A microscopic image showing several cells. One cell in the foreground is large and purple, with a textured surface. Other cells are visible in the background, some in shades of blue and orange. The image is set against a light green background.

**МЕТОДЫ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**



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

МЕТОДЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лабораторный практикум

Минск
«ИВЦ Минфина»
2017

УДК 612.017:616(076)

ББК 28.073:53.4я7

М54

А в т о р ы:

кандидат медицинских наук, доцент *Т. Р. Романовская*;
доктор медицинских наук, доцент *М. М. Зафранская*;
кандидат биологических наук, доцент *Д. Б. Нижегородова*;
кандидат биологических наук *Т. В. Савицкая*;
старший преподаватель *Я. И. Мельникова*

Р е ц е н з е н т ы:

кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ
(кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой
микробиологии, вирусологии, иммунологии *Т. У. Канашикова*);
кандидат медицинских наук, доцент, заместитель заведующего кафедрой
клинической лабораторной диагностики Белорусской медицинской
академии последипломого образования *Л. И. Алехнович*

Методы иммунологических исследований : лабораторный
М54 практикум / Т. Р. Романовская [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина,
2017. – 100 с.

ISBN 978-985-7168-98-9.

Пособие содержит методические материалы для проведения лабораторных и практических занятий с обучающимися факультета экологической медицины. Помещены протоколы, схемы проведения исследований, список рекомендуемой литературы. В издании освещены основные современные методы сепарации, культивирования и фенотипирования клеток иммунной системы, а также серологические и иммунные методы.

Предназначается обучающимся специализации «иммунология» для специальностей первой (1-80 02 01 Медико-биологическое дело, 1-33 01 05 Медицинская экология) и второй (1-33 81 01 Прикладная иммунология) ступеней высшего образования, а также всем интересующимся вопросами данной науки.

УДК 612.017:616(076)

ББК 28.073:53.4я7

ISBN 978-985-7168-98-9

© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2017

Введение

Как известно, иммунология в процессе своего развития формировалась как наука экспериментальная. Поэтому разделы иммунологии, посвященные методам исследований, представляются чрезвычайно важными для формирования молодых специалистов, предполагающих связать свою дальнейшую карьеру с этой наукой. Помещенный в лабораторном практикуме методический материал охватывает значительный спектр методов и способов оценки параметров иммунной системы, наиболее распространенных и адаптированных для исследований иммунного статуса человека, то есть применимый в рамках клинической иммунологии.

Лабораторный практикум «**Методы иммунологических исследований**» содержит методический материал для проведения лабораторных и практических занятий. Включает лабораторные протоколы, схемы проведения исследований, список рекомендуемой для подготовки литературы. Значительное место уделено нормативной документации, касающейся организации иммунологических исследований, а также вопросов техники безопасности, оснащению лабораторий и алгоритмам закупки реактивов для исследования.

Методический материал практикума содержит информацию, имеющую самостоятельное значение и не дублируемую в лекционном материале. Каждая лабораторная работа предваряется целью, а также перечислением необходимого оборудования и принадлежностей. При подготовке к лабораторному занятию следует ознакомиться с теоретической частью соответствующей лабораторной работы, вернуться к материалу теоретического курса, что поможет в работе по контрольным вопросам. При выполнении лабораторной работы необходимо следовать порядку протокола осваиваемой реакции или метода, фиксируя информацию в рабочей тетради. В конце лабораторного занятия делаются заключения по работе и разбираются возможные ошибки.

Список использованных сокращений

CD	Кластеры дифференцировки
HLA	Человеческий лейкоцитарный антиген
Ig	Иммуноглобулин
Na-ФСБ	Натрий-фосфатный буфер
NK	Натуральные киллеры
RBC	Эритроциты
АГ	Антиген
МАК	Мембрано-атакующий комплекс
АТ	Антитело
В-Л	В-лимфоциты
ГКГС	Главный комплекс гистосовместимости
ИК	Иммунокомплекс
ИКК	Иммунокомпетентные клетки
ИЛ	Интерлейкин
ИНФ	Интерферон
ИФА	Иммуноферментный анализ
МАТ	Моноклональные антитела
МПА	Мясо-пептонный агар
НСТ	Нитросиний тетразолий
ПХ	Пероксидаза хрена
РБТЛ	Реакция бласттрансформации лимфоцитов
СК	Система комплемента
Т-Л	Т-лимфоциты
TNF	Фактор некроза опухоли

Лабораторная работа № 1

Организация исследования клеток и молекул иммунной системы. Виды биологических материалов, используемых для иммунологических исследований

Цель работы: освоение методов первичной обработки биологического материала, предназначенного для иммунологических исследований.

