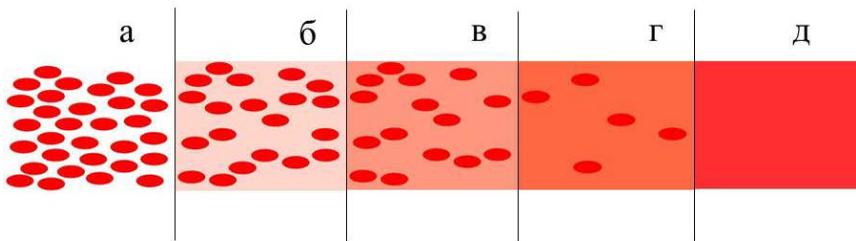


Рисунок 3.3 – Гемолиз при проявлении комплементом активности: в ряду от а) до д) нарастает количество лизированных эритроцитов. Из них выходит гемоглобин, что придаёт среде оранжево-красный цвет, а количество целых эритроцитов уменьшается

Определение активности комплемента исследуемого образца сыворотки крови в условных единицах подразумевает сравнение каждой пробирки опытного ряда с контрольной пробиркой, в которой лизировано 50 % эритроцитов гемсистемы. Этот контроль приготавливают добавлением в гемсистему дистиллированной воды (рис. 3.4).

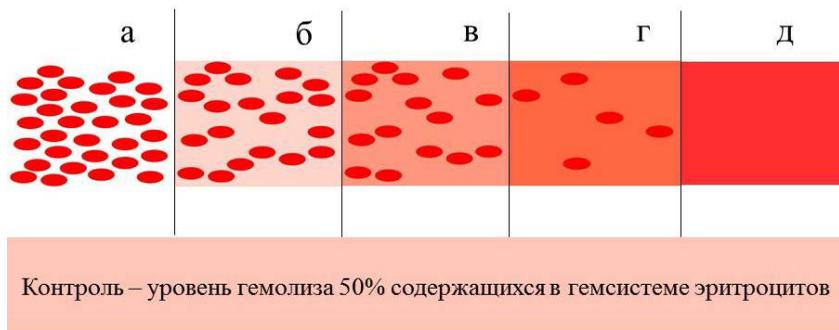


Рисунок 3.4 – Методический подход к определению уровня CH50 в исследуемом образце сыворотки крови: приготовленный контроль, в котором лизировано 50 % эритроцитов гемсистемы, имеет определённую степень окраски в силу выхода в раствор гемоглобина из лизированных эритроцитов. Этот контроль соответствует 1 условной единице CH50. Контроль сравнивают с каждой опытной пробиркой для определения в ряду пробирок той, которая соответствует по цвету раствору контрольной

Регистрацию результатов исследования активности системы комплемента методом СН50 проводят спектрофотометрированием супернатанта каждой пробирки опытного ряда, а при отсутствии спектрофотометра осуществляют визуальное сравнение опытных пробирок с контрольной.

Проведение метода СН50

1. Для исследования используется сыворотка крови (см. лабораторную работу № 1).

2. Приготовление гемолитической системы.

Для приготовления гемсистемы использую суспензию эритроцитов барана/кролика, отмытую от лизированных эритроцитов. Из плотного осадка эритроцитов готовят 3 %-ную (по объему) взвесь в изотоническом растворе. Например, для приготовления 10 мл 3 %-ной суспензии эритроцитов надо взять 0,3 мл эритроцитов (плотного осадка) и 9,7 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Гемолитическая система для тестирования классического пути активации системы комплемента – это смесь равных объемов 3 %-ной взвеси бараньих эритроцитов и гемолитической сыворотки, взятой по троекратному титру (т. е. в количестве достаточном для опсонизации эритроцитов, но недостаточном для полного связывания всех эритроцитов, т. е. для их агглютинации).

Гемолитическая сыворотка представляет собой антитела к эритроцитам барана, представленные IgG, выпускаемые специализированными предприятиями. Для ее получения проводят иммунизацию лабораторных животных, например лошадей, кроликов, коз. Иммунизация, т. е. искусственное введение в организм антигена (в данном случае – эритроцитов барана) приводит к развитию гуморального иммунного ответа с продукцией антигенспецифических антител. Гемолитическая сыворотка используется для постановки широкого спектра иммунологических реакций, включая определение активности комплемента.

Смешивание гемолитической сыворотки с эритроцитами производят по возможности быстро, причем гемолитическую сыворотку примешивают к взвеси эритроцитов, а не наоборот. Смесь выдерживают при 37 °С в термостате 30 мин для сенсibilизации эритроцитов.

Гемолитическая система для тестирования активности альтернативного пути – это 3 %-ная суспензия эритроцитов кролика в изотоническом фосфатном буфере.

3. Постановка реакции осуществляется следующим образом:

а) исследуемую сыворотку разводят буферным раствором в 10 раз: 1 мл сыворотки + 9 мл буферного раствора;

б) нумеруют рабочий ряд пробирок;

в) исследуемую сыворотку разливают по пробиркам в возрастающем объёме согласно приведенной схеме, затем уравнивают объемы вероналовым буфером и вносят гемсистему.

Схема внесения реактивов для постановки метода СН50 в ряд пробирок

Ингредиент	Пробирки										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Иссл. с-ка, мл	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	–
Буфер, мл	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1	1,5
Гем. система, мл	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

г) отдельно приготавливают стандарт по 50 %-му гемолизу:

Приготовление стандарта гемолиза для метода СН50

Ингредиент	Пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Гемсистема, мл	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Дистиллированная вода, мл	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
% гемолиза	20	30	40	50	60	70	80	90

Таким образом, пробирка 4 – стандарт 50 % гемолиза;

д) все пробирки инкубируют при +37 °С в течение 30 минут, что необходимо для активации классического пути системы комплемента;

е) для остановки реакции все пробирки ставят в холодильник на 10 мин;

ж) все пробирки центрифугируют при 2000 об./мин 10 минут.

Регистрацию результатов проводят либо визуально, сравнивая цвет супернатанта опытных пробирок со стандартом (контрольное разведение), но лучше – с помощью спектрофотометра (измерение проводят на длине волны поглощения гемоглобина, 412–432 нм). Определяют гемолитическую активность системы комплемента, выражая ее в условных единицах СН50.

Например, интенсивность окраски супернатанта стандарта наиболее близка к интенсивности окраски супернатанта 5-й опытной пробирки, в которой содержится 0,25 мл сыворотки, тогда – 0,25 мл – это 1 единица СН50, а 1 мл сыворотки – это x единиц СН50, составив пропорцию, получаем результат: 4 СН50 , но так как сыворотка исходно была разведена в 10 раз, то умножаем $4 \text{ СН50} \times 10 = 40 \text{ СН50}$.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику приготовления гемсистемы.
2. Осуществить постановку реакции 50 %-го гемолиза.
3. Провести учет реакции 50 %-го гемолиза.
4. Рассчитать активность системы комплемента в тестируемых образцах сыворотки крови.

5. Зарисовать полученные результаты.
6. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
2. Краткое описание этапов постановки метода 50 %-го гемолиза.
3. Результаты исследований (зарисовка схемы гемолиза эритроцитов барана компонентом исследуемых образцов сыворотки крови, зарисовка полученных результатов, расчёт активности системы комплемента).
4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

Состав системы комплемента: компоненты, номенклатура, биосинтез.

Пути активации: альтернативный, классический, лектинный.

Функции системы комплемента.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 166–181.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 50–60.
4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 81–85.

Лабораторное занятие № 4

Взаимодействие антиген-антитело и методы его регистрации: агглютинация

Цель работы: изучить визуальные феномены взаимодействия антиген-антитело и методы, основанные на этом взаимодействии (серологический, иммунохимический).

Оборудование, приборы, принадлежности: термостат, холодильник, спектрофотометр планшетный, центрифуга, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, 96-лучные планшеты, химические пробирки на 10 мл, предметные стёкла, мединал-вероналовый буфер, изотонический раствор хлорида натрия, диагностические сыворотки и диагностикумы, культура бактерий, исследуемые образцы сыворотки крови.

I. Теоретическая часть

Взаимодействие антигена и специфичного ему антитела приводит к связыванию этих молекул с образованием *иммунного комплекса (ИК)*. Но в зависимости от особенностей строения взаимодействующих молекул иммунные комплексы имеют существенные различия.

Если молекула антигена имеет одну антигенную детерминанту (эпитоп), то антиген может связаться только одним паратопом одной молекулы антитела (рис. 4.1). Но если в молекуле антигена есть две и более антигенные детерминанты, то такие антигены могут образовать сложный иммунный комплекс с участием более чем одной молекулы антитела.

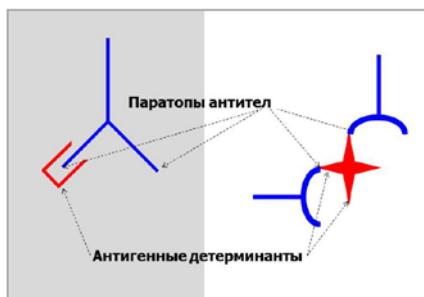


Рисунок 4.1 – Особенности строения антигена, допускающие образование крупных многомолекулярных агрегатов: слева (на сером фоне) представлен антиген с одной антигенной детерминантой, справа (на белом фоне) – антиген с несколькими антигенными детерминантами (поливалентный). Такой антиген может стать сайтом связывания нескольких молекул антител с образованием крупного белкового агрегата

Именно такие антигены инициируют формирование крупных многомолекулярных агрегатов, образование которых можно увидеть невооружённым глазом как феномены *агглютинации* и *преципитации* (рис. 4.2).

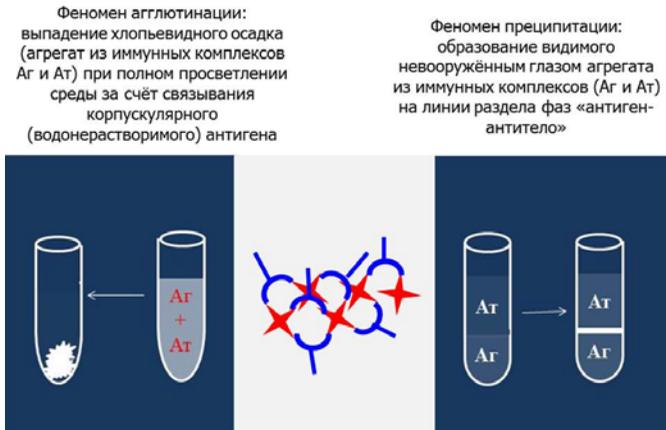


Рисунок 4.2 – Феномены агглютинации и преципитации

Феномены агглютинации и преципитации объединены единым механизмом, который приводит в возможности регистрации образования агрегата иммунных комплексов невооружённым глазом. Но эти феномены имеют и существенные различия: агглютинация возникает при связывании специфичными антителами корпускулярного, водонерастворимого антигена, тогда как преципитация образуется при связывании специфичными антителами водорастворимого антигена. На основании этого различия имеется классификация антител, согласно которой выделяют агглютинирующие антитела (агглютинины) и преципитирующие антитела (преципитины).

Примерами реакции агглютинации являются такие, как определение групп крови (на эритроцитах представлены антигены, то есть антиген корпускулярный), а также определение антигенной структуры бактерий, выполняемое в рамках антигенной идентификации чистой культуры.

Реакции преципитации широко применяются в медицинской диагностике (определение С-реактивного белка, концентрации иммуноглобулинов в биологических жидкостях и др.) и в криминалистике.

Агглютинация и преципитация составляют основу *серологического метода исследования*, позволяющего определение антигена по известным антителам или определение антител по известному антигену.

Серологический метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Большинство реакций этого метода просты в проведении и учете, доступны широкому кругу лабораторий, как правило, безопасны, экономичны, поддаются стандартизации.

Серологический метод предполагает проведение серологической реакции. Спектр серологических реакций в настоящее время широк. Всем им присущи общие особенности:

1) так как любые серологические реакции являются реакциями взаимодействия антигена и антитела, то во всех случаях для установления присутствия антител в исследуемом материале необходим набор известных стандартных корпускулярных или растворимых антигенов, называемых *диагностическими*. В свою очередь, для установления присутствия антигена нужен набор *иммунных диагностических сывороток (антительный диагностикум)*;

2) взаимодействие антигена и антитела осуществляется только в присутствии электролита, в качестве которого обычно используют изотонический раствор хлорида натрия или буферные смеси с необходимым уровнем рН;

3) для образования иммунного комплекса (Аг–Ат) требуется период инкубации при определённой температуре (от +4 °С; +37 °С): образование видимого простым глазом агглютината или преципитата происходит медленно, через несколько часов или даже суток;

4) оба компонента серологической реакции (антиген и антитела) должны присутствовать в эквивалентном соотношении. Избыток какого-либо из компонентов блокирует образование иммунного комплекса и приводит к ложным результатам.

Для расширения возможности применения феномена агглютинации в целях диагностики и исследований в серологический метод введён приём перевода водорастворимого антигена в корпускулярный. Он осуществляется путём сорбирования водорастворимого антигена на нейтральных корпускулах (частицах латекса размером в пределах от 1 до 7 мкм), эритроцитах барана и др. Такие реакции агглютинации называются *пассивными* (реакция пассивной гемагглютинации – РПГА, реакция латекс-агглютинации).

Результат серологической реакции регистрируют (учитывают) по факту образования агглютинации или преципитации. В иммунологии принята система «четырёх плюсов» для учёта любых серологических реакций (табл. 4.1). Эта система основана на регистрации уровня связывания антигена антителами – от 100 % (полное связывание антигена, что означает достаточность антител исследуемого материала) до 25 % (связано не более ¼ части содержащегося антигена) до отсутствия феномена агглютинации или преципитации. Адекватный учёт серологической реакции возможен только при наличии контролей – положительного, формируемого на основе связывания диагностического компонента с так называемым «положительным стандартом» (прилагаемый к набору реактивов образец антител к данному диагностикуму) и отрицательного. Положительный и отрицательный контроли позволяют провести сравнение достигнутого при постановке реакции агглютината или преципитата с их выраженностью, характерной для эталона, представляемого контролями.

Таблица 4.1

Система учёта серологической реакции
по феномену агглютинации и преципитации

Результат реакции	Показатели			
	Связывание Аг	Образование белковых конгломератов	Состояние жидкой фракции системы	Характеристика результатов
++++	Полное, 100 %	Массивное, конгломераты не распадаются при встряхивании пробирок	Совершенно прозрачный супернатант	Реакция высоко положительная
+++	75 %	Массивное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	Супернатант с лёгкой опалесценцией	Реакция умеренно положительная
++	50 %	Умеренное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	Супернатант с выраженной опалесценцией	Реакция положительная
+	Менее 25 %	Конгломераты отсутствуют	Мутная жидкость	Реакция сомнительная
-	Отсутствует	Конгломераты отсутствуют	Мутная жидкость, нет отличия от отрицательного контроля	Реакция отрицательная

Серологические реакции могут быть качественными и количественными. Качественная реакция отвечает на вопрос, есть ли в исследуемом материале искомые антитела (искомый антиген), которые определяются по диагностическому компоненту реакции. Количественные серологические реакции позволяют не только обнаружить антитела (антигены) в исследуемом материале по известному диагностическому компоненту, но и определить их количество по специальному параметру – по титру антител (антигена).

Титр антител – это максимальное разведение исследуемого материала, дающее положительный результат серологической реакции (обычно ++, т. е. 50 %-ное связывание антигена). Титр Аг (или Ag) выражается разведением исследуемого материала, например, 1:16, 1:250 и т. п. Для постановки количественной серологической реакции нужно провести разведение исследуемо-

го материала (сыворотки крови обследуемого человека) с определённым заданным проколом реакции шагом (т. е. в определённое количество раз), поставить реакцию и провести учёт результатов. Пример такой реакции приведен на рис. 4.3.

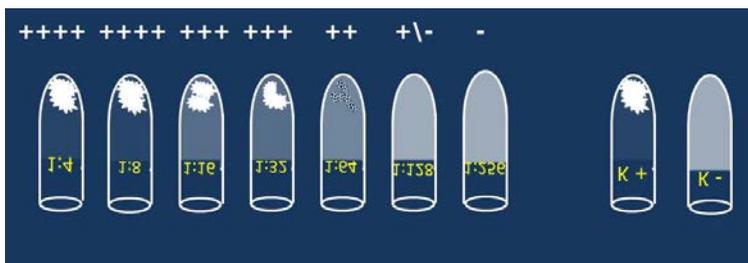


Рисунок 4.3 – Пример реакции агглютинации в пробирках (пробирочная РА): титр определяемых антител 1:64

Постановка качественной реакции агглютинации на стекле для антигенной идентификации чистой культуры бактерий

На предметное (рис. 4.4) стекло нанесите (шаг 1) каплю изотонического раствора хлорида натрия (отрицательный контроль), каплю антисыворотки O111:H24 к антигенам E.coli. В каждую каплю внесите (шаг 2) каплю тестируемой чистой культуры бактерий. При положительной реакции появятся агглютинаты, видимые глазом. Зарисуйте результат.

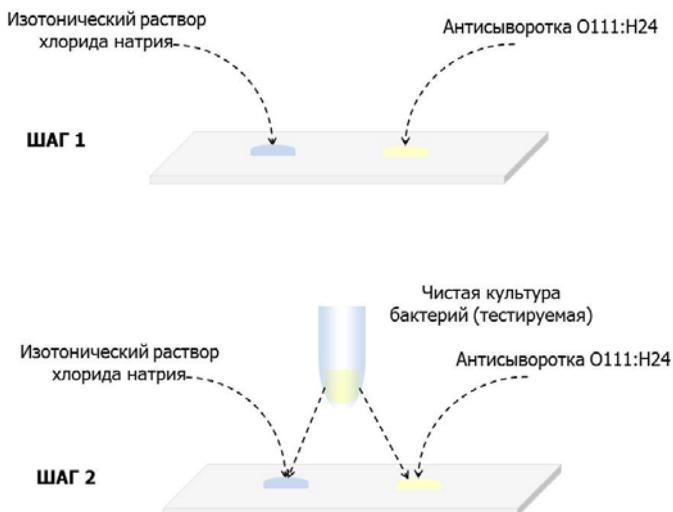
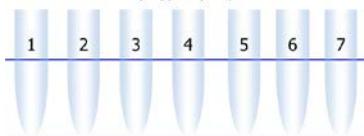


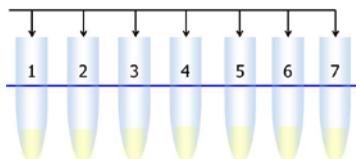
Рисунок 4.4 – Схема РА на стекле для идентификации чистой культуры бактерий

Постановка реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) для определения титра антител (к вирусу кори) в сыворотке крови:

1. Устанавливаем в штатив ряд пробирок. Нумеруем пробирки.

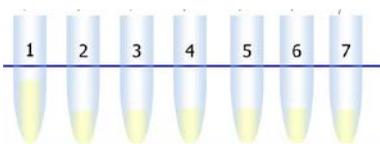


2. Вносим в опытные пробирки по 100 мкл изотонического раствора хлорида натрия.

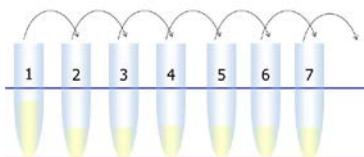


3. В пробирку 1 вносим 100 мкл исследуемой сыворотки крови.

На этом этапе в пробирке 1 объём внесённых реагентов составляет 200 мкл, в других пробирках остаётся по 100 мкл изотонического раствора NaCl.



4. Перемешиваем содержимое пробирки 1 и переносим из неё в пробирку 2 100 мкл разведённой сыворотки крови. Эту операцию проводим с последующими пробирками. Из пробирки 7 удаляем 100 мкл реакционной смеси.



Во всех пробирках на этом этапе постановки реакции по 100 мкл разведённой изотоническим раствором NaCl сыворотки крови. Но в каждой пробирке другое разведение. Подпишите все полученные разведения сыворотки крови.

5. В пробирки вносим по 100 мкл эритроцитарного диагностикума.

6. Готовим контроли:

- положительный – 100 мкл эритроцитарного диагностикума + 100 мкл стандартной положительной сыворотки;
- отрицательный – 100 мкл эритроцитарного диагностикума + 100 мкл изотонического раствора NaCl.

7. Проводим инкубацию при + 37 °С в течение 1 часа.
8. Результат учитываем по образованию агглютинатов.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику постановки реакции агглютинации на стекле.
2. Провести антигенную идентификацию чистой культуры бактерий в РА.
3. Освоить методику постановки РПГА в пробирках.
4. Поставить РПГА в пробирках для определения титра антител к вирусу кори.
5. Учесть результаты проведенных реакций, проанализировать их.
6. Зарисовать механизмы формирования агглютинатов и преципитатов.
7. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
 2. Краткое описание этапов постановки реакций агглютинации и пассивной гемагглютинации.
 3. Результаты исследований (зарисовка схемы механизма формирования агглютинатов и преципитатов, схемы постановки РА и РПГА, расчётные данные, учёт результатов).
 4. Выводы.
- Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Строение молекулы антигена.
2. Виды антигенов.
3. Антитела: строение, функциональные участки.
4. Механизмы взаимодействия антиген-антитело.
5. Функции антител.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 231–242, 263–298.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 71–107.
4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск.: Выш. шк., 2005. – С. 56–69, 100–117.
5. Плейфэр, Дж. Наглядная иммунология: пер. с англ. / Дж. Плейфэр – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – С. 36–40, 44–45.

Лабораторное занятие № 5

Взаимодействие антиген-антитело и методы его регистрации: преципитация, простая радиальная иммунодиффузия по Манчини

Цель работы: изучить постановку реакции комплекса преципитации, освоить количественный подход к определению концентраций иммуноглобулинов в биологических средах.

Оборудование, приборы, принадлежности: термостат, холодильник, центрифуга, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, 96-лучноньные планшеты или стрипы, стёкла для заливки агарозой, мединал-вероналовый буфер, изотонический раствор хлорида натрия, диагностические антисыворотки, агарозный гель, пробойник для изготовления лунок, исследуемые образцы сыворотки крови.

I. Теоретическая часть

Установление концентрации иммуноглобулинов разных классов в биологических жидкостях (сыворотке крови, слюне и проч.) имеет важное диагностическое и научное значение. Поэтому для количественного определения концентрации IgG, A, M, E разработаны специальные методы, включая **реакцию простой радиальной иммунодиффузии по Манчини**.

Эта реакция основана на феномене преципитации, т. е. образовании крупного белкового конгломерата, состоящего из комплексов антиген-антитело, и видимого невооруженным глазом.

Антигеном в данном случае являются собственно иммуноглобулины каждого класса. Так как иммуноглобулины (например, человека) – это белки, то для другого вида животных они являются антигеном и при введении в организм индуцируют гуморальный иммунный ответ с синтезом антител. То есть, иммунизируя иммуноглобулинами человека животных (овец, коз или кроликов), можно получить **диагностический компонент** – антитела к иммуноглобулинам определенных классов человека. Этот диагностический компонент называется антисывороткой к иммуноглобулину человека определенного класса и выпускается специальными предприятиями и лабораториями.

Данный диагностический компонент (антисыворотку к IgG, например, или к IgA, или к IgM) в определенном количестве (в титре) вносят в агаровый или агарозный гель. Температура геля в этот момент должна быть на уровне +40 ... +43 °C (при более высокой температуре диагностические антитела коагулируют, а при более низкой гель застывает и введенные диагностические антитела не перемешиваются и не распределяются в геле равномерно). Агаровый гель с внесенной диагностической антисывороткой перемешивают и распределяют эту смесь на стеклянных пластинах. Толщина агарового слоя должна составлять 1 мм.

После застывания в агаровом геле с помощью специального пробойника делают лунки диаметром 1,5–2 мм, в которые вносят исследуемый мате-

риал. Исследуемый материал всасывается в агаровый слой. При наличии в исследуемом образце иммуноглобулинов соответствующего класса происходит реакция взаимодействия антиген (иммуноглобулин определяемого класса исследуемого образца) – антитело (диагностическая антисыворотка, или антиIg определенного класса). В последующем, благодаря особенностям строения молекул Ig, возникает укрупнение комплексов за счет объединения нескольких в единый комплекс, т. е. образование *преципитатов*. Визуально преципитаты видны невооруженным глазом как мутные зоны на фоне более прозрачного агарового слоя (рис. 5.1, А). Для лучшего контрастирования преципитатов пластины окрашивают красителями, связывающимися с белками (рис. 5.1, Б). Площадь преципитата соответствует количеству определяемых Ig. Для количественного определения концентрации иммуноглобулинов какого-либо класса необходимо иметь стандартный образец, содержащий известную концентрацию Ig разных классов. Такие стандартные образцы также выпускаются специальными предприятиями и прилагаются к набору диагностических антисывороток. Стандартный образец вносят в ряд лунок, приготовив предварительно разведения образца для получения концентраций, отличающихся друг от друга в 2 раза. Благодаря этому после диффузии получается ряд преципитатов разной площади, что позволяет построить калибровочный график и определить концентрацию иммуноглобулина в исследуемых образцах.

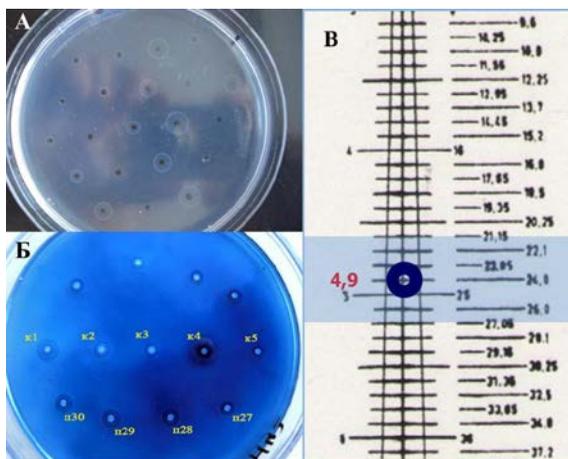


Рисунок 5.1 – Внешний вид преципитатов при постановке реакции Манчини для определения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови: А – нативный препарат, Б – окрашенные преципитаты, В – методика измерения диаметра преципитата клиновидной линейкой (увеличено)

Условия приготовления реагентов

1. Моноспецифические сыворотки, содержащие антитела к иммуноглобулинам А, М, G растворяем в 1 мл стерильного физраствора.

2. 3 % агарозный гель готовят из 6 г сухой агарозы, растворенной при нагревании на водяной бане в 100 мл дистиллированной воды и в 100 мл вернал-мединалового буфера с последующим добавлением 4 мл 1 % раствора мертиолата в качестве консерванта.

3. Окрашивающую жидкость готовят из 1 г красителя амидо-черный, растворенного в 100 мл ледяной уксусной кислоты с последующим увеличением объема до 1000 мл дистиллированной водой и фильтрованием.

Условия проведения реакции

В подогретый на водяной бане до +40 ... +43 °С агар вносим антисыворотку, определив ее объем, исходя из титра, указанного на ампуле. Выливаем агар на подогретое до 30 °С предметное стекло и оставляем на 10 минут для застывания смеси. Пробойником вырезаем лунки и выбираем из них гель.

Разводим стандарты. Для определения IgA и IgM используется ряд: цельный стандарт, разведения 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Для IgG используются разведения стандарта 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.

Разводим исследуемые образцы сыворотки крови. Для определения IgA и IgM разведение сыворотки должно быть 1:4, а для IgG – 1:16. Такие различия связаны с необходимостью соблюдения эквивалентного соотношения антигена и антител в системе и различиями в концентрации иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови.

Вносим в лунки стандартные сыворотки и исследуемые образцы. Оставляем залитые пластины на 24 часа во влажной камере в термостате для осуществления диффузии и образования преципитатов.

Промываем пластины изотоническим раствором хлорида натрия или водой для вымывания несвязавшихся белков, высушиваем и окрашиваем раствором амидо-черного 10В.

Регистрация результатов

На окрашенных пластинах специальной клиновидной линейкой проводят измерение диаметра полученных колец преципитации (рис. 5.1, В) для разведения стандартной сыворотки и исследуемых препаратов биологических жидкостей. По результатам измерения колец преципитации стандартной сыворотки строят калибровочные кривые для каждого иммуноглобулина, где по оси абсцисс откладывают диаметры колец преципитации в мм, а по оси ординат – известную концентрацию данного иммуноглобулина в мг/мл, содержащуюся в данном разведении сыворотки. Концентрацию иммуноглобулинов в исследуемых препаратах определяют с использованием полученных калибровочных кривых. В последнее время для расчета концентрации Ig используют компьютерные программы.

Концентрация Ig в сыворотке крови (физиологические уровни)

IgM: 0,4–2,2 г/л IgA: 0,7–4,0 г/л IgG: 6,0–16,0 г/л IgE: не более 0,00025 г/л

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику постановки реакции простой радиальной иммунодиффузии.

2. Проведите заливку агарозным гелем стёкол или чашки Петри. После застывания подготовьте слой агарозы для внесения образцов исследуемых сывороток крови и стандартных разведений.

3. Приготовьте разведения стандартных сывороток и исследуемых образцов. Внесите стандартные сыворотки и исследуемые образцы в лунки в слое агарозы.

4. Проведите отмывание и окраску пластин после завершения иммунодиффузии.

5. Осуществите учёт реакции радиальной иммунодиффузии по Манчини.

6. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.

2. Краткое описание этапов постановки реакции простой радиальной иммунодиффузии.

3. Результаты исследований (зарисовка схемы механизма формирования преципитатов в реакции Манчини, расчётные данные, учёт результатов, калибровочный график).

4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Классы иммуноглобулинов человека.

2. Генетическое обеспечение продукции иммуноглобулинов разных классов.

3. Функции разных классов иммуноглобулинов.

Список литературы:

1. Лекционный материал.

2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 231–263.

3. Хаитов, Р. М. Иммунология: Учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 71–107.

4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 56–64.

Лабораторное занятие № 6

Взаимодействие антиген–антитело и методы его регистрации: реакции антиген–антитело, не дающие визуальных феноменов

Цель работы: изучить методические подходы исследования образования комплекса антиген–антитело при невозможности образования агглютинации и преципитации иммунными комплексами.

Оборудование, приборы, принадлежности: термостат, холодильник, центрифуга, автоматические дозаторы на разные объёмы и наконечники к ним, 96-лучные планшеты или стрипы, исследуемые образцы сыворотки крови, наборы для ИФА-определения антигенспецифических антител, демонстрационные наборы для проведения РИА, демонстрационная РСК.

I. Теоретическая часть

Помимо антигенов с несколькими антигенными детерминантами, имеются и антигены с одной антигенной детерминантой. Такие антигены (а значит, и антитела к ним) невозможно выявить визуально по феноменам агглютинации и преципитации. Для выявления таких антигенов и антител длительное время применялась *реакция связывания комплемента (РСК)*. Её возможности ограничены классовой принадлежностью определяемых антител, которые должны принадлежать только IgM и IgG, то есть тем классам, которые обладают способностью инициировать классический путь активации системы комплемента. РСК представляет собой одну из классических реакций серологического метода. Это означает ограничение по разрешающей способности: в серологических реакциях возможно определение антител или антигенов при их концентрации в исследуемом материале не менее мг/л или мкг/л в то время. В отношении более низких концентраций серологические реакции неэффективны.

РСК относится к сложным многокомпонентным серологическим реакциям. При постановке РСК *in vitro* создаются 2 системы: 1 – диагностическая, 2 – индикаторная.

1 – диагностическая система включает антиген (диагностикум), исследуемую сыворотку крови пациента, содержащую или не содержащую искомого антитела и комплемент. Все три ингредиента смешиваются в определенных пропорциях и инкубируются. Во время инкубации происходит образование комплекса антиген–антитело–комплемент в том случае, если в исследуемой сыворотке крови пациента присутствуют антитела к антигену-диагностикуму. При отсутствии антител комплемент остается свободным, и иммунные комплексы антиген–антитело–комплемент не образуются. Внешне образование иммунных комплексов не проявляется никакими феноменами. Для индикации образования иммунных комплексов, т. е. для реги-

страции результатов РСК после инкубации в диагностическую систему добавляют индикаторную систему.

2 – индикаторная система представляет собой суспензию эритроцитов барана, сенсibiliзирoванных антителами к ним же (гемолитическая система, приготавливаемая аналогично гемолитической системе для определения активности классического пути системы комплемента, см. лабораторную работу 2). Объединение двух систем и инкубация их при определенном режиме с последующим центрифугированием позволяет зарегистрировать результаты РСК по феномену задержки гемолиза.