Оборудование, приборы, принадлежности: микроскоп, центрифуга, автоматические дозаторы, центрифужные пробирки, камера Горяева, автоматический счетчик клеток, градиент фиколл-верографин, дистиллированная вода, изотонический раствор NaCl, 3 % уксусная кислота с добавлением метиленового синего, краситель Романовского–Гимзы.

Практически все иммунологические методы проводятся для реализации задач в двух направлениях: научно-исследовательского и диагностического. Различия в спектре применяемых методов, реализуемых в рамках перечисленных направлений, связаны со стоимостью исследований, верифицированной диагностической значимостью лабораторных параметров, со скоростью выполнения исследований и стандартностью метода и воспроизводимостью результатов.

Оснащение иммунологической лаборатории. В соответствии с задачами исследования иммунодиагностическая лаборатория должна располагать широким спектром оборудованием и медицинского инструментария (рис. 1.1).

Алгоритмы приобретения реактивов и оборудования для научно-исследовательской или диагностической целей изучения клеток и молекул иммунной системы представлены в Приложении.

Техника безопасности. Работа в иммунодиагностической лаборатории требует выполнения правил техники безопасности и санитарии как общих для всех клиничко-диагностических лабораторий, так и специфических, связанных с иммунотипированием возбудителей инфекционных заболеваний (Приложение). Основы техники безопасности разрабатываются руководителем лаборатории на основании Постановления государственного комитета Республики Беларусь по труду и социальной защите населения от 14.06.1994 г. № 87.

Общие положения организации работы иммунологической лаборатории. Помещения клиничко-диагностической лаборатории можно использовать только по их прямому назначению, проведение в них каких-либо других работ не разрешается. Размещение клиничко-диагностической лаборатории в подвальных и полуподвальных помещениях запрещается. Лаборатория должна иметь 2 входа (служебный и для посетителей). Поверхности стен и потолков должны быть гладкими, допускающими легкую

очистку их от пыли или влажную уборку помещений. В лаборатории, где по условиям эксплуатации необходимо обеззараживание поверхности стен, производят облицовку глазурованной плиткой на высоту 1,6 м. Ширина основных проходов к рабочим местам или между двумя рядами оборудования должна быть не менее 1,5 м с учетом выступающих конструкций стен. Двери в производственных помещениях лабораторий должны открываться в сторону выхода из помещения. Полы в лабораторных помещениях покрываются линолеумом, в боксах – гладкой плиткой. В производственных помещениях лаборатории должны быть оборудованы водопроводные раковины с подводкой холодной и горячей воды для мытья рук персонала и раковины, предназначенные для мытья лабораторного инвентаря и посуды.

Мытье лабораторной посуды. Посуда для целей иммунодиагностики должна быть чистой физически, химически и бактериологически. Общие этапы подготовки посуды могут быть сведены к следующему: обеззараживание после контаминации микроорганизмами – обработка детергентами – стерилизация. Стеклопосуду моют различными способами:

1) очищают механическим путем с помощью ершей. После механической обработки посуду обрабатывают химическим путем: погружают в мыльный раствор, смешанный с раствором соды или тринатрийфосфата, на ночь;

2) погружают на ночь в 3–5 % гипохлорита натрия или 4–10 % перекиси водорода. В результате происходящей окислительной реакции от поверхности сосудов отслаиваются остатки органических загрязнений, что позволяет не применять механическую обработку ершом и избежать дополнительной деформации поверхности посуды;

3) для первичной обработки сильно загрязненной посуды, за исключением работы с культурами клеток, может применяться хромовая смесь.

Затем посуда моется горячим (+50–56 °С) раствором детергента с нейтральным значением pH-7.0. После мытья посуду необходимо прополоскать большим количеством горячей проточной воды (8–10-кратным объемом) и таким же объемом дистиллированной воды (допустимо замачивать посуду в дистиллированной воде, но не более, чем на 2 часа). В случае защелачивания поверхности стекла посуду следует замочить на 2 часа в 1–4 % растворе аскорбиновой или лимонной кислоты, после чего снова прополоскать большим количеством дистиллированной воды. Вымытая посуда должна быть сразу же высушена при температуре, не превышающей 120 °С. Высушенная посуда должна быть защищена от попадания пыли и загрязнений, для чего ее следует завернуть в специальную плотную бумагу или фольгу и подвергнуть стерилизации. Укупорка сосудов – пробки или завинчивающиеся крышки – подвергаются такой же обработке, как и стеклянная посуда: 1) укупорку на этапе мытья с детергентом и последующим полосканием можно подвергнуть кипячению; 2) после мытья укупорку следует рассортировать по размерам и разложить в чашки

Петри, после чего завернуть чашки в бумагу или фольгу; стерилизовать только автоклавированием в течение 30 мин при температуре 121 °С.



Рис. 1.1. Оснащение иммунодиагностической лаборатории в зависимости от этапов и задач исследования

Правила забора исследуемого материала

При заборе и работе с клиническим материалом персонал должен использовать соответствующую спецодежду (перчатки и халат). При

опасности возникновения аэрозолей применяются дополнительные защитные средства (защитные очки и маски);

Сроки доставки клинического материала в лабораторию должны быть сокращены до минимума. Контейнеры для транспортировки материала должны обеспечивать герметичность, стерильность, целостность образцов, а также исключать при открытии образование аэрозоля.

Общие принципы правильного забора материала:

- перед забором материала необходимо оценить соотношение риск/польза для пациента;
- по возможности забор клинического материала следует производить до назначения antimicrobial и immunomodulating препаратов;
- забор материала должен проводиться с использованием соответствующей техники, специального оборудования и строгим соблюдением правил асептики.

Наиболее правильный способ взятия жидких материалов – объемно с помощью стерильного шприца. Отбор материала тампоном производят только при невозможности осуществления объемного метода (отделяемое женских половых органов, отделяемое ушей, глаз и т. д.).

Свищи и фистулы первоначально очищают от отделяемого, и забор материала производят из глубины. Отделяемое из дренажей берут шприцем или используют концы удаленных дренажных трубок. Биоптаты из ран получают путем иссечения участка ткани из глубоких слоев раны или производят забор отделяемого тампоном после тщательной обработки раны физиологическим раствором и 70° этиловым спиртом.

Количество клинического материала определяется выбором методов исследования и разумной достаточностью.

Нужно иметь в виду, что иммунодиагностические процедуры предполагают оценку свойств как клеток, так и гуморальных факторов, представленность которых различна в разных биологических средах, а следовательно, различается и их диагностическая значимость.

Перечисленные в табл. 1.1 виды биологических материалов отличаются как по сложности взятия для исследования, так и по диагностическому значению получаемой информации. Сложность взятия материала часто обусловлена не только техническими трудностями, но и опасностью самого инвазивного вмешательства. Наиболее часто используемым, универсальным биологическим материалом в иммунодиагностике является периферическая кровь.

**Виды биологических материалов, используемых для
иммунологического исследования**

Виды материала	Возможность исследования	
	жидкой фракции	клеточной фракции
1. Периферическая кровь	+	+
2. Синовиальная жидкость	+	+
3. Перитонеальная жидкость	+	+ при патологических процессах
4. Плевральная жидкость	+	+ при патологических процессах
5. Слюна	+	–
6. Слезная жидкость	+	–
7. Ликвор	+	+ при патологических процессах
8. Раневой транссудат	+	+
9. Раневой экссудат	-	+/-
10. Моча	+	+ при патологических процессах
11. Желчь	+	–
12. Содержимое тонкого кишечника	+	–
13. Плотные ткани	–	+

Подготовка крови для изучения параметров иммунитета

Периферическую кровь для иммунодиагностического исследования, как правило, забирают из локтевой вены путем венепункции стерильным шприцем или специальными вакуумными контейнерами. Кровь должна быть взята для исследования утром, натощак. Однако при экстренной необходимости данным правилом пренебрегают. Так как иммунодиагностическое исследование включает определение параметров ИКК крови и иммуноактивных молекул (гуморальных факторов), то кровь забирают в 2 пробирки (рис. 1.2).

Как правило, для иммунологического исследования при венепункции забирают 10 мл крови: 5 мл для исследования клеток и 5 мл – для исследования гуморальных факторов. В принципе, объем крови, необходимый для исследования, различен и зависит от используемых в лаборатории методов и оборудования, а также собственно от диагностических тестов (табл. 1.2).

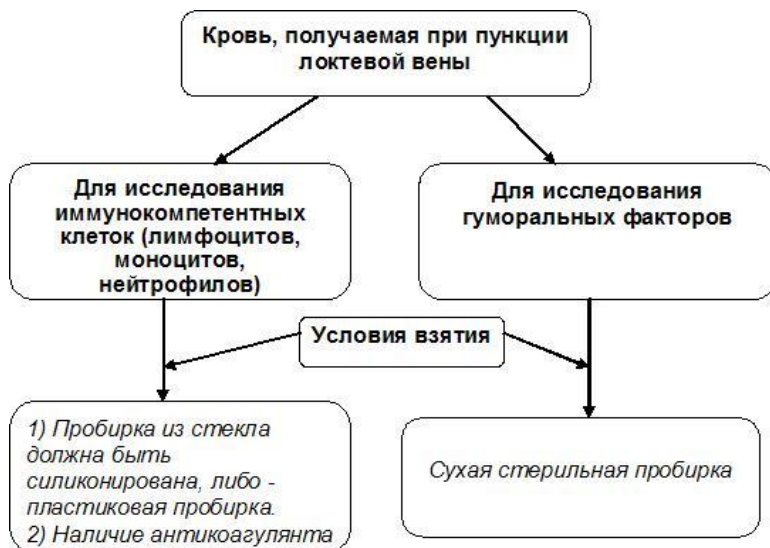


Рис. 1.2. Схема забора крови для иммунодиагностических исследований

Таблица 1.2

Объемы крови, необходимые для исследования в зависимости от задач иммунодиагностики и применяемых методов