Феноменология результатов РСК следующая:

а) в исследуемой сыворотке крови антитела к диагностикуму отсутствуют – РСК отрицательна. В данной ситуации во время инкубации компонентов 1-й (диагностической) системы не происходит образования иммунных комплексов. Комплемент находится в свободном состоянии. Добавление индикаторной системы (суспензии сенсibiliзирoванных антителами эритроцитов барана) активирует имеющийся комплемент по классическому пути с последующей сборкой мембраноатакующего комплекса на поверхности эритроцитов. В результате эритроциты барана лизируются. Таким образом, отрицательная РСК сопровождается полным гемолизом: после центрифугирования на дне пробирок осадка нет, а все содержимое представляет собой прозрачный красно-оранжевый раствор;

б) в исследуемой сыворотке крови присутствуют антитела к диагностикуму – РСК положительна. В данной ситуации во время инкубации компонентов 1-й (диагностической) системы образуются иммунные комплексы. Комплемент находится в связанном с этими комплексами виде. Последующее добавление индикаторной системы не вызывает гемолиза, так как свободный комплемент отсутствует.

Учет РСК проводится по системе ++++:

– РСК – сопровождается полным гемолизом, что описано выше,

++++ РСК – соответствует 100 %-му связыванию антигена антителами и образованию комплексов антиген-антитело-комплемент. После центрифугирования в пробирке образуется осадок эритроцитов, супернатант прозрачный, бесцветный;

+++ РСК – соответствует 75 %-му связыванию антигена антителами, а значит определенная часть комплемента остается в свободном виде и активируется гемолитической системой. После центрифугирования на дне пробирки есть осадок эритроцитов, супернатант имеет слегка желтоватую окраску из-за лизиса части эритроцитов;

++ РСК – соответствует 50 %-му связыванию антигена антителами, а значит практически половина комплемента находится в свободном виде и вызывает гемолиз практически половины эритроцитов индикаторной системы. После центрифугирования в пробирке на дне осадок эритроцитов ме-

нее значительный, чем при +++ и ++++ РСК, а супернатант окрашен в красно-оранжевый цвет;

+ РСК – сомнительный результат, после центрифугирования на дне есть незначительный осадок эритроцитов, а супернатант окрашен как и при отрицательной РСК.

Принцип РСК явился прообразом конкурентного подхода современного иммунохимического анализа (ИХА) – направления, также основанного на взаимодействии антиген-антитело.

ИХА высокоспецифичен и обладает высокой разрешающей способностью. Реакция ИХА можно обнаружить антигены и антитела при минимальном их присутствии в организме. Эти особенности ИХА привели к его широкому внедрению в многие отрасли науки и прикладных исследований. В области медицины и биологии методом ИХА определяют наличие и концентрацию гормонов, опухолевых антигенов, лекарственных веществ и др. в разных биологических материалах.

К реакциям ИХА относятся реакция иммунофлуоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА), иммунохроматографический анализ и т. д.

Имунофлуоресцентный метод (РИФ, реакция иммунофлуоресценции) – метод выявления специфических Аг (Ат) с помощью Ат (Аг), конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения Ат, поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток. *Прямая РИФ* состоит в обработке среза ткани или мазка из патологического материала или микробной культуры специфическими Ат, конъюгированными с флюорохромом; препарат промывают для освобождения от несвязанных Ат и исследуют в люминесцентном микроскопе. В положительных случаях по периферии объекта появляется светящийся иммунный комплекс (рис. 6.1.). В РИФ необходим контроль для исключения неспецифического свечения. При *непрямой РИФ* на первом этапе срез ткани или мазок обрабатывают нефлюоресцирующими специфическими антителами, на втором – люминесцирующими антителами к γ -глобулинам того животного, сыворотка которого была применена на первом этапе. В положительном случае образуется светящийся комплекс, состоящий из Аг, Ат к нему и Ат против Ат (сэндвич-метод).

Имунохроматографический метод основан на ИФА. Но все диагностические компоненты сорбированы на специальном носителе. Исследуемый материал (в объеме порядка 10 мкл) помещается на один из концов этого носителя и всасывается в него, при соответствии антител исследуемого материала и диагностических компонентов (т. е. антигенов возбудителя) происходит их связывание, проявляющееся окрашиванием полоски носителя. В настоящее время данный метод применяется в качестве экспресс-

диагностики инфекционных заболеваний, а также для определения ряда гормонов.

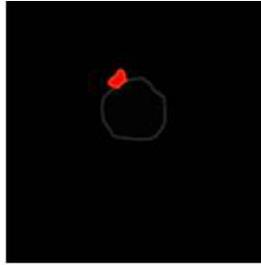
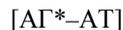
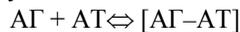


Рисунок 6.1 – Положительный результат РИФ – на периферии клетки располагается светящийся комплекс Аг-Ат

Радиоиммунный анализ (РИА) основан на обратимой реакции взаимодействия антигена – АГ (лиганда) со специфическим антителом (АТ) – связывающим агентом – с последующим образованием растворимого комплекса «антиген-антитело». Эта реакция подчиняется закону действующих масс. Условия реакции подбираются таким образом, что добавляемый в систему меченый радиоактивным изотопом АГ (АГ*) конкурирует с немеченым АГ за ограниченное число мест связывания на антителах. Согласно закону действующих масс, количество связанного с АТ меченого АГ находится в обратной зависимости от количества немеченого (анализируемого антигена). После установления равновесия в аналитической системе свободную и связанную фракции разделяют и измеряют активность одной из них.

Процесс реакции между компонентами можно выразить уравнением:



Регистрация результатов РИА проводится с помощью радиоизотопного счетчика.

Иммуноферментный метод (иммуноферментный анализ, ИФА) – определение Аг или Ат с помощью Ат или Аг, ковалентно соединенных с ферментом (чаще пероксидазой хрена, реже – β -глюкуронидазой, щелочной и кислой фосфатазами). Образующийся иммунный комплекс выявляют с помощью фотометрического измерения оптической плотности окрашенных продуктов, которые образуются в результате ферментативного расщепления субстрата ферментом. Иммуноферментные реакции применяют для диагностики инфекционных болезней (СПИДа, вирусных гепатитов, хламидиоза,

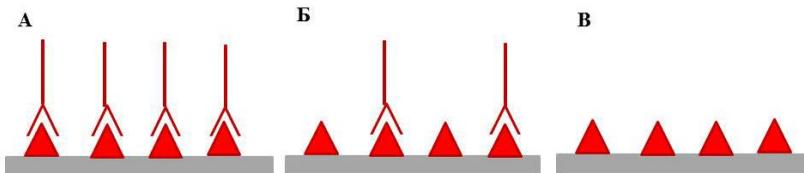
токсоплазма и др.), определения содержания гормонов и др. Для метода характерна высокая специфичность и чувствительность; высокий уровень автоматизации создается благодаря наличию специальных анализаторов и стандартных тест-систем. Различают *прямой способ*, когда ферментом мечают специфические Ig (Аг), и *непрямой*, при котором иммунный комплекс выявляют мечеными антииммуноглобулинами.

Базовая схема ИФА

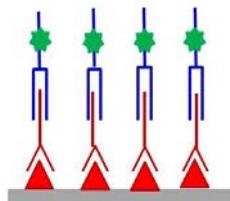
1. На дне лунок полистироловой 96-луночной планшеты сорбирован антиген (диагностикум).



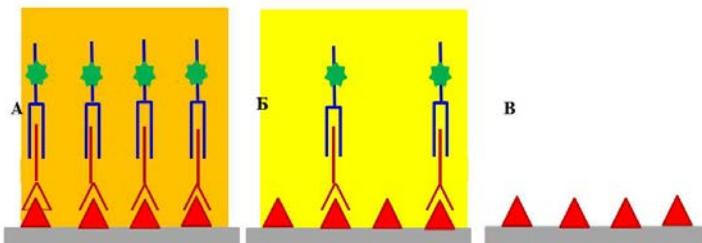
2. В лунки (в дубли или триплеты) вносят исследуемый материал – сыворотку крови. При наличии антигенспецифических антител она связывается с сорбированным на дне лунки антигеном. То есть иммунный комплекс фиксируется ко дну лунки. Количество соединившихся с антигеном антител и, соответственно, количество фиксированных иммунных комплексов определяется уровнем антител, содержащихся в исследуемых образцах (А, Б). Если антител в исследуемом образце нет, то антиген остаётся свободным, фиксированные иммунные комплексы не образуются (В).



3. Для выявления связавшихся с антигеном антител используют конъюгат. Он представляет собой антитела к Fc-фрагменту антител человека определённого класса, ковалентно связанный с ферментом.



4. В лунки вносят раствор субстрата для фермента. Систему «фермент–субстрат» подбирают таким образом, чтобы действие фермента по преобразованию субстрата сопровождалось появлением окраски раствора.



5. Чем больше антител в исследуемом материале, тем больше связалось фермента, тем больше преобразовалось субстрата и тем насыщеннее цвет жидкости в лунке.

Таким образом, в ИФА создаётся возможность количественного определения антител в исследуемом материале. Для регистрации результатов применяют специальный планшетный спектрофотометр. Для количественного определения уровня антител необходимо использовать стандарт с известным содержанием антител к антигену-диагностическому. Для избегания неопосредованной взаимодействием антиген–антитело фиксации компонентов ИФА после каждой стадии проводят процедуру отмывания (трижды), внося в каждую лунку 250 мкл отмывающего буфера, и удаляют отмывающий буфер стряхиванием.

Определение общего IgE методом иммуферментного анализа в сыворотке крови человека

1. Приготовление растворов из концентратов согласно инструкции, прилагаемой к ИФА набору: раствор для промывания планшетов, конъюгат МКАТ с пероксидазой (Кг-Е), субстрат-хромогенную смесь.

2. Внесение калибрующих и исследуемых проб: Во все лунки стрипов внести по 95 мкл промывающего раствора. Внести по 5 мкл калибраторов (КА-КЕ) в 6 лунок. В остальные лунки внести по 5 мкл исследуемых сывороток. Рекомендуется ставить дублирующие пробы калибраторов и исследуемых образцов. Время внесения проб в один планшет не должно превышать 10 минут.

3. Инкубация: закрыть планшет, предварительно перемешав его содержимое мягким пепетированием, и инкубировать в течение 20 мин при +37 °С.

4. Промывание планшетов: по окончании инкубации содержимое лунок удалить путем стряхивания. Во все лунки планшета внести по 160–200 мкл

промывающего раствора и инкубировать в течение 1 минуты. Процедуру промывания повторить 3 раза.

5. Внесение конъюгата МКАТ: во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора конъюгата.

6. Инкубация: закрыть планшет, предварительно перемешав его содержимое, и инкубировать в течение 15 мин при +37°C.

7. Промывание планшетов – промыть 4-кратно (см. пункт 4).

8. Проявление реакции субстрат-хромогенной смесью: во все лунки планшета внести по 100 мкл субстрат-хромогенной смеси. Инкубировать при температуре +18–22 С в защищенном от света месте в течение 10 минут.

9. Остановка реакции: во все лунки планшета внести по 50 мкл 2N серной кислоты.

10. Регистрация результатов.

Измеряют оптическую плотность (ОП) содержимого лунок на фотометре при длине волны 492 нм. По значениям ОП и известным концентрациям калибраторов (см. табл. 6.1) строят калибровочный график.

Таблица 6.1

Содержание IgE в калибраторах, выраженное в КЕ/л

Калибратор	КА	КБ	КВ	КГ	КД	КЕ
КЕ/Л	0	10	27	105	245	690

По значениям ОП для исследуемых сывороток с помощью калибровочного графика определить содержание в них IgE в КЕ/л.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Изучить методику постановки реакции связывания комплемента.

2. Провести зарисовку демонстрационного образца РСК, учесть реакцию, определив титр антител и, проанализировав реакцию, дать по ней заключение.

3. Освоить методику постановки ИФА (для определения концентрации IgE).

4. Поставить ИФА, провести регистрацию результатов, сформировать калибровочный график и определить расчётным путём концентрацию IgE в исследуемых образцах сыворотки крови.

5. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.

2. Краткое описание этапов постановки РСК и ИФА.

3. Результаты исследований (схема постановки реакции связывания комплемента и иммуноферментного анализа, зарисовка результатов, приведение расчётных данных).

4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Динамика развития гуморального иммунного ответа.
2. Понятие первичного и вторичного иммунного ответа.
3. Изменение аффинности антител в процессе иммунного ответа.
4. Диагностическое значение определения иммуноглобулинов и антигенспецифических антител.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 446–476.

Лабораторное занятие № 7

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови

Цель работы: изучить методические подходы к определению популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови человека.

Оборудование, приборы, принадлежности: холодильник, термостат, центрифуга, микроскоп, механический счётчик клеток, штативы для пробирок, камера Горяева, предметные стёкла, камера для фиксации микроскопических препаратов, автоматические дозаторы и наконечники к ним, забуференный фосфатами изотонический раствор хлорида натрия, суспензия эритроцитов барана, 3%-ная уксусная кислота с метиленовым синим, краситель Романовского-Гимзы.

I. Теоретическая часть

Лимфоциты являются особым классом клеток, для которых характерно разнообразие по выполняемым функциям, что составляет основу субпопуляционного различия. Между тем, морфологических отличий у лимфоцитов разных субпопуляций практически нет при том, что для лимфоцитов и их субпопуляций характерна определённая степень полиморфизма.

Визуально при микроскопическом исследовании окрашенных препаратов лимфоцитов можно отличить лишь некоторую часть лимфоцитов – натуральных киллеров и плазматические клетки (рис. 7.1).

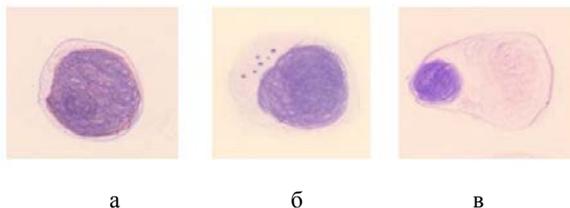


Рисунок 7.1 – Некоторые морфологические особенности лимфоцитов:
а – лимфоцит, б – большой гранулярный лимфоцит (NK-лимфоцит),
в – плазматические клетки

В качестве одного из подходов в дифференцировке лимфоцитов по популяциям и субпопуляциям бытовал цитохимический метод, позволяющий отличать клетки по ферментам, присутствующих внутри клетки. Были выявлены ферменты, характерные преимущественно для Т-хелперов и других субпопуляций лимфоцитов. Но, помимо трудоёмкости этого метода, для него характерна и ограниченность получаемой информации: лимфоциты облада-

ют более разнообразными функциями, которые не соотносятся с наличием того или иного, определяемого цитохимически, фермента.

Постепенно в иммунологии формировалось направление, предполагающее исследование и идентификацию мембранных, а позже и внутриклеточных, молекул-маркёров. Это направление получило название «иммунофенотипирование».

Имунофенотипирование – это установление мембранных маркёров клеток. Мембранные маркёры представляют собой гликопротеиновые, гетеропептидные и др. молекулы, экспрессируемые на цитоплазматической мембране клеток. Мембранные маркёры функционально активны. Каждая такая молекула связывается с соответствующим ей лигандом (свободно циркулирующей молекулы или мембранной молекулой другой клетки). В результате связи мембранного маркёра со своим лигандом клетка изменяет своё функциональное состояние.