Исследуемые факторы	Исследуемые параметры	Методы	Объем крови
1	2	3	4
1. Лимфоциты	Фенотипические маркеры для определения популяций лимфоцитов (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, HLA-DR)	Проточная цитометрия суспензии сепарированных мононуклеаров с возможностью использования 1-, 2-, 3- и 4-цветных меток	Не менее 5 мл
		Проточная цитометрия цельной крови с возможностью использования 1-, 2-, 3- и 4-цветных меток	1 мл
	Функциональная активность (пролиферативный тест, продукция цитокинов и др.)	из суспензии сепарированных мононуклеаров	Не менее 5 мл
		из цельной крови	1 мл

Исследуемые факторы	Исследуемые параметры	Методы	Объем крови
1	2	3	4
2. Нейтрофилы	Фагоцитарная активность	Из суспензии сепарированных нейтрофилов	Не менее 5 мл
		В цельной крови	Не более 0,2 мл
	Метаболическая активность (в НСТ-тесте)	Из суспензии сепарированных нейтрофилов	Не менее 5 мл
		В цельной крови	Не более 0,2 мл
		При микроскопическом учете	Не более 0,2 мл
		При спектрофотометрическом учете	Не менее 1 мл
При хемилюминесцентном учете	Не менее 1 мл		
3. Иммуноглобулины	Уровни при определении классовой (IgG, A, M) и субклассовой (IgG ₁₋₄ , IgA ₁₋₂) специфичности	Метод Манчини	2,5 мкл на каждый класс
		ИФА, турбидиметрия или нефелометрия	100 мкл на каждый класс

Хранение биологического материала, предназначенного для иммунологического исследования

1. Кровь, предназначенная для исследования ИКК, должна подвергаться обработке в максимально короткие сроки. Сохранение образца в течение 1–4-х ч можно производить при комнатной температуре, желательно в темноте. При более длительном промежутке времени образец следует сохранять при температуре +4 °С. В этом случае могут происходить изменения функциональных свойств клеток, особенно нейтрофилов (охлаждение клеток приводит к их агрегации, снижению фагоцитарной активности и др. изменениям). В то же время образец крови, предназначенный для исследования иммунологического фенотипа лимфоцитов методом проточной цитометрии, сохраняет свои свойства при таком режиме хранения не менее 3–7 суток.

2. При необходимости длительного сохранения клеточного материала образец крови или сепарированных лимфоцитов замораживают в жидком азоте с использованием специальных буферных консервирующих смесей.

3. При хранении образца крови (плазмы или сыворотки) нужно учи-

тывать скорость катаболизма исследуемых иммуноактивных молекул. Так, период $T_{1/2}$ молекул антител классов IgG составляет 21 сутки, IgM и IgA – 5–7 суток. Это означает, что при хранении образца биологического материала при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ (а не в замороженном состоянии) получаемая информация будет характеризоваться достоверностью в течение перечисленного выше времени. Однако данный подход совершенно непригоден для исследования цитокинов, а также компонентов СК.

4. Сыворотка крови, используемая для определения концентрации иммуноактивных молекул, может длительно храниться при $-18 - -40^{\circ}\text{C}$. Однако один и тот же образец не должен подвергаться повторному замораживанию. Кроме этого, при длительном хранении замороженных образцов сыворотки и плазмы крови следует учитывать возможность образования холодных преципитатов и усиления испарения воды из образца, что изменяет концентрацию и/или активность исследуемых гуморальных факторов.

Получение сыворотки крови

Взятый у пациента образец крови помещают в сухую чистую пробирку для образования сгустка. Этот процесс осуществляется в течение 30–60 мин при инкубации образца при комнатной температуре или при 37°C . После образования сгустка, его отделяют от стенок пробирки, обводя сухой стеклянной палочкой, центрифугируют 10 мин при 350–400 g (1500 об/мин) и полученную сыворотку отбирают в чистую пробирку. Сыворотку, во избежание эффекта действия неоднократных замораживаний и размораживаний в случае длительного хранения, разливают в несколько микропробирок и хранят при -20°C .

Методы сепарации клеток

Многие иммунодиагностические методы нуждаются в очищенной от ненужных типов клеток суспензии. Поэтому особое значение имеют методы сепарации клеток из порции периферической крови (или другого биологического материала). Таким образом, все методы сепарации можно условно разделить на три большие группы (рис. 1.3). Они часто дополняют друг друга и используются в комплексе. Комбинация методов сепарации клеток регламентируется задачами диагностической процедуры. В настоящее время разработаны модификации практически всех методик исследования клеток с использованием разных методов сепарации или вовсе без них.

Клетки после процедуры сепарации изменяют ряд свойств, включая чувствительность к действию физико-химических факторов. Это изменение сказывается на жизнеспособности клеток, что требует особого внимания к их состоянию в целях получения корректных результатов исследования.

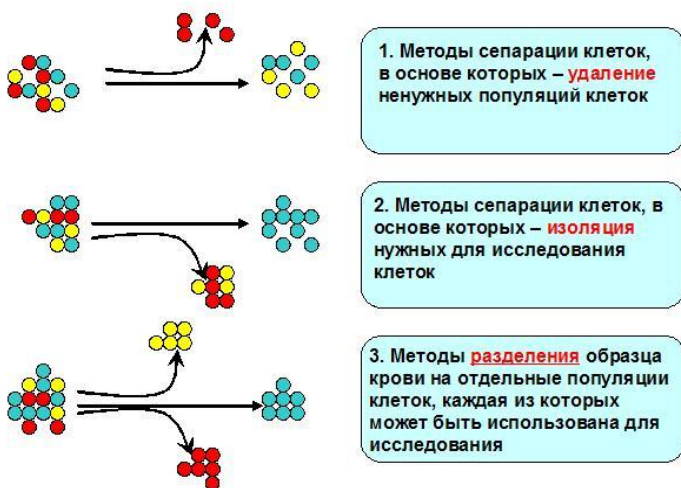


Рис. 1.3. Основные методы сепарации клеток

При проведении сепарации клеток нужно учитывать:

1) существенные потери клеток, причем не только в количестве, но и в качестве. Так, ряд функциональных состояний клеток (активация, патологические изменения) сопровождается увеличением их чувствительности к физико-химическим воздействиям, приводящим к разрушению этих клеток и выведению их из-под контроля диагностического теста, а значит – к утрате диагностически важной информации;

2) изменения функциональных характеристики клеток в процессе сепарации, что также изменяет диагностическое значение полученных результатов.

Среди методов сепарации (выделения, разделения, сортировки) клеток используются различные принципы и соответствующие им методы (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Основные принципы, лежащие в основе сепарации клеток, и их характеристики

Принцип	Метод	Характеристика
1. Различия клеток по плотности и плавучести	1. Метод седиментации	При добавлении к пробе крови избытка 3 % ЭДТА или раствора желатина происходит ускоренное оседание RBC и обогащение плазмы крови лейкоцитами – образуется лейкоцитарная взвесь (концентрат лейкоцитов в плазме)

Продолжение таблицы 1.3

Принцип	Метод	Характеристика
1. Различия клеток по плотности и плавучести	2. Центрифугирование на градиенте плотности	При центрифугировании крови на градиенте плотности происходит разделение популяций клеток по их плавучести
2. Различия биологических характеристик клеток	3. Адгезия на пластике	Разные популяции клеток обладают разной степенью адгезивности, что позволяет сепарировать, например, моноциты при инкубации клеточной суспензии на пластике
	4. Осмотический лизис эритроцитов	Позволяет удалить из порции крови или клеточной суспензии RBC путем кратковременного создания гипотоничной среды (путем добавления дистиллированной воды или 0,83 % раствора NH_4Cl). Ядро-содержащие клетки способны выдержать это воздействие, тогда как RBC лизируются в течение нескольких секунд
	5. Фагоцитоз карбонильного железа с последующим магнитным удалением клеток	Позволяет удалить из суспензии клеток фагоциты (нейтрофилы и моноциты) путем предоставления им частиц карбонильного железа для фагоцитоза. Затем к стенке колбы с клеточной суспензией придвигают магнит, способствующий притяжению к этому месту фагоцитов. Другие клетки, находящиеся в суспензии отбираются из колбы пипеткой
3. Наличие мембранных рецепторов	6. Иммуносорбция	Позволяет провести с использованием моноклональных антител (МАТ) высокоспецифическое выделение клеток, экспрессирующих конкретный мембранный маркер
	7. Лазерная проточная сортировка = FACS (fluorescence-activated cell sorting)	
	8. Магнитная клеточная сортировка = MACS (magnetic cell sorting)	

Выделение лейкоцитов в градиенте плотности

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 сахаразы, в вирусологии – из растворов солей кремния или цезия. В иммунологии наиболее широко применяют растительный полисахарид – фиколл, дополняемый рентгеноконтрастным препаратом верографинум (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 необходимое 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. 1.4) позволяет отделить мононуклеары (лимфоциты, моноциты, бластные клетки) от эритроцитов и гранулоцитов.