Выяснилось, что лимфоциты разных субпопуляций и разного функционального состояния отличаются экспрессией разных маркёров (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Маркёры основных популяций и субпопуляций лимфоцитов

Клетки	Маркеры (указаны по системе CD – cluster of designation)	
	Виды	Функции
Т-лимфоциты	CD2	Адгезия (лиганд к CD58); участие в активации
	CD3	Часть рецепторного комплекса TCR - CD3
	CD 5	Костимуляция Т-лимфоцитов. Лиганд CD72
	CD6	Адгезия, активация Т-лимфоцита
	CD7	FcγR. Передача сигнала
	CD4/CD8	Корецептор Т-хелперов Лиганд MHC-II
В-лимфоциты	CD19	Часть корецептора В-лимфоцита
	CD 20	Ca ²⁺ - канал. Регуляция активации В-лимфоцита
	CD21	Часть корецептора В-лимфоцита CR2; лиганд C3d, EBV
	CD 22	Адгезия В-лимфоцита на Т-лимфоцитах и моноцитах
	CD 72	Лиганд CD5. Участие в активации В-лимфоцита

Продолжение табл. 7.1

Клетки	Маркеры (указаны по системе CD – cluster of designation)	
	Виды	Функции
NK-лимфоциты	CD2	Адгезия (лиганд — CD58); участие в активации
	CD7	FcγR. Передача сигнала
	CD 11b CD11c	α-Субъединицы β ₂ -интегринов; b-ICAM-1, iC3b, c- фибриногена
	CD56	Медиатор цитотоксичности. Адгезия. Изоформа N-CAM
Активированные лимфоциты и моноциты	CD 25	α-Цепь рецептора ИЛ-2
	CD 30	Костимуляция
	CD54	Адгезия; лиганд β ₂ -интегринов
	CD 60	NeuAc-NeuAcGal эпитоп гликопротеинов
	CD 69	Передача сигнала. Ранний маркер активации
	HLA-DR, DQ, DP	Молекулы главного комплекса гистосовместимости
	CD 71	Трансферриновый рецептор пролиферирующих клеток

В наши дни иммунофенотипирование осуществляется с помощью моноклональных антител, получаемых на основе особых иммунобиотехнологических методик и специфичных конкретным маркерам. Такие моноклональные антитела при добавлении к суспензии клеток связываются лишь с теми лимфоцитами, которые экспрессируют данный маркер. Для визуализации этого взаимодействия, а значит для отнесения лимфоцита к той или иной субпопуляции, моноклональные антитела ковалентно связывают с флуорохромной меткой (рис. 7.2).

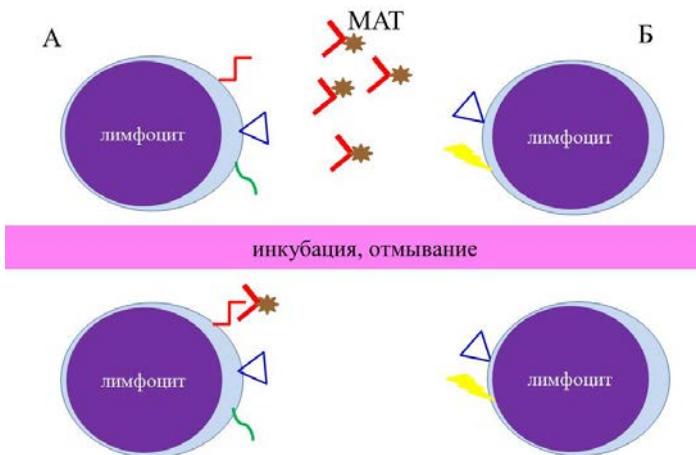


Рисунок 7.2 – Маркирование лимфоцитов моноклональными антителами (реакция прямой иммунофлуоресценции, РИФ)

К суспензии лимфоцитов добавляют меченные флуорохромоммоноклональные антитела (МАТ) к определённому маркёру лимфоцитов. Моноклональные антитела связываются только с теми лимфоцитами (в данном случае с А), которые экспрессируют маркёр, соответствующий данному моноклональному антителу. Отмывание суспензии клеток избавляет её от несвязавшихся с клетками антител, и суспензия готова к регистрации результатов с помощью люминесцентного микроскопа (свечение даст только лимфоцит А) или с помощью проточного лазерного цитофлуориметра

Таким образом, результаты реакции (реакции прямой иммунофлуоресценции) регистрируют по световому сигналу, испускаемому клеткой после облучения ее квантами света с определенной длиной волны (длина волны определяется особенностями поглощения флуорохромов). Результаты исследования регистрируют с помощью лазерного проточного цитофлуориметра или люминесцентного микроскопа.

Ранее (до середины 80-х годов 20 века) принадлежность лимфоцитов к той или иной субпопуляции лимфоцитов определяли с помощью реакций розеткообразования. Эти реакции отличаются ограниченными возможностями (можно определить лишь небольшой спектр мембранных маркёров), высокой степенью субъективизма (из-за рутинной регистрации – с помощью обычного светового микроскопа), невысокой воспроизводимостью результатов, а также достаточно трудоемкими процедурами подготовки образцов к исследованию. Поэтому реакции розеткообразования имеют преимущественно историческое значение.

Феномен розеткообразования заключается в адгезии к лимфоциту эритроцитов других видов млекопитающих. Эта адгезия осуществляется вследствие сродства эритроцитов некоторым мембранным рецепторам (маркёрам) лимфоцитов. Если к лимфоциту прикрепилось не менее 3 эритроцитов, то такой лимфоцит относят к розеткообразующим (рис. 7.3).

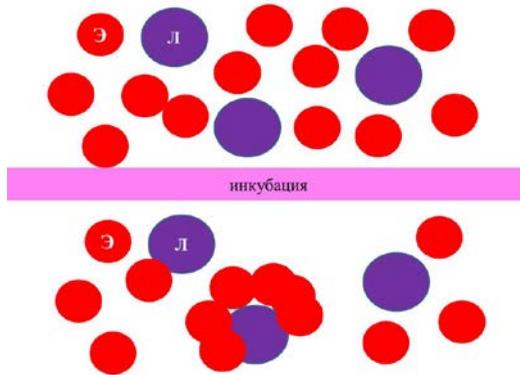


Рисунок 7.3 – Феномен образования розеткообразующей клетки (Е-РОК): суспензию лимфоцитов (Л) смешали с суспензией эритроцитов (Э) барана. После инкубации микроскопически определяют розеткообразующие клетки, то есть такие лимфоциты, к которым прикрепилось не менее 3 эритроцитов

Изначально экспериментальным путем было обнаружено, что Т-лимфоциты способны прикреплять к своей цитоплазматической мембране эритроциты барана. В дальнейшем рецептор к эритроцитам барана был идентифицирован как CD2-маркёр. Таким образом, смешивание лимфоцитарной суспензии с суспензией эритроцитов барана дает возможность отличить Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер CD2, а данная реакция получила название реакции Е-розеткообразования (Е – эритроцит). Точнее, реакция Е-розеткообразования позволяет дифференцировать субпопуляцию Е-РОК (розеткообразующих клеток).

Затем было обнаружено, что В-лимфоциты экспрессируют рецептор к С3-компоненту комплемента (по современной классификации это CD21-маркёр). Для его определения (а значит для идентификации субпопуляции В-лимфоцитов) была разработана методика ЕАС-розеткообразования. Данная аббревиатура – «эритроцит – антитело – комплемент» – означает, что на эритроцитах барана или быка создается специальный комплекс. Суспензия эритроцитов обрабатывается антителами к эритроцитам (этот процесс называется сенсibilизацией), а затем – комплементом, получаемым из сыворотки крови морских свинок или других видов животных. Таким образом, эритроцит по сути является антигеном, с которым связывается антитело, а этот комплекс в свою очередь способен запускать классический путь активации системы комплемента. Все ингредиенты этой реакции подбираются таким образом, чтобы активация комплемента не проходила полно-

стью (иначе будет разрушен эритроцит), а лишь способствовала бы фиксации СЗ на комплексе антиген–антитело. Дальнейшее смешивание суспензии лимфоцитов с суспензией сенсibilизированных антителами и компонентом эритроцитов дает возможность идентификации ЕАС-РОК, являющихся В-лимфоцитами.

Реакции розеткообразования дают возможность идентификации только части популяции Т-клеток (не все Т-лимфоциты экспрессируют CD2) и части популяции В-лимфоцитов (CD21 является маркером только зрелых В-лимфоцитов). NK-лимфоциты невозможно определить с помощью реакции розеткообразования. Поэтому при начале работ по иммунофенотипированию количество NK-лимфоцитов определяли по отсутствию маркеров, характерных для Т-лимфоцитов (в Е-РОК), и маркеров В-лимфоцитов (в ЕАС-РОК). Эти клетки долгое время обозначали как 0-лимфоциты.

Проведение реакций иммунофенотипирования лимфоцитов

1. Реакция прямой иммунофлуоресценции.

Реакцию проводят на выделенной из крови суспензии мононуклеаров в концентрации $2,5-5,0 \times 10^6$ клеток/мл или с использованием цельной крови.

1. В пластиковую пробирку (12×75 мм) вносят 100 мкл крови, добавляют 10 мкл МАТ, меченных флуорохромом, тщательно перемешивают и инкубируют в темноте при комнатной температуре 30 минут.

2. В образец вносят лизирующий эритроциты раствор (0,84 M NH₄Cl в буферном растворе) на 3–5 минут, затем добавляют 2 мл PBS.

3. Центрифугируют пробирку, отбирают супернатант, а к осадку клеток добавляют 0,5 мл 2 %-ного раствора параформальдегида.

4. Регистрируют реакцию на проточном цитофлуориметре.

2. Реакция розеткообразования.

Для проведения реакции розеткообразования нужно изолировать суспензию лимфоцитов из периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографин.

1. Эритроциты барана отмывают три раза и готовят 0,5 %-ную суспензию.

2. В пробирке смешивают в равных объемах суспензию выделенных лимфоцитов (2×10^6 /мл) и эритроцитов барана.

3. Смесь инкубируют при 37 °С 5 минут.

4. Центрифугируют при 1000 об/мин. в течение 5 минут.

5. Инкубируют при 4 °С 60 минут (в холодильнике).

6. Фиксируют смесь путем добавления 0,1 мл 0,8 %-ного раствора глutarового альдегида.

7. Из полученной смеси готовят мазки, фиксируют их в метаноле или смеси Никифорова и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Учет результатов проводится под иммерсионной системой микроскопа с увеличением 10×90.

Подсчитывается количество лимфоцитов, фиксирующих на своей поверхности 3 и более эритроцита (на 200 лимфоцитов). Пересчет их на абсолютное число осуществляется по формуле:

$$\frac{\text{абсолютное количество лейкоцитов} \times \% \text{ лимфоцитов} \times \% \text{ E-РОК}}{10\,000}$$

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методику прямой РИФ.
2. Освоить методику реакции розеткообразования.
3. Провести микроскопический учет реакции розеткообразования и прямой РИФ.
4. Провести расчёты для определения количества розеткообразующих лимфоцитов в исследуемом образце.
5. Изучить демонстрационные препараты. Зарисовать и дать по ним заключение.
Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
 2. Краткое описание механизмов и этапов проведения реакций розеткообразования и РИФ.
 3. Результаты исследований (микроскопическое изучение препаратов с их зарисовкой и заключением).
 4. Выводы.
- Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Морфо-функциональная характеристика лимфоцитов.
2. Субпопуляции лимфоцитов, их распределение в периферической крови и тканях.
3. Мембранные рецепторы лимфоцитов и их значение для идентификации лимфоцитов.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 298–338.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 92–143.
4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 53–72.
5. Плейфэр, Дж. Наглядная иммунология: пер. с англ. / Дж. Плейфэр – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – С. 24–27.

Лабораторное занятие № 8

Оценка функциональной активности лимфоцитов периферической крови в реакции бластной трансформации

Цель работы: изучить методические подходы к оценке функциональной активности лимфоцитов в феноменологии индуцированной бласттрансформации.

Оборудование, приборы, принадлежности: холодильник, CO₂-инкубатор, ламинарный бокс, спиртовка, термостат, центрифуга, микроскоп, механический счётчик клеток, штативы для пробирок, камера Горяева, 96-луночные полистироловые планшеты, автоматические дозаторы и наконечники к ним, забуференный фосфатами изотонический раствор хлорида натрия, митогены в рабочей концентрации, питательная среда RPMI-1640 (рабочая), 3%-ная уксусная кислота с метиленовым синим, краситель Романовского-Гимзы.

I. Теоретическая часть

О функциональной активности Т- и В-лимфоцитов можно судить по ответу в реакции бластной трансформации лимфоцитов. Бластная трансформация лимфоцитов – это переход клетки в митотический цикл после воздействия на нее активирующих факторов. Морфологически этот процесс сопровождается значительным увеличением размеров лимфоцита, увеличением его ядра, изменением ядерно-цитоплазменного соотношения. При этом бласттрансформированная клетка начинает пролиферировать, что можно зарегистрировать по скорости синтеза ДНК. Таким образом, один и тот же процесс – ответ лимфоцита на активирующее воздействие – можно регистрировать микроскопически, определяя процент бласттрансформированных клеток (тогда реакция называется реакцией бласттрансформации), или по включению меченых радиоактивным изотопом нуклеотидов, позволяющих оценить скорость синтеза ДНК (в этом случае реакция называется пролиферативным тестом).

Индукторами пролиферативной активности (или бласттрансформации лимфоцитов) могут быть:

1) митогены растительного происхождения – фитогемагглютинин (ФГА), конканавалин А, митогенфитолакки (PWM), связывающиеся через определенные рецепторы лимфоцитов и способствующие их пролиферации. Эти митогены активируют преимущественно Т-лимфоциты, а митогенфитолакки – и Т- и В-лимфоциты;

2) бактериальные полисахариды и липополисахариды (ЛПС), являющиеся тимуснезависимыми антигенами, стимулирующими пролиферацию В-лимфоцитов;

3) специфические антигены, активирующие строго определенные клоны лимфоцитов соответственно Т-клеточному рецептору.

Перечисленные активаторы вносят в суспензию иммунокомпетентных клеток, инкубируют 3–10 суток и определяют уровень пролиферации клеток.

Регистрацию пролиферативной активности осуществляют по включению меченого тритием тимидина или др. методами.

Условия получения лимфоцитов. Пролиферативные тесты проводят на суспензии изолированных на градиенте плотности фиколл-верографин из периферической крови лимфоцитах или на образцах цельной крови. Выбор исследуемого материала обусловлен целями проведения исследования.

Проведение реакции

Методы оценки функциональной активности лимфоцитов технически и организационно сложны. Поэтому при освоении этих методов рекомендуется стадия предварительной работы, в рамках которой исследователь организывает и проходит все этапы проведения реакции, чтобы избежать путаницы и ошибок при постановке реакции.

Шаг 1. Ознакомьтесь со схемой проведения пролиферативного теста (рис. 8.1):

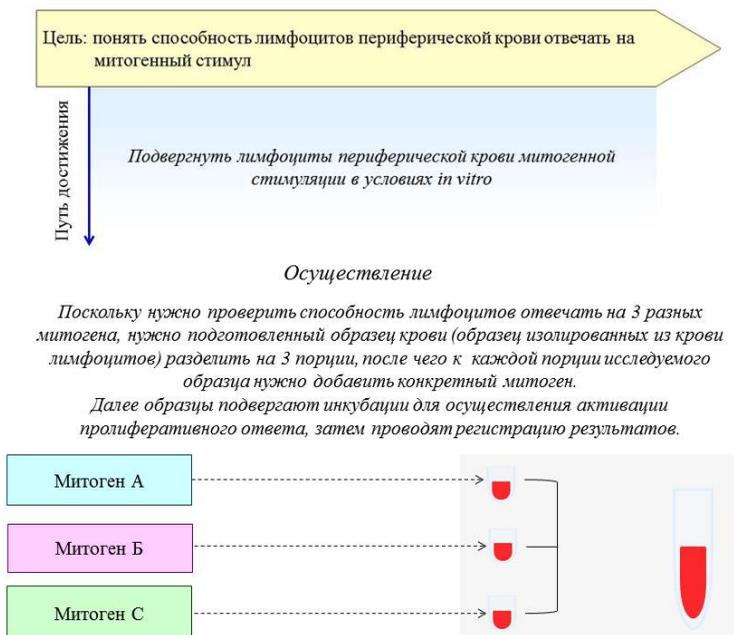


Рисунок 8.1 – Схема проведения пролиферативного теста

Учтите, что вы осваиваете готовую методику. Это означает, что в научной литературе, посвящённой этому методу исследования, есть готовые протоколы проведения этого метода, в которых указаны концентрации митогенов, дозы, в которых они добавляются к суспензии лимфоцитов, и многие

другие технические детали. Если же исследователь сам разрабатывает метод, то он должен работать над каждым этапом реакции, исследуя оптимальность режима воздействия на клетки и дозы вносимых реагентов.