Таблица 1.4

Используемые градиенты плотности при выделении клеток человека [Cell separation methods and applications, ed. by D. Recktenwald, 1997]

Тип клеток	Плотность градиента, г/см ³
Т-лимфоциты	1,077
В-лимфоциты	1,077
Моноциты	1,064
Гранулоциты	1,093
НК-лимфоциты	1,06
Эритроциты	1,115
Остеобласты	1,055

В результате центрифугирования суспензии клеток на градиенте плотности происходит разделение клеток на фракции, схематично представленное на рис. 1.4.

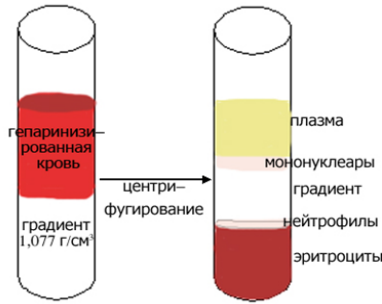


Рис. 1.4. Седиментация клеток периферической крови при центрифугировании на градиенте плотности

Градиенты бывают одноступенчатые, как приведенный выше пример, когда используется градиент с одной плотностью, а также двух- или трехступенчатый. В последнем случае используют 2–3 градиента с различной плотностью, причем на дно пробирки наливают градиент с более высокой плотностью, а на него – градиент с меньшей плотностью. Центрифугирование на 2–3-ступенчатом градиенте позволяет выделить большее количество популяций лейкоцитов, однако технически такой способ более сложный.

Методы сепарации, основанные на использовании моноклональных антител (МАТ)

Гетерогенность клеточных популяций по экспрессируемым поверхностным клеточным маркерам позволяет, используя анти-CD МАТ, проводить специфическую сортировку клеток:

1. *Лазерная проточная сортировка* (FACS = fluorescence- activated cell sorting). Меченные флуорохромом анти-CD МАТ связываются с соответствующими поверхностными маркерами клеток. Внося клетки в проточную систему клеточного цитометра при прохождении ими оптической скамьи, происходит сортировка (сортинг) клеток – выделение клеток на основе параметров, измеряемых проточной цитометрией (схема сортера – лаб. занятие № 4).

2. При *иммуномагнитной клеточной сепарации* используются содержащие Fe_2O_3 полистироловые бусы (гранулы), покрытые анти-Ig моноклональными антителами (МАТ) либо анти-CD МАТ. Схематично прямая и непрямая иммуномагнитная клеточная сепарация представлена на рис. 1.5. При связывании МАТ, находящихся на бусах, с клеткой мишенью в магнитном поле уже через 2–3 минуты происходит разделение клеток. Затем, для последующих исследований у выделенных клеток можно избавиться от магнитных гранул спонтанно при инкубировании в культуральной среде в течение 24–72 ч, либо принудительно с помощью ферментов (папаина или О-сиалогликопротеазы) либо использовать анти Fab АТ.

НЕПРЯМАЯ ИММУНОМАГНИТНАЯ СЕПАРАЦИЯ



ПРЯМАЯ ИММУНОМАГНИТНАЯ СЕПАРАЦИЯ

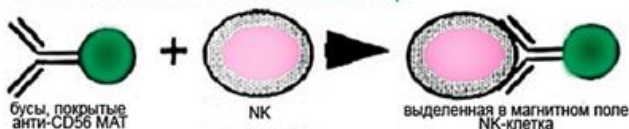


Рис. 1.5. Принцип иммуномагнитной клеточной сепарации

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Проведите расчет необходимых реактивов для проведения осмотического лизиса эритроцитов *in vitro*.

2. Составьте заявку для приобретения этих реактивов в соответствии с изложенными рекомендациями.

3. Приготовьте градиент плотности из предложенных реактивов.

4. Проведите седиментацию клеток крови в растворе желатина: а) к гепаринизированной крови (20 МЕ/мл) добавить 10 % желатина (на 10 мл крови – 1 мл желатина); б) пробирки инкубировать 30 мин в термостате при +37 °С. За это время эритроциты, в отличие от лейкоцитов, будут ускоренно оседать на дно пробирки. Над массой эритроцитов формируется обогащенная лейкоцитами плазма крови. Среди лейкоцитов присутствуют и тромбоциты; в) плазму с лейкоцитами отбирают пипеткой в чистую пробирку.

5. Приготовьте мазок из лейкоконцентрата, окрасьте методом Романовского–Гимзы. Определите количество лейкоцитов в цельном образце крови и в лейкоконцентрате.

6. Проведите разделение клеток на градиенте плотности, следуя избранному протоколу:

Протокол 1 – использование одноступенчатого градиента.

1. Сепарацию мононуклеаров проводят из цельной крови или лейкоцитами, полученной методом седиментации (см. выше).

2. Осторожно наслоить кровь или полученную взвесь клеток (4–6 мл) на 1,5–2,0 мл градиента плотности (1,077 г/см³) и центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об/мин.

3. Отобрать плазму, расположенную непосредственно над опалесцирующим слоем мононуклеаров, в пластиковые микропро-

бирки. Затем по площади сечения пробирки на границе раздела фаз собрать слой мононуклеаров, перенести в другую центрифужную пробирку и развести в 3–5 раз 0,9 % раствором NaCl.

4. Тщательно ресуспендировать. Центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин.

Аккуратно, не перемешивая, удалить надосадочную жидкость, оставляя не более 1 мл жидкости над осадком, содержащим фракцию мононуклеаров. Развести клеточную смесь в 3–5 раз 0,9 % раствором NaCl и центрифугировать 10 мин при 1000 об/мин.

5. Процедуру п.4 повторить.

6. В полученной клеточную взвеси подсчитать количество мононуклеаров и довести до концентрации 2×10^6 клеток/мл: аккуратно удалить максимально возможное количество надосадочной жидкости. Тщательно ресуспендировать полученные клетки в оставшемся объеме жидкости и определить концентрацию клеток в световом микроскопе в камере Горяева.

7. Жизнеспособность клеток определяют методом окрашивания (в микропланшете) 0,06 % трипановым синим: 10 мкл суспензии клеток смешивают с 10 мкл раствора трипанового синего, полученной суспензией заполняют камеру Горяева и подсчитывают живые (неокрашенные) и погибшие (окрашенные) клетки (число погибших клеток не должно превышать 5–7 %).

8. При наличии значительного количества тромбоцитов нужно провести дополнительную процедуру их элиминации путем центрифугирования суспензии клеток в 10 мл буферного солевого раствора при низкой скорости (500–1000 об/мин) 15–20 мин. За это время более тяжелые мононуклеарные клетки седиментрируют на дно пробирки, а мешающие исследованию тромбоциты можно удалить с супернатантом.

Протокол 2 – использование двухступенчатого градиента:

1. Цельную гепаринизированную кровь проинкубировать в течение 40 мин при комнатной температуре.

2. Собрать образовавшуюся лейковзвесь и наслоить на растворы градиента ($1,120 \text{ г/см}^3$ и $1,080 \text{ г/см}^3$) в соотношении 1:1:2. Центрифугировать при комнатной температуре в течение 40 мин при 1500 об/мин.

3. Отобрать образовавшиеся слой плазмы, кольцо мононуклеаров и градиент. Собрать кольцо нейтрофилов в новую чистую пробирку.

4. Оставшиеся эритроциты разрушить гипотоническим лизисом (см. ниже).

5. Полученные клетки дважды отмыть раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}), каждый раз центрифугируя в течение 10 мин при 1500 об/мин.
6. Отмытые от эритроцитов и градиента клетки ресуспендировать в бессывороточной среде RPMI-1640 или другом требуемом для исследования буфере.

7. Проведите процедуру гипотонического шока для удаления эритроцитов из суспензии нейтрофилов, следуя избранному протоколу с применением дистиллированной воды или 0,83 % хлорида аммония.

С применением дистиллированной воды

1. Для лизиса эритроцитов к 1 мл пробы добавить 6 мл 0,2 % раствора хлорида натрия ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), оставить на 20 сек, после чего добавить 6 мл 1,6 % NaCl ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) для восстановления изотоничности.

2. Полученную суспензию отцентрифугировать при 1500 об/мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. Супернатант слить и клетки дважды отмыть раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) каждый раз центрифугируя в течение 10 мин при 1500 об/мин. Клетки ресуспендировали в требуемой питательной среде или буферном растворе.

С применением хлорида аммония

Метод основан на способности изотонического раствора хлорида аммония избирательно гемолизировать эритроциты и не повреждать мононуклеары. В отсутствие стандартного (коммерческого) лизирующего буфера для эритроцитов готовят раствор (буфер) 0,83 % хлорида аммония согласно следующей методике: в сухой пробирке готовится смесь навесок сухих веществ – 4,15 г хлорид аммония (NH_4Cl), 0,5 г калия гидрокарбонат (KHCO_3), 15 мг ЭДТА. Смесь растворяется в 20–30 мл стерильной дистиллированной воды, стерилизуется фильтрованием через антибактериальный фильтр-насадку и объем доводится до 500 мл стерильной дистиллированной водой. pH должно составлять 7,2–7,4. Лизирующий буфер можно также приготовить на основе трис-буфера.