Изучив схему проведения метода оценки пролиферативной активности лимфоцитов, попробуйте понять, какое оснащение нужно для этой реакции:

Пункт 1. Лабораторная посуда. Пролиферативный тест проводится на небольшом объёме исследуемого материала (100 мкл крови или суспензии лимфоцитов с концентрацией лимфоцитов в образце 2×10^6 клеток/мл). Такой объём определяется рядом факторов:

а) результаты пролиферативного теста и реакции бласттрансформации лимфоцитов предполагают оценку изменений всех клеток, подвергшихся стимулирующему воздействию митогена. Это означает, что количество подвергаемых активации митогенами клеток не должно быть чрезмерным. Например, в реакции бласттрансформации при микроскопическом учёте результатов визуальной регистрации нужно подвергнуть каждую из имеющихся в реакционной смеси клеток;

б) в образце крови обследуемого пациента или донора изучают несколько показателей, каждый из которых требует определённое количество исследуемого материала. Это регламентирует возможность проведения определённого количества тестов, что вынуждает использовать минимальное количество исследуемого материала для каждого теста.

Такой небольшой объём исследуемого материала не требует использования пробирок. В ряде случаев можно применить пластиковые микропробирки, но лучше – отдельные полистироловые стрипы или 96-луночные планшеты.

Пункт 2. Дозаторы и наконечники к ним. Выбираются, исходя из используемых объёмов. Максимальный объём вносимого материала и реактивов – 100 мкл.

Пункт 3. Определение количества лабораторной посуды для проведения исследования пролиферативной активности лимфоцитов 1 образца крови. Исследование митоген-стимулирующего действия митогена проводится в 3 повторах (триплетах). Поскольку обычно оценивается эффект нескольких митогенов (чаще всего 3), то количество пробообразцов при исследовании одного образца лимфоцитов (крови) достигает 9 ($3 \text{ митогена} \times 3 \text{ повтора}$).

Проведение пролиферативного теста подразумевает и ряд контролей: а) контроль спонтанной пролиферации лимфоцитов (также в триплете); б) контроль стерильности растворов митогенов ($3 \times 3 = 9$); в) контроль стерильности полной питательной среды (в триплете).

Таким образом, исследование пролиферативной активности 1 образца лимфоцитов (или образца периферической крови) предполагает $9 + 3 + 9 + 3 = 24$ пробообразца. Это количество пробообразцов составляет три 8-луночных стрипа, два 12-луночных стрипа или $\frac{1}{4}$ часть 96-луночного планшета. Если исследование проводится на 96-луночном планшете, то он

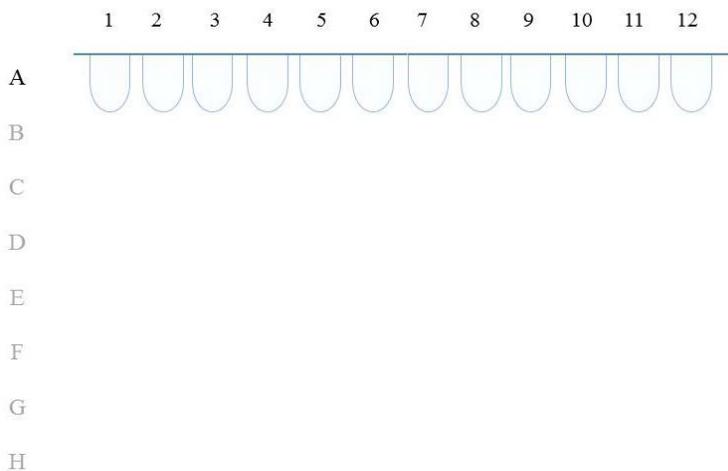
вместит не 1 образец исследуемого материала, а больше. Кроме этого, при использовании 96-луночного планшета закладывается только 1 комплект контролей. Что позволяет исследовать на одном 96-луночном планшете до 6–7 исследуемых образцов лимфоцитов.

Каждый реагент вносится в пробообразцы отдельным наконечником. То есть, для исследования 1 образца лимфоцитов (периферической крови) необходим 1 наконечник для дозатора для внесения полной питательной среды, по 1 наконечнику для внесения каждого митогена, 1 наконечник для внесения исследуемого образца, то есть 5 наконечников.

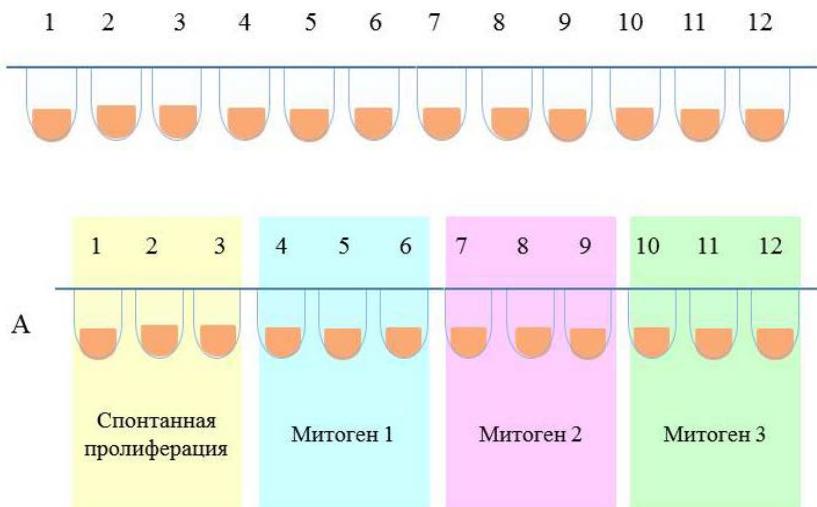
Обычно отдельно готовят рабочие концентрации митогенов (ФГА в конечной концентрации – 2,5–20 мкг/мл, PWM – 5–10 мкг/мл, ЛПС – 5–10 мкг/мл), а также полную питательную среду следующего состава – RPMI 1640 – синтетическая питательная среда, разработанная специально для культивирования клеток крови человека, эмбриональная телячья сыворотка – источник естественных ростовых факторов и белка для придания оптимального онкотического давления (5 % от общего объема среды), раствор антибиотиком и антимикотиков для предотвращения развития бактерий и грибов (в рабочих концентрациях).

Проведение реакции оценки пролиферативной активности лимфоцитов (1 образца крови или суспензии изолированных из крови лимфоцитов):

1. Выберите в 96-луночном планшете ряд лунок для исследования образца крови. Пусть это будет ряд А. Любой ряд 96-луночного планшета включает 12 лунок, то есть такого ряда достаточно, чтобы внести все опытные пробообразцы (стимулированные митогенами лимфоциты) и пробообразцы спонтанной пролиферации.



2. В каждую лунку ряда А внесите по 100 мкл ППС (полной питательной среды).



3. Установите планшет на выполненный из цветной бумаги трафарет. Он поможет вам не запутаться при внесении необходимых реагентов. В качестве трафарета можно использовать и разлинованный лист бумаги.

4. В лунки 1–3 внесите ещё по 50 мкл ППС – это спонтанная пролиферация лимфоцитов.

В лунки 4–6 внесите по 50 мкл рабочего раствора митогена 1 (ФГА).

В лунки 7–9 внесите по 50 мкл рабочего раствора митогена 2 (PWM).

В лунки 10–12 внесите по 50 мкл рабочего раствора митогена 3 (ЛПС).

Теперь в каждой лунке находится 150 мкл реакционной среды. Можно приподнять планшет на уровень глаз и проверить, одинаков ли уровень жидкости в лунках.

5. Внесите в каждую лунку по 100 мкл суспензии лимфоцитов (или цельной крови) с концентрацией клеток 2×10^6 клеток/мл.

6. Аналогично сформируйте ряд контролей, замещая объём клеточной суспензии питательной средой, то есть каждая лунка контроля митогена должна содержать 200 мкл ППС и 50 мкл рабочего раствора соответствующего митогена. Контроль ППС содержит 250 мкл ППС.

7. Пробообразцы культивируют в течение 30 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$.

8. Осуществляют внесение метил- ^3H -тимидина для регистрации уровня синтеза ДНК в клетках. Метил- ^3H -тимидина вносят в каждую лунку из расчета 37 кБк на лунку (реактив разводят на ППС) и продолжают культивирование ещё 18 часов.

9. Клетки переносят на бумажные фильтры с помощью специального прибора (харвестера) или вручную. Фильтры отмывают, помещают в специальные флаконы со сцинтилляционной жидкостью и регистрируют радиоактивность образцов в β -счетчике.

10. На основе полученных данных проводят расчет индексов пролиферации (ИП) по формуле:

$$\text{ИП} = \beta\text{А (митоген)} / \beta\text{С (интактные)},$$

где $\beta\text{А}$ (митоген) – активность изотопа, характеризующая пролиферативную активность мононуклеаров при стимуляции митогенами, $\beta\text{С}$ (интактные) – активность изотопа, характеризующая спонтанную пролиферативную активность лимфоцитов.

Показатели пролиферативной активности

В норме индекс стимуляции составляет для:

ФГА min – до 10,

ФГА оптимальный – 20–100,

PWM – 5–10,

ЛПС – 3–5.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить методические подходы для изучения пролиферативной активности лимфоцитов.

2. Сделать расчёт необходимой лабораторной посуды и оборудования для постановки пролиферативного теста с несколькими образцами (по указанию преподавателя).

3. Зарисовать схему постановки пролиферативного теста.

4. Поставить реакцию митоген-стимулированной пролиферации лимфоцитов с соблюдением правил работы в стерильных условиях.

5. Изучить методику конечных этапов проведения пролиферативного теста. Ознакомиться с протоколами регистрации реакции и рассчитать пролиферативный индекс при стимуляции лимфоцитов разными митогенами.

6. Изучить демонстрационные препараты бласттрансформированных лимфоцитов. Зарисовать и дать по ним заключение.

7. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.

2. Краткое описание этапов проведения пролиферативного теста.

3. Результаты исследований (схема постановки пролиферативного теста, расчётные данные, зарисованные микроскопические демонстрационные препараты, заключение по ним).

4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Стадии дифференцировки и пролиферации лимфоцитов.
2. Факторы дифференцировки Т-лимфоцитов.
3. Факторы активации Т-лимфоцитов.
4. Субпопуляции Т-лимфоцитов и их функции.

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М. : ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 314–338.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 146–157.
4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 69–78.

Лабораторное занятие № 9

Методы диагностики аллергических заболеваний

Цель работы: освоить методические подходы диагностики аллергических реакций и заболеваний.

Оборудование, приборы, принадлежности: микроскоп, демонстрационные препараты, тест-системы для определения общего и аллергенспецифического иммуноглобулина E, ситуационные задания, аллергограммы.

I. Теоретическая часть

Диагноз аллергического заболевания устанавливается на основании клинических признаков, характерных для аллергии, и лабораторных тестов.

Лабораторные тесты позволяют определить, является ли предполагаемое вещество аллергеном для данного пациента, а также установить механизм аллергии.

Все лабораторные методы по установлению аллергена можно разделить на методы *in vivo* (выполняются при непосредственном введении аллергена пациенту) и *in vitro* (у пациента забирают биологический материал, в котором определяют маркеры аллергии).

При постановке тестов *in vivo* в организм пациента вводят небольшую дозу предполагаемого аллергена и учитывают ответную реакцию на аллерген. Фактически этот подход может спровоцировать приступ аллергии, что ограничивает в ряде ситуаций диагностику. Тесты *in vitro* позволяют установить наличие антигенспецифических антител класса IgE в крови или другом биологическом материале (моче, бронхоальвеолярном смыве и проч.) и подтвердить наличие аллергии без риска для здоровья пациента. В то же время, тесты *in vivo* отличает невысокая стоимость и высокая степень достоверности, тогда как аллергодиагностика *in vitro* требует значительных финансовых затрат, наличия специального оборудования для регистрации реакции.

Тесты, позволяющие выявлять сенсибилизацию к аллергену

Скарификационные кожные пробы. Одновременно можно поставить до 10 кожных проб с различными аллергенами. Проба проводится на внутренней поверхности предплечья по средней линии после предварительной обработки кожных покровов 70 % раствором спирта. Насечки на поверхности кожи наносят на расстоянии 5 см (в строгом соответствии с маркировкой) стерильными скарификаторами, отдельными для каждого. С помощью положительной пробы с гистамином оценивается нормальная реактивность кожных покровов. На 5 см выше проводится тест с контрольной жидкостью (контроль отрицательной реакции). Аллергены наносятся в соответствии с маркировкой на расстоянии 5 см. Капли испытуемых растворов наносят на

кожу и в капле стерильным скарификатором, отдельным для каждого аллергена, делают две параллельные царапины длиной до 5 мм. Реакцию немедленного типа определяют через 20 минут (табл. 9.1).

При аллергических заболеваниях кожи пробы ставят на участках, не затронутых повреждением (спине, животе, бедре).

Капельные и аппликационные пробы. Аллергены при аппликационных тестах применяют в чистом виде или в растворах, в концентрациях, не вызывающих раздражения кожи у здоровых людей. При постановке теста на предварительно обработанную 70 % спиртом кожу предплечья наносят каплю аллергена (капельная проба) или накладывают кусочек марли размером около 1 см, смоченный раствором аллергена (аппликационная проба), фиксируют ее лейкопластырем. Через 24–48 ч оценивают реакцию, измеряя диаметр волдыря или гиперемии (табл. 9.1). Если реакция появляется раньше 24 ч, и появляются такие симптомы, как зуд, жжение, отек, местное повышение температуры и др., марлю с аллергеном снимают раньше (при появлении выраженных симптомов реакции).

При отсутствии реакции через 48 ч проба считается отрицательной.

Таблица 9.1

Оценка скарификационных и внутрикожных аллергических проб

Реакция	Условные обозначения	Характеристика реакции при проведении	
		внутрикожных аллергических проб	скарификационных аллергических проб
Отрицательная	–	Размеры, как в контроле	
Сомнительная	±	Волдырь рассасывается медленнее, чем в контроле	Гиперемия без волдыря в месте скарификации
Слабоположительная	+	Волдырь 4–8 мм, кожа вокруг гиперемирована	Волдырь 2–3 мм виден только при натягивании кожи
Положительная средней степени	++	Волдырь 8–15 мм, кожа вокруг гиперемирована	Волдырь не более 5 мм отчетливо виден без натягивания кожи, окружен гиперемией

Реакция	Условные обозначения	Характеристика реакции при проведении	
		внутрикожных аллергических проб	скарификационных аллергических проб
Резкоположительная	+++	Волдырь 15–20 мм с псевдоподиями, кожа вокруг гиперемирована	Волдырь не более 10 мм с гиперемией кожи и псевдоподиями
Очень резкоположительная	++++	Волдырь более 20 мм с псевдоподиями, дочерними волдырями с яркой гиперемией кожи	Волдырь более 10 мм с гиперемией кожи и псевдоподиями

Проба уколом (prick-test) – удобный и весьма чувствительный метод определения сенсibilизации. При его проведении используется стандартный набор разового применения, позволяющий сделать укол кожи иглой с ограничителем на глубину 1 мм. Проба уколом осуществляется через каплю испытуемого аллергена, каплю растворителя (для аллергена) и каплю 0,1 % раствора гистамина. Расстояние между каплями не менее 2–4 см. Максимальная реакция на гистамин считывается через 10 мин, на пыльцовые аллергены – через 15 мин. Реакцию оценивают так же, как и результат скарификационных проб.

Внутрикожные пробы. Внутрикожные тесты более чувствительны, чем скарификационные, но менее специфичны. Применяют их, главным образом, для выявления сенсibilизации к аллергенам бактериального и грибкового происхождения. С неинфекционными аллергенами их проводят только в том случае, когда аппликационные или скарификационные тесты отрицательны или сомнительны, а анамнез четко положительный.

Обследованию с инфекционными аллергенами подлежат больные с подозрением на инфекционно-аллергическую форму бронхиальной астмы, крапивницы и т. д. Специфическое обследование таких пациентов представляет определенные трудности в связи с тем, что основное заболевание часто имеет непрерывно рецидивирующее течение, а также в связи с наличием множественных очагов хронической инфекции.

В нижнюю треть волярной поверхности предплечья на расстоянии 5 см от лучезапястного сустава вводят тест-контрольную жидкость в количестве

0,02 мл, затем отдельными стерильными шприцами туберкулинового типа вводят каждый аллерген в объеме 0,02 мл на расстоянии 5 см один от другого. Результаты реакции немедленного типа регистрируют через 20 мин (табл. 9.1).

Провокационные аллергические тесты

В отдельных случаях при проведении кожных проб реакция может быть ложноположительной из-за крайне высокой чувствительности капилляров кожи к механическому раздражению или консерванту (фенолу). В связи с этим прибегают к высокоспецифичным провокационным аллергическим тестам.

Конъюнктивальный провокационный тест применяют для диагностики аллергического конъюнктивита и выявления аллергенов, вызывающих его развитие.

Техника проведения такова: в конъюнктивальный мешок, отодвинув нижнее веко, закапывают 1–2 капли тест-контрольной жидкости. При отсутствии изменений конъюнктивы через 15–20 мин переходят к исследованию с аллергеном. Аллерген (1–2 капли) закапывают в концентрации, которая дала слабopоложительную кожную пробу. При положительной реакции проявляются слезотечение, гиперемия конъюнктивы, зуд век.

Назальный капельный тест может использоваться при сезонном рините в случаях сенсибилизации к пыльце растений, при круглогодичном рините с подозрением на аллергию к бытовой пыли. Проводят в период ремиссии.

Вначале в одну половину носа пипеткой капают 3 капли тест-контрольной жидкости. Если в течение 15 мин отсутствует реакция со стороны слизистой оболочки носа, можно приступить к назальному провокационному тесту с предполагаемым аллергеном. Тест проводится с аллергеном в концентрации, при которой была получена сомнительная реакция в ответ на внутрикожное тестирование, объем аллергена – 3 капли. Если через 10–15 мин получена отрицательная реакция, концентрацию аллергена увеличивают. Тест считается положительным, если после закапывания аллергена в полости носа появляется заложенность носа, ринорея, чиханье.

Провокационная ингаляционная проба проводится в фазе ремиссии заболевания в условиях стационара, чаще при отрицательных результатах скарификационных тестов с аллергенами в диагностике бронхиальной астмы в основном с целью дифференциальной диагностики (бронхиальная астма, обструктивный бронхит и т. п.).

Перед постановкой теста предварительно регистрируют параметры функции внешнего дыхания (объем форсированного выдоха в течение первой секунды, жизненную ёмкость лёгких и др.). Исходный уровень объема форсированного выдоха в течение первой секунды должен быть не менее 70 % от должного значения.

Вначале проба проводится с тест-жидкостью – дистиллированной водой, в течение 3 мин. При отрицательном результате приступают к провокационной пробе с испытуемым аллергеном в течение 3 мин (время проведения пробы было окрашено при положительных результатах). Проба считается положительной при изменении аускультативной картины – удлинении выдоха, появление сухих свистящих хрипов на выдохе, снижение ЖЕЛ на 10 %, ФОВ – на 15–20 %.

Провокационный ингаляционный тест с карбахолином (ацетилхолином) используется для подтверждения диагноза бронхиальной астмы.

Провокационный ингаляционный тест с холодным воздухом применяется для исследования неспецифической гиперреактивности бронхов.

Ингаляционная провокационная проба может сочетаться с лабораторными методами аллергодиагностики. Проведение до ингаляционной и через 24 часа после ингаляционной провокационной пробы исследования с помощью иммуноферментного анализа IgE или теста деструкции тучных клеток с тем же профессиональным аллергеном имеет важное практическое значение. Увеличение уровня IgE и процента дегрануляции тучных клеток через 24 часа после провокационной ингаляции в значительной мере повышает достоверность полученных положительных результатов.

Подъязычный провокационный тест используется для диагностики пищевой и лекарственной аллергии. Аллерген наносится на слизистую оболочку подъязычной области. При пищевой аллергии применяются натуральные продукты в разведении 1:10, при лекарственной – $1/8-1/4$ разовой дозы растворенного вещества. Тест считается положительным при появлении в подъязычной области гиперемии, отека, зуда, а также при учащении пульса, чиханье, кашле.

Лабораторные методы аллергодиагностики

Эти методы могут широко использоваться при аллергических заболеваниях в фазе обострения, в период массивного контакта с аллергеном, при высокой чувствительности заболевших к аллергену, при наличии противопоказаний, у детей, при идентификации профессиональных аллергических заболеваний, так как исключают возможность появления неспецифических, ложноаллергических реакций.

К методам, выявляющим **аллергические реакции немедленного, В-зависимого типа, относятся:**

- а) определение общего IgE (однако, его высокий уровень может быть и в продуктивной фазе иммунного ответа);
- б) определение аллерген-специфических IgE и IgG4.

Уровень IgE и IgG4 определяются методом ИФА (см. лаб. занятие № 6).

Выявление IgE и IgG4 проводится в отношении более чем 400 аллергенов, включающих пищевые аллергены; аллергены бактерий и грибов, шерсти и перхоти животных, перьев птиц; аллергены пыльцы трав и деревьев; аллер-

гены клещей, домашней и библиотечной пыли, ядов насекомых; лекарственные и профессиональные аллергены.

В настоящее время разработаны тест-системы, позволяющие осуществлять множественную диагностику специфических IgE. **Множественный аллергосорбентный тест** с применением хемилюминесцентного анализа (MAST-CLA, или аллерготест МАСТ) позволяет одновременно определить до 36 аллергенов, используя малый объем сыворотки (0,75 мл). Для проведения теста используется МАСТ-аллергопанель, представляющая собой полый прозрачный пластмассовый корпус с параллельно расположенными внутри тончайшими целлюлозными нитями, на которых сорбированы аллергены (рис. 9.1).

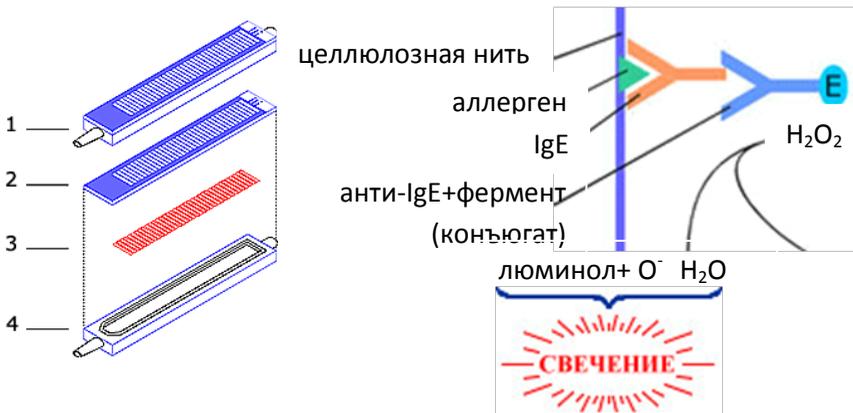


Рисунок 9.1 – Принцип хемилюминесцентного анализа при проведении МАСТ:
 1 – МАСТ-панель в сборе, 2 – крышка,
 3 – целлюлозные нити с адсорбированным аллергеном, 4 – корпус

Сущность аллерготеста МАСТ заключается в проведении реакции связывания аллергена со специфическим IgE с последующим мечением образовавшегося комплекса фотореагентом и определением его свечения, интенсивность которого пропорциональна концентрации специфического IgE в сыворотке пациента. МАСТ аллергопанель заполняется (обычным шприцом) сывороткой пациента, инкубируется при комнатной температуре 16–24 часа. Затем после промывания панели обычной дистиллированной водой с буфером, она заполняется конъюгатом (анти-IgG, меченые пероксидазой) и инкубируется в течение 4 часов. Далее после промывания панель заполняется фотореагентом и анализируется в люминометрах. Прибор регистрирует класс величин от 0 до 4 в соответствии с уровнем люминесценции от каждой индивидуальной нити панели. Эти классы соответствуют классам кожных

проб. Уровни IgE, соответствующие классам аллергии МАСТ и показаниям люминометра, представлены в табл. 9.2

Таблица 9.2

Интерпретация результатов при проведении множественного аллергосорбентного теста

МАСТ класс	Считываемые величины, LU	Уровень аллерго-специфических IgE	Концентрация IgE, нг/мл
4	>242	Очень высокий	>24,00
3	143–242	Высокий	>12,00
2	66–142	Средний	>6,00
1	27–65	Низкий	>1,68
1/0	12–26	Очень низкий	>0,52
0	0–11	Неопределяемый	0

Наряду с выявлением специфических IgE используются и другие лабораторные тесты для диагностики как антителозависимых реакций, так и реакции замедленного типа. Данные методы позволяют изучить особенности патогенеза аллергических реакций. К ним относятся:

- реакция дегрануляции тучных клеток или базофилов,
- реакция торможения миграции лейкоцитов крови (РТМЛ),
- реакция повреждения нейтрофилов (РПН),
- определение свободного связанного гистамина,
- определение ИЛ 4,5,6, TGFβ,
- определение триптазы и химотриптазы (триптаза, особенно β-форма, может быть обнаружена в крови через 4 ч после анафилактической реакции и служит клиническим маркером анафилаксии),
- определение лейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄) с помощью клеточно-го теста высвобождения медиаторов,
- определение количества активированных базофилов, экспрессирующих на поверхности антиген CD63 (gp53) в ответ на стимуляцию аллергеном (цитометрический аллергенстимулирующий клеточный тест, ЦАСК-тест).

Определение этих показателей позволяет понять индивидуальные особенности течения аллергических реакций, что важно для лечения пациента.

Клеточный тест высвобождения медиаторов основан на определении сульфидолейкотриенов (LTC₄, LTD₄, LTE₄), секретлируемых базофилами под действием аллергена *in vitro* (рис. 9.2). Его также называют провокационным тестом *in vitro*. Благодаря синтезу сульфидолейкотриенов *de novo* этот тест обладает более высокой специфичностью по сравнению с классическим тестом высвобождения гистамина. Протокол исследования включает три этапа:

- 1) выделение популяции лимфоцитов из стабилизированной ЭДТА крови,
- 2) стимуляция лимфоцитарной суспензии специфическими аллергенами,

3) иммуноферментный анализ синтезированных базофилами лейкотриенов во время стимуляции.

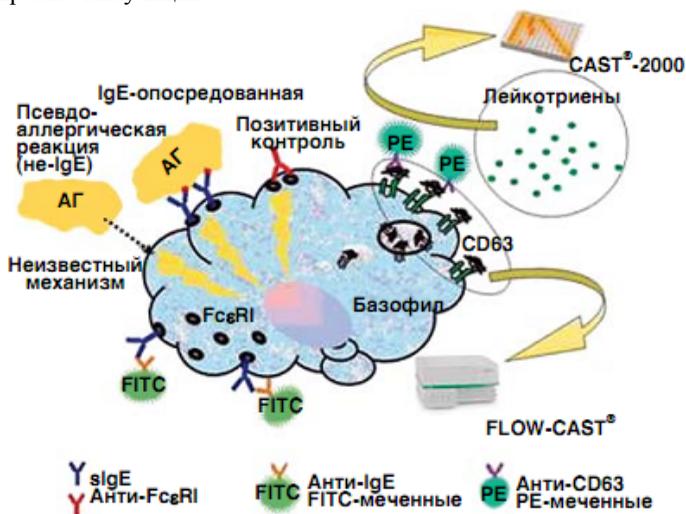


Рисунок 9.2 – Принцип тестов антигенной стимуляции базофилов:

PE– фикоэритрин, FITC–флуоресцеинизотиоцианат, CAST CellularAntigenStimulationTest) – клеточный тест высвобождения медиаторов, FLOW-CAST – цитометрический антиген стимулирующий клеточный тест (ЦАСК-тест)

Тест считается положительным для пищевых, ингаляционных аллергенов, латекса, ядов насекомых при определении уровня лейкотриенов 200 пкг/мл; для лекарственных аллергенов, а также пищевых и химических добавок 40 пкг/мл.

Цитометрический вариант теста стимуляции базофилов – **цитометрический антиген, стимулирующий клеточный тест** (ЦАСК-тест) позволяет определить количества активированных базофилов, экспрессирующих на поверхности антиген CD63. Этапы выделения лимфоцитов и стимуляции их антигенами для обоих вариантов (иммуноферментного и цитометрического) идентичны. Но вместо сульфидолейкотриенов на третьем этапе определяется количество активированных базофилов, экспрессирующих на поверхности антиген CD63 (gp53) в ответ на стимуляцию аллергеном. Тест высокочувствителен и специфичен при реакциях анафилактического типа, особенно при лекарственной гиперчувствительности.

При ЦАСК-тесте выделенные лейкоциты инкубируют со стимулирующим буфером и аллергеном. Затем добавляют анти-IgE моноклональные Ат с флуоресцентной меткой для идентификации базофилов, после чего добавляют моноклональные Ат к CD63 (см. рис. 9.2), и на поверхности базофилов определяют экспрессию CD63 АГ методом проточной цитометрии. Напри-

мер, для пищевых и ингаляционных аллергенов тест считается положительным при экспрессии CD63 на поверхности 15 % базофилов; для ядов насекомых – 10 %; бета-лактамных антибиотиков и анальгетиков – 5 % базофилов и индекс стимуляции 2. Рассчитывают индекс стимуляции, определяемый как отношение CD63⁺ базофилов в пробе с аллергеном (в %) к количеству этих клеток в пробе без аллергена (в %).

ЦАСК-тест специфичен для определения IgE-опосредованной аллергии к ингаляционным аллергенам (когда кожные пробы нельзя проводить из-за опасности развития спазмы бронхов и астматического статуса), пыльцевым, лекарствам, бета-лактамным антибиотикам, миорелаксантам, анальгетикам, аллергии к латексу, укусам перепончатокрылых насекомых, псевдоаллергических реакций к противовоспалительным нестероидным препаратам, индуцированным компонентами комплемента, плазмой, определение аутоантител к IgE. Результаты ЦАСК-теста хорошо коррелируют с результатами кожных проб.

Оба теста высокоспецифичны для диагностики пищевой аллергии и непереносимости, ингаляционной аллергии, когда кожные тесты не могут быть использованы (при аллергии на латекс, укусы перепончатокрылыми насекомыми, аллергии у детей, лекарственной аллергии и непереносимости, различных псевдоаллергических реакций).

Применение ЦАСК-теста и клеточного теста высвобождения медиаторов в диагностике пищевой аллергии и непереносимости, псевдоаллергических реакций может быть использовано для составления гипоаллергенной и элиминационной диеты.

Диагностика псевдоаллергических реакций. Псевдоаллергические реакции по клинической симптоматике могут быть сходны с истинными IgE-опосредованными реакциями, но отличаются по механизму развития. Их развитие не связано с выработкой Ат или участием сенсibilизированных лимфоцитов, в патогенезе этих реакций выделяют только две стадии – патохимическую и патофизиологическую. В связи с этим у таких пациентов в сыворотке крови обычно концентрация IgE находится в пределах нормы.

Однако при псевдоаллергических реакциях происходит неспецифическое высвобождение медиаторов: гистамина, лейкотриенов, простагландинов. Поэтому для диагностики псевдоаллергических реакций используются ЦАСК-тест для выявления активированных базофилов и клеточные тесты высвобождения медиаторов для установления концентрации LTC₄, LTD₄ и LTE.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Зарисовать схему стадий развития аллергической реакции.
2. Зарисовать схему фаз стадии разрешения аллергии.
3. Провести регистрацию результатов ИФА-определения аллергенспецифического IgE с расчётом результатов по калибровочному графику.

4. Решить ситуационные задачи.
5. Проанализировать аллергограммы.
6. Зарисовать демонстрационные препараты (дегрануляция тучных клеток, повреждение нейтрофилов в одноимённом тесте)
7. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
2. Краткое описание стадий аллергической реакции с приведением схемы 3 фаз стадии разрешения.
3. Результаты исследований (зарисовка результатов ИФА-анализа с приведением калибровочного графика и расчётных данных, зарисовка демонстрационных препаратов дегрануляции тучных клеток и повреждения нейтрофилов).
4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Классификация аллергенов.
2. Аллергия: стадии и фазы.
3. Аллергены, свойства, классификация аллергенов. Пути проникновения в организм.
4. Иммунологическая, патохимическая и патофизиологическая фазы стадии разрешения аллергии

Список литературы:

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 607–630.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 377–385.
4. Зайков, С. В. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний / С. В. Зайков, А. Е. Богомолов, О. К. Яковенко // Клиническая иммунология.
5. Аллергология. Инфектология. – 2013. – № 2 (спец. выпуск) – Режим доступа: http://kiai.com.ua/img/tab1/Spec_2_2013/Zaukov.pdf.

Лабораторное занятие № 10

Методы диагностики аутоиммунных заболеваний

Цель работы: освоить реакции, отражающие патогенез и применяемые в диагностике аутоиммунных заболеваний.

Оборудование, приборы, принадлежности: автоматические дозаторы, тест-системы для определения ревматоидного фактора, С-реактивного белка, образцы крови и сывороток крови.

I. Теоретическая часть

При диагностике аутоиммунных заболеваний (АИЗ) используются следующие группы тестов:

- тесты, позволяющие обнаружить эффекторные механизмы и факторы, специфичные для АИЗ (в том числе аутоантитела и аутореактивные клоны лимфоцитов). Они обладают простотой в постановке (рутинностью) и высокой степенью ассоциации с поражениями тканей. К числу *рутинных* относятся определение концентрации С-реактивного белка, ревматоидного фактора, антинуклеарных аутоантител (ANA) и С3-компонента комплемента. Эти маркеры аутоиммунного процесса позволяют с достаточной точностью поставить диагноз и оценить активность патологического процесса;

- тесты, предназначенные для определения структурно-функциональных характеристик иммунокомпетентных клеток. Они имеют вспомогательное для постановки диагноза значение, но важны для контроля эффективности терапии, а также для уточнения патогенеза заболевания.

Помимо специальных иммунологических тестов обязательно исследование общего анализа крови, мочи, белков острой фазы и других биохимических показателей с учетом клиники (тяжесть, острота, осложнения), проводимых в динамике заболевания и терапии.

Определение антинуклеарных аутоантител (ANA) с помощью иммунофлуоресцентного метода

Принцип иммунофлуоресценции. Молекулы иммуноглобулинов способны необратимо связываться с некоторыми химическими веществами без потери своей антительной специфичности и свойства связываться с антигеном. Для такого мечения можно использовать красители, флуоресцирующие при облучении их коротковолновым светом (ультрафиолетовым, фиолетовым, синим), например изотиоцианат флуоросцеина (FITC), дающий зеленовато-желтое окрашивание.

Иммунофлуоресценция – чувствительный и достаточно простой тест. В качестве субстрата при непрямой иммунофлуоресценции применяется монослой фиксированных и пермобилизованных клеток-мишеней, нанесенных на стеклянные пластинки (слайды). Слайды инкубируют с сывороткой

больных, и при наличии соответствующих Ат в тестируемой сыворотке происходит взаимодействие Аг–Ат. После первой инкубации клетки промываются, чтобы избавиться от несвязавшихся Ат, и вторично инкубируются с моноклональными Ат IgG человека, меченными FITC. Оценка результатов производится с помощью микроскопии в люминесцентном режиме при увеличении в 400 раз (см. рис. 10.1). Для определения типа свечения и спектра аутоАТ используют соответствующие контрольные сыворотки и стандарты, содержащие определенные Ат.

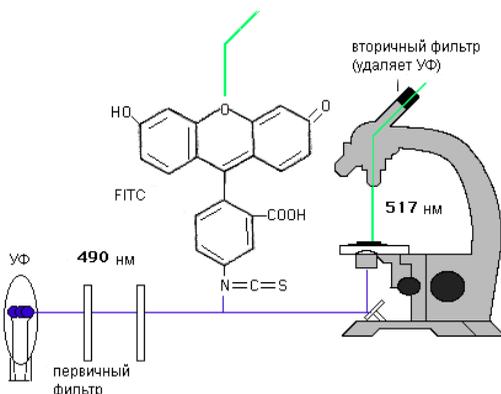


Рисунок 10.1 – Принцип флуоресцентной микроскопии

Метод непрямой иммунофлуоресценции – качественный и полуколичественный. Оцениваются интенсивность свечения, тип флуоресценции и титры. Интенсивность свечения определяется 1+, 2+, 3+, 4+ по шкале интенсивности (4+ – положительный контроль набора). Полуколичественная оценка получается серией разведений тестируемой сыворотки до конечной точки, при которой флуоресценции не наблюдается.

Антинуклеарные АТ (antinuclearantibodies, ANA) – гетерогенная группа аутоАт, преимущественно класса IgG, реагирующих с различными компонентами ядра (ДНК, гистонами, РНК, центромерами и др.) и цитоплазматическими антигенами. Выявление ANA методом непрямой иммунофлуоресценции позволяет диагностировать аутоиммунную патологию и проводить дифференциальную диагностику на ранних этапах между системными заболеваниями соединительной ткани (СЗСТ) и неаутоиммунными заболеваниями при схожей клинической картине. Кроме того, на основе данного метода, в зависимости тех или иных аутоАт в сыворотке крови больных можно проводить дифференциальную диагностику внутри группы СЗСТ.

Наиболее часто для их определения используется тест непрямой иммунофлуоресценции. Для постановки реакции непрямой иммунофлуоресценции в качестве субстрата для аутоАт используют Нер-2 клетки, культуру эпителиальных клеток ларингокарциномы человека. И ядро, и нуклеолы в этих

клетках большие, хорошо распознаются, в них хорошо различаются ядерные структуры. Нер-2-клетки могут быть применены для определения как ядерных, так и цитоплазматических АГ. Живые Нер-2 клетки, находящиеся в интерфазе клеточного цикла, нанесены монослоем на слайды и позволяют выявлять аутоантитела к 30 различным нуклеарным и цитоплазматическим структурам. В настоящее время известно более 100 разновидностей ANA.

Чаще всего в сыворотке больного содержится более чем одно специфическое Ат, что проявляется смешанными типами флуоресценции. При трудности описания типа свечения проводится дальнейшее разведение тестируемой сыворотки, что позволяет уточнить наличие тех или иных Ат. Определение аутоАт, выявляемые в сыворотки крови больных, на Нер-2-клетках дают соответствующие типы свечения. Различают шесть основных типов иммунофлуоресцентного свечения:

1. *Гомогенное свечение* (см. рис.10.2А) – однородное диффузное свечение внутри ядра с окрашиванием нуклеолей или без них. Данный тип свечения обусловлен наличием Ат к оцДНК, дцДНК, гистонам. Наиболее часто наблюдается при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, ювенильном ревматоидном артрите, лекарственной волчанке.

2. *Периферическое ядерное* (см. рис. 10.2В) – равномерное гомогенное свечение с кольцевидным свечением по периферии ядра. Характерно при наличии Ат к дцДНК, белкам, составляющим интегральную часть ядерной мембраны (ламини А, В, С) или против интегральных белков ядерно-порового комплекса GP210.

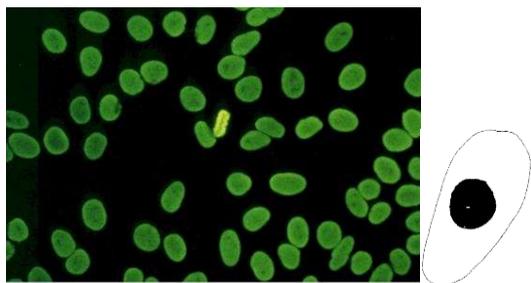
3. *Спектральное (крапчатое ядерное) свечение* (см. рис. 10.2С) характеризуется крапчатым или зернистым свечением всей нуклеоплазмы. Ат, дающие такое свечение, направлены против большого семейства негистоновых АГ. Может быть от мелкоточечной (тонкой) зернистости до крупных гранул, одинаковой либо различной формы. Это свечение наблюдается при связывании Ат с компонентами ядерного матрикса: гетерогенным ядерным рибонуклеопротеидом (hnRNP), U1-RNP/Sm. Также это свечение дают Ат к SS-A/Ro и SS-B/La, встречаемые при синдроме Шегрена.

4. *Нуклеолярное свечение* (см. рис. 10.2D) – свечение нуклеолей, наблюдается при наличии Ат к фибрилрину (одному из белков, связывающихся с U3 малым рибонуклеопротеидом), РНК-полимеразе-1 и ДНК-топоизомеразе-1 (Scl-70), нуклеолину или РМ/SclАг. Выявление таких аутоАт характерно для прогрессирующей системной склеродермии.

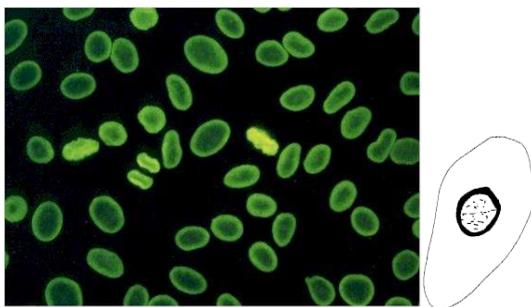
5. *Центромерное* (дискретное пятнистое) – однородное дискретное свечение локализуется повсюду внутри ядра, обычно кратное число пятнышек приблизительно 46 (40–60 зернышек в ядре). Данный тип свечения связан с Ат к центромерам хромосом. Встречается при системной склеродермии, первичном билиарном циррозе.

6. *Цитоплазматическое свечение* может быть разнообразного характера: рибосомальным, лизосомальным, митохондриальным или тонкозерни-

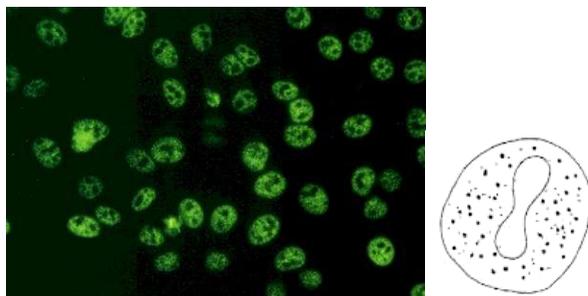
стым. Например, тонкие гранулы, располагающиеся вокруг ядра и уменьшающиеся по направлению к периферии цитоплазмы, свидетельствуют о наличии Ат к аминоксил-тРНК-синтетазе (Jo-1) (см. рис. 10.2Е). Такие аутоАт встречаются при дерматомиозите.



А

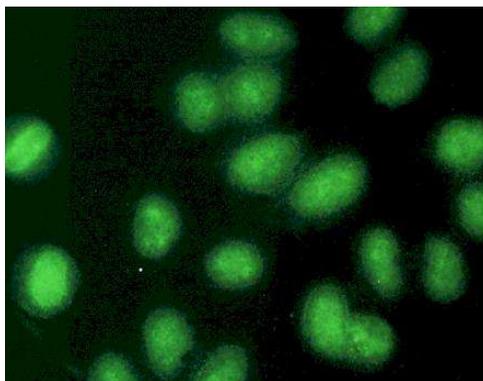


В

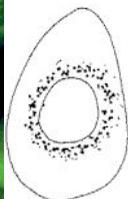
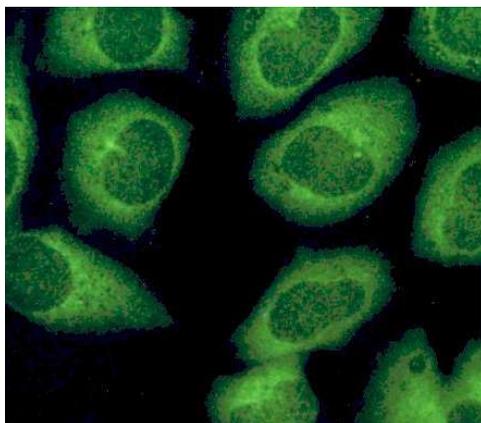


С

Рисунок 10.2 – Типы иммунофлуоресцентного свечения при использовании HEp-2-клеток: А – гомогенный тип свечения (анти-ssDNA Ат); В – периферическое ядерное свечение (анти-dsDNA Ат); С – крапчатое ядерное свечение (анти-Sm Ат); D – нуклеолярное свечение (анти Scl-70 Ат); Е – цитоплазматическое свечение (антиJo-1 Ат)



D



E

Рисунок 10.2 – Типы иммунофлуоресцентного свечения при использовании HEp-2-клеток (продолжение)

Проведение реакции при определении ANA

1. Развести концентрат фосфатного буферного раствора (PBS). 1 часть конц. PBS + 19 частей дистиллированной воды. Хранить только 1 мес. при температуре 2–80 °С. Например: 5 мл концентрата + 95 мл воды.

2. Развести сыворотки:

а) скрининг (разведение 1:40, например, 25 мкл + 975 мкл PBS),

б) титрование (серия разведений 1:40, далее 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 и т. д., например: 500 мкл сыворотки разведенной 1:40 + 500 мкл PBS дает разведение 1:80 и т. д.).

3. Развести концентрат фосфатного буферного раствора (PBS). 1 часть конц. PBS + 19 частей дистиллированной воды. Хранить только 1 мес. при температуре 2–80 °С. Например: 5 мл концентрата + 95 мл воды.

4. Развести сыворотки:

а) скрининг (разведение 1:40, например, 25 мкл + 975 мкл PBS),

б) титрование (серия разведений 1:40, далее 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 и т. д., например: 500 мкл сыворотки разведенной 1:40 + 500 мкл PBS дает разведение 1:80 и т. д.).

5. Достать слайды из пакета и дать достичь комнатной температуры (+18–20 °С) в течение 30 мин. Затем положить слайды во влажную камеру и добавить одну каплю каждого разведения и контролей в 1, 2 и 3 лунку соответственно. Добавить 25 мкл разведенной сыворотки пациента в оставшиеся лунки.

6. Слайды инкубировать в течение 30 мин во влажной камере при комнатной температуре.

7. Достать слайды из влажной камеры и промыть, окунув в PBS, в течение 5–10 минут. Промывать осторожно, не направлять струю прямо на лунки при промывке пипеткой.

8. Добавить флуоресцирующий конъюгат: стряхнуть излишек PBS и промокнуть слайды фильтровальной бумагой (вокруг лунок). Возвратить слайды во влажную камеру, НЕМЕДЛЕННО в каждую лунку добавить по 1 каплю конъюгата. Высохший субстрат искажает результаты.

9. Инкубировать в течение 30 мин. во влажной камере при комнатной температуре в темноте.

10. Промыть слайды (см. пункт 7).

11. Оптимальное контрастирование: добавить 2–3 капли 1 % Эванс Блю в 100 мл PBS (до погружения слайдов в буферный раствор).

12. Достать слайды из буферного раствора. Быстро просушить вокруг лунок фильтровальной бумагой и добавить в каждую лунку по 1 капле среды для покрытия. Осторожно покрыть слайд покровным стеклом, избегая попадания пузырьков воздуха.

13. Смотреть под люминесцентным микроскопом.

Интерпретация результатов:

- Титры ANA, полученные при разведении тестируемой сыворотки, оцениваются следующим образом: до 1:80 – низкие титры; 1:160–1:640 – средние титры; более 1:640 – высокие титры. Титр ANA выше 1:80 считается предположительным для СЗСТ.

- Частота выявления определенных аутоАт к различным Аг при различных нозологических формах СЗСТ варьирует, так для системной красной волчанки более характерны АТ к дцДНК, для синдрома Шегрена – АТ к SS-A/Ro, а системной склеродермии – АТ к Scl-70.

- Уровень ANA отражает активность и характер течения СЗСТ. Существует прямая корреляционная зависимость между титрами ANA и активностью заболевания. Чем более агрессивнее протекает системная красная волчанка, тем выше уровень аутоАТ. Изменение титров ANA в динамике через 3,

6 и 12 месяцев служит одним из критериев оценки эффективности проводимой терапии.

Определение ревматоидного фактора (РФ)

Ревматоидный фактор (РФ) – это аутоантитела к Fc-фрагменту IgG. В сыворотке ревматоидный фактор обычно присутствует в виде комплекса с IgG.

Определение ревматоидного фактора играет важную роль в диагностике ревматоидного артрита, при котором наблюдаются значительные нарушения иммунной системы. Они обусловлены неполноценным иммунным ответом с образованием иммунных комплексов. В формировании последних основную роль играет РФ. Активность РФ может быть реализована через следующие патогенетические механизмы:

- 1) превращение растворимых иммунных комплексов в нерастворимые, которые не могут быть фагоцитированы;
- 2) стимуляция клеточно-опосредованных реакций;
- 3) превращение иммунных комплексов, не связывающих комплемент, в комплементсвязывающие.

Любые частицы, покрытые IgG, могут быть агглютинированы ревматоидным фактором. Первоначально для обнаружения ревматоидного фактора использовались покрытые антителами эритроциты барана или человеческие эритроциты группы 0 (Реакция Ваалера-Роза). В последующем их заменили частицами латекса, что повысило чувствительность метода.

Определения РФ с помощью латекс-теста

Метод основан на реакции агглютинации между РФ образца пациента или контрольной сывороткой и человеческим IgG, находящимся на полистироловых латексных частицах.

Исследование латекс-теста позволяет сделать полуколичественное определение РФ в неразбавленной сыворотке методом агглютинации латексных частиц. Метод удобен в использовании, экономически выгоден, время анализа – 2–3 минуты.

Условия проведения реакции

1. Перед постановкой реакции сыворотку пациента и набор выдержать в течение 30 мин. при комнатной температуре.
2. Нанести на слайд-стекло в отдельные лунки по капле:
 - сыворотку пациентов – 20 мкл;
 - положительный контроль – 20 мкл;
 - отрицательный контроль – 20 мкл.
3. Добавить в каждую лунку по 20 мкл латексного реагента (РФ-диагностикум).
4. Осторожно перемешать содержимое лунок стеклянной палочкой; результаты учесть в течение 2–3 мин.

Регистрация и интерпретация результатов:

- анализ образцов пациентов проводят после получения результатов отрицательного и положительного контролей;
- отсутствие агглютинации в сыворотке указывает на отсутствие РФ; отрицательным будет результат, содержащий в образце РФ менее 20 МЕ/мл;
- положительный: результат (четкая агглютинация) указывает на количественное содержание РФ в сыворотке пациента. При положительной реакции (четкая агглютинация) тест повторить, удваивая разведение сыворотки (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 и т. д.). Наибольшее разведение, при котором происходит агглютинация, считается титром реакции. В сыворотке диагностическим титром в реакции латекс – агглютинации считается 1:20;
- поскольку латекс-тест определения РФ – полуколичественный метод, то производят пересчет содержания РФ в МЕ/мл. Приблизительные значения РФ в международных единицах на мл соответствуют наивысшему разведению с положительным результатом, умноженному на 10. Например:

разведение	измерение	концентрация РФ, МЕ/мл
1/2	+	
1/4	+	$4 \times 10 = 40$ МЕ/мл
1/8	-	

- Концентрация РФ, превышающая 20 МЕ/мл в плазме, имеет диагностическое значение и свидетельствует о ревматоидном процессе.
- Диагностическое значение РФ состоит в том, что в высоких титрах (более 1:80) выявляется у 70–80 % пациентов с ревматоидным артритом (РА). Наличие РФ подтверждает клинический диагноз. Это легло в основу подразделения на серопозитивный (при наличии РФ) и серонегативный (при его отсутствии) РА. Наличие РФ свидетельствует о неблагоприятном течении болезни, быстром развитии эрозивно-деструктивного процесса, угрозе возникновения системных проявлений при РА. При этом обычно наблюдаются внесуставные проявления заболевания, например ревматоидные узелки, системный васкулит, синдром Шегрена. Ревматоидный фактор в сыворотке обычно появляется через 3–6 месяцев после начала ревматоидного артрита. У серопозитивных больных во время ремиссии титр ревматоидного фактора значительно снижается, хотя обычно не нормализуется.
- В низком титре (до 1:80) ревматоидный фактор выявляется у 5 % здоровых лиц моложе 60 лет и у 30 % – старше 80 лет. Ревматоидный фактор не специфичен для ревматоидного артрита и выявляется при других АИЗ, сопровождающихся поражением суставов, инфекционном эндокардите, некоторых хронических заболеваниях печени и идиопатическом фиброзирующем альвеолите.

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Освоить постановку латекс-теста для определения ревматоидного фактора.
2. Поставить латекс-тест с образцами сывороток крови, провести его учёт и проанализировать результаты.

3. Изучить, зарисовать и проанализировать демонстрационные препараты ANA.

4. Зарисовать схемы механизмов иммунопатологического повреждения тканей при аутоиммунных заболеваниях.

5. Сдать отчёт преподавателю и защитить его.

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.

2. Краткое описание этапов постановки латекс-теста для определения ревматоидного фактора.

3. Результаты исследований (схема постановки латекс-теста, результатов латекс-теста, микроскопическое изучение препаратов с их зарисовкой и заключением).

4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Аутоантигены и аутоантитела при аутоиммунных заболеваниях.

2. Механизмы формирования II, III, IV, V типов иммунопатологического повреждения тканей

3. Системная красная волчанка: иммунопатогенез, диагностика.

4. Ревматоидный артрит: механизм формирования синовита, диагностика

Список литературы:

1. Лекционный материал.

2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 588–607, 630–638.

3. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 228-241, С. 263-364.

4. Ройт, А. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – С. 411–487, 508–526.

5. Хаитов, Р. М. Иммунология / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович – М.: Медицина, 2000. – С. 308–315.

6. Autoantibody Atlas: Antinuclear Antibodies // IMMCO diagnostics–2014. –Mode of access: <http://www.immco.com/products/autoantibody%20atlas/files/immcoatlasv6revised62705.pdf>.

Лабораторное занятие № 11

Методы диагностики иммунодефицитов

Цель работы: изучить методические подходы диагностики иммунодефицитных состояний.

Оборудование, приборы, принадлежности: ситуационные задачи, иммунограммы, классификация иммунодефицитных состояний.

I. Теоретическая часть

Имунодефицитные состояния формируются либо в случае генетических дефектов иммунной системы (первичные иммунодефициты), либо в результате дисфункции иммунной системы различного уровня и степени выраженности в результате мощного антигенного воздействия (стресс, шок, вирусные и бактериальные инфекции и др., вторичные иммунодефицитные состояния (ИДС)). Уровень иммунокомпетентности организма определяет форму патологии, тяжесть и длительность процесса.

Классификация первичных иммунодефицитов (ПИД)

I. Недостаточность гуморального звена иммунитета (системы В-лимфоцитов):

1. Агаммаглобулинемия, сцепленная с полом (болезнь Брутона).
2. Дисгаммаглобулинемии:
 - а) селективный дефицит IgA;
 - б) дефицит иммуноглобулинов с повышенным уровнем IgM (гиперIgM-синдром);
 - в) дефицит субклассов IgG в сочетании или без недостаточности IgA;
 - г) общая вариабельная иммунологическая недостаточность (ОВИН).

II. Недостаточность клеточных иммунных реакций (системы Т-лимфоцитов):

1. Гипоплазия вилочковой и паращитовидной желез (синдром Диджорджи).
2. Лимфоцитарная дисгенезия (синдром Незелофа, французский тип ИДС).

III. Комбинированные ИДС (тяжелая комбинированная иммунологическая недостаточность – ТКИН):

1. Ретикулярная дисгенезия.
2. Наследственный алимфоцитоз (швейцарский тип ИДС).
3. Дефицит молекул МНС-II класса (синдром «голых» лимфоцитов).
4. Синдром Вискотта-Олдрича.
5. Атаксия-телеангиэктазия (синдром Луи-Бар).

IV. Недостаточность фагоцитоза:

1. Нарушение хемотаксиса, миграции и дегрануляции:
 - а) синдром Чедиака-Хигаси;
 - б) гиперIgE синдром;

- в) дефицит GP 110;
- г) дефект связывания актина.

2. Дефект эндоцитоза в клеточном распаде:

- а) хроническая гранулематозная болезнь;
- б) ферментопатии нейтрофильных гранулоцитов (дефицит миелопероксидазы, НАДН-оксидазы, глутатионпероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы).

3. Дефекты опсонизации и поглощения:

- а) дефекты опсонизации,
- б) дефицит тафтсина,
- в) отсутствие мембранных гликопротеинов LAF-1, CD 18, GP 150, Mac-1 и др.

V. ПИД при наследственных аномалиях обмена:

- 1. Дефицит аденозиндезаминазы (АДА).
- 2. Дефицит пуриноклеотидфосфорилазы (ПНФ).

VI. Нарушения в системе интерлейкинов и кооперации клеток в иммунном ответе:

- 1. Множественный дефицит Т-клеточных цитокинов.
- 2. Недостаточность продукции ИЛ-2.

VII. Врожденные дефекты системы комплемента:

- 1. Дефицит ингибитора C1.
- 2. Дефицит компонентов классического пути активации и др.

VIII. Патология местного иммунитета

Для диагностики иммунодефицитов применяют гематологические, биохимические, молекулярно-генетические и иммунологические методы. Иммунологические методы дают возможность исследования иммунного статуса. Под *иммунным статусом* понимают состояние иммунной системы человека в конкретный временной промежуток. Собственно лабораторное исследование иммунного статуса называют *иммунограммой*.

Лабораторная диагностика ИДС включает следующие основные методы:

- определение абсолютного и относительного количества популяций и субпопуляций В- и Т-лимфоцитов с помощью иммунофенотипирования (см. лаб. занятие 7);
- определение функциональной активности иммунокомпетентных клеток с помощью пролиферативных тестов (см. лаб. занятие 7);
- определения цитокинпродуцирующей активности клеток, определения миграционной активности клеток, определения цитотоксической активности клеток;
- определение сывороточных, секреторных Ig их классов (см. лаб. занятие № 5), субклассов;

- оценку состояния фагоцитов (см. лаб. занятие № 2), включая определение достаточности их факторов бактерицидности и других функциональных параметров (адгезия, хемотаксис);

- определение компонентов комплемента.

С учетом рациональности иммунодиагностики все лабораторные тесты принято организовывать в системе тестов двух уровней. Тесты 1 уровня позволяют установить выраженные изменения иммунного статуса, тогда как тесты 2 уровня способствуют изучению механизмов развития нарушений в иммунной системе. Соответственно, тесты 1 и 2 уровней различаются по стоимости, специфичности информации, технологичности и другим параметрам (табл. 11.1).

Таблица 11.1

Тесты 1 и 2 уровней

Тесты 1 уровня	Тесты 2 уровня
1. Определение количества лейкоцитов и лейкоцитарной формулы	
2. Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (CD3 для Т-лимфоцитов, CD4 – для Т-хелперов, CD8 – для Т-цитотоксических лимфоцитов. CD19 или 20 или 21 – для В-лимфоцитов CD56/16 – для NK-лимфоцитов)	Определение маркеров функциональной активности лимфоцитов, включая адгезивные молекулы, рецепторы к цитокинам, рецептор к трансферрину и др. (в зависимости от показаний)
	Определение функциональной активности лимфоцитов в тестах пролиферации, цитотоксичности, продукции цитокинов и др.
3. Определение концентрации IgG, IgA, IgM	Определение субклассов Ig и титра антигенспецифических антител. При показаниях – определение IgE (общего и антигенспецифического)
4. Определение фагоцитарной активности нейтрофилов с расчетом ФП и ФЧ	Определение миелопероксидазы и др. ферментных систем фагоцитов, определение хемотаксической и адгезивной активности нейтрофилов и др. функциональных параметров
5. Определение функциональной активности системы комплемента по CH50	Определение активности альтернативного пути активации системы комплемента, определение концентрации и функциональной активности отдельных компонентов

Результаты иммунологического исследования интерпретируются, учитывая нормативные показатели иммунной системы человека (см. табл. 11.2) и делается заключение.

Таблица 11.2

Нормативные показатели состояния иммунной системы у человека

Показатели	Физиологические значения
1. Лейкоциты	4,0–9,5 × 10 ⁹ /л
2. Нейтрофилы	50–77 %
3. Лимфоциты	18–38 %
4. Моноциты	2–10 %
5. Базофилы	0,5–1,0 %
6. Эозинофилы	1–4 %
7. IgM	0,8–2,0 г/л
8. IgG	8–13,0 г/л
9. IgA	1,4–3,0 г/л
10. IgE	0,00025 г/л (0–200 МЕ/мл)
11. IgD	0,03 г/л (20 МЕ/мл)
12. ЦИК (циркулирующие иммунные комплексы)	до 100 усл.ед.
13. ФЧ (фагоцитарное число)	1,0–2,5 (Candidaalbicans) 4,0–9,0 (стафилококк) 4,0–6,0 (латекс)
14. ФП (фагоцитарный показатель)	50–60 (Candidaalbicans) 60–80 (стафилококк) 60–80 (латекс)
15. Комплемент	20–50 ед
16. С1q	58–72 мг/л
17. С3	1,3–1,5 г/л
18. С4	150–450 мг/л
19. С5	51–77 мг/л
20. С9	47–69 мг/л
21. Пропердин	0,02 г/л
22. Т-лимфоциты, CD3 ⁺	65–80 %
23. Т-хелперы, CD4 ⁺	35–48 %
24. Т-киллеры, CD8 ⁺	20–30 %
25. Натуральные киллеры, CD16 ⁺	10–15 %
26. В-лимфоциты, CD20 ⁺	6–12 %

II. Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Изучить методические подходы диагностики иммунодефицитов.
2. Ознакомиться с предложенными ситуационными задачами и иммунограммами.
3. Определить отклонения, характер отклонений в предложенных иммунограммах, проанализировать их, сделать выводы.
4. Сдать отчёт преподавателю и защитить его. Освоить методику приготовления смыва микробной суспензии

III. Содержание отчёта

Отчёт должен быть представлен на отдельных листах формата А4 или в альбоме.

Отчёт должен содержать следующие пункты:

1. Цель работы.
2. Краткое описание методологии диагностики иммунодефицитов.
3. Результаты исследований (ситуационные задачи и иммунограммы, анализ их и выводы).
4. Выводы.

Отчёт на листе формата А4 (или в альбоме) сдаётся в конце работы преподавателю.

IV. Контрольные вопросы

1. Классификация, механизмы формирования первичных и вторичных иммунодефицитов.
2. Принципы диагностики иммунодефицитов.

Список литературы

1. Лекционный материал.
2. Ярилин, А. А. Иммунология: учебник / А. А. Ярилин – М.: ГЕОТАР-Медиа, 2010. – С. 646–700.
3. Хаитов, Р. М. Иммунология: учебник / Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатьева, И. Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – С. 267–308.
4. Новиков Д. К. Медицинская иммунология: учеб. пособие / Д. К. Новиков. – Минск: Выш. шк., 2005. – С. 190–208.
5. Плейфэр, Дж. Наглядная иммунология: пер. с англ. / Дж. Плейфэр – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – С. 84–88.

Оглавление

Список сокращений	3
Лабораторное занятие № 1	5
Введение в иммунологические исследования: основные процедуры иммунологического исследования	5
Лабораторное занятие № 2	20
Факторы видового иммунитета: фагоцитарная реакция. методы исследования фагоцитоза	20
Лабораторное занятие № 3	24
Гуморальные факторы видового иммунитета: система комплемента. методы изучения системы комплемента	24
Лабораторное занятие № 4	30
Взаимодействие антиген-антитело и методы его регистрации: агглютинация	30
Лабораторное занятие № 5	37
Взаимодействие антиген-антитело и методы его регистрации: преципитация, простая радиальная иммунодиффузия по манчини	37
Лабораторное занятие № 6	41
Взаимодействие антиген–антитело и методы его регистрации: реакции антиген–антитело, не дающие визуальных феноменов.....	41
Лабораторное занятие № 7	49
Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови	49
Лабораторное занятие № 8	56
Оценка функциональной активности лимфоцитов периферической крови в реакции бластной трансформации	56
Лабораторное занятие № 9	63
Методы диагностики аллергических заболеваний	63
Лабораторное занятие № 10	73
Методы диагностики аутоиммунных заболеваний.....	73
Лабораторное занятие № 11	82
Методы диагностики иммунодефицитов.....	82

Учебное издание

ИММУНОЛОГИЯ

Лабораторный практикум для студентов
3 курса специальностей
1-80 02 01 Медико-биологическое дело
1-33 01 05 Медицинская экология
1-33 01 01 Биоэкология

Редактор *А. В. Красуцкая*
Компьютерная верстка *М. Ю. Мошкова*
Корректор *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 12.03.2015. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная
Усл. печ. л. 5,5. Уч.-изд. л. 4,1.
Тираж 100 экз. Заказ № .

Республиканское унитарное предприятие «Критотех».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/277 от 07.04.2014.
Ул. Свердлова, 32а, 220006, г. Минск.
«Оргстрой» Открытое акционерное общество
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/167 от 01.10.2014.
Минск Берестянская, 16, 220034, г. Ул.