Протокол проведения лизиса:

1. Взвесь клеток осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

2. Осадок ресуспендируют в лизирующем буфере, из расчета 300 млн клеток на 1 мл буфера.

3. Суспензию оставляют на 7–10 мин при комнатной температуре до появления характерного цвета гемолиза – «лакированной крови». Более 10 мин инкубировать в лизирующем буфере не рекомендуют из-за риска повреждения мембран других клеток.

4. Разбавить суспензию 10-кратным объемом PBS или физраствора, осадить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин.

5. Если лизис произошел не полностью, то процедуру можно повторить.

Содержание отчета

Составьте протокол в соответствии с предложенными заданиями. Приведите расчетные данные, зарисуйте необходимые схемы. Представьте результаты количественного определения популяций клеток.

Контрольные вопросы

1. Оснащение иммунологической лаборатории и особенности приобретения реактивов и оборудования для целей исследований иммунного статуса.
2. Правила техники безопасности при работе с биологическим материалом.
3. Методы утилизации биологического материала.
4. Цели и задачи иммунодиагностики.
5. Биологически среды, в которых присутствуют молекулы и клетки иммунной системы.
6. Виды биологических материалов и их использование для иммунологических/иммунодиагностических исследований.
7. Принципы фракционирования биологических материалов.
8. Процедуры предподготовки клеток к иммунологическим исследованиям.
9. Методы разделения клеточных суспензий на градиентах плотности.
10. Методы сепарации клеточных суспензии с использованием моноклональных антител.

Литература

1. Камышников В. С. Техника лабораторных работ в медицинской практике. 3-е изд., перераб. и доп. М. : МЕДпресс-информ, 2013. 344 с. : ил.
2. Бурместр Н.-Р., Пецутто А. Наглядная иммунология; пер. с англ. 2-е изд., испр. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 320 с.
3. Иммунология. Практикум: учеб. пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатьевой, Л. В. Ганковской. 2012. 176 с.
4. Практикум по иммунологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / И. А. Кодратьева, А. А. Ярилин, С. Г. Егорова и др.; под ред. И. А. Кодратьевой, А. А. Ярилина. 2-е изд., испр. и доп. М.: Издательский центр «Академия», 2004. 272 с.
5. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля; пер. с нем. А. П. Тарасова. М.: Медицина, 1987. – 472 с.
6. 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» / М. М. Зафранская и др. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 88 с.

Лабораторная работа № 2

Исследование системы комплемента

Цель работы: закрепление теоретических знаний по теме, освоение навыков исследования параметров системы комплемента.

Оборудование, приборы, принадлежности: центрифуга, холодильник, спектрофотометр, центрифужные и химические пробирки, автоматические дозаторы и наконечники к ним, исследуемые образцы сыворотки крови, реагенты к компонентам комплемента, эритроциты барана, буферные растворы.

Система комплемента, представляющая собой совокупность белков сыворотки крови, способных к каскадной активации при действии иницирующих факторов, относится к одной из наиболее значимых в организме физиологических систем. Ее роль в реакциях видового и антигенспецифического иммунитета определяется способностью реагировать на достаточно широкий круг активаторов, а также выраженными функциональными взаимодействиями с другими гомеостатическими системами организма. Определение количественных и функциональных параметров СК имеет диагностическое значение при ряде патологических состояниях человека, в частности – при генерализованных и системных инфекционных процессах, аллергических, псевдоаллергических и аутоиммунных заболеваниях, в иммунопатогенезе которых активация СК имеет важное значение. Исследование СК включает 3 взаимодополняющих направления (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Основные направления исследования системы комплемента

Направления исследования	Методы исследования
1. Определение концентрации основных компонентов системы комплемента	Серологический метод (реакция Манчини) или методы турбидиметрии и нефелометрии
2. Определение функциональной активности путей активации и отдельных компонентов комплемента	Функциональный метод – метод гемолитического титрования и его варианты
3. Определение концентрации субкомпонентов, не участвующих в каскаде активации (Ва, С4а, С3а, С5а)	Варианты иммунохимического анализа – иммуноферментный анализ (ИФА) или радиоиммунный анализ (РИА)

Диагностическое значение данных 3-х направлений в исследовании системы комплемента также различно, получаемая информация дополняет друг друга (табл. 2.2).

Основные параметры, определяемые при оценки функциональной активности системы комплемента

Направления исследования	Значение определяемых параметров
1. Определение концентрации основных компонентов СК	Есть возможность регистрации резкого снижения концентрации компонентов, что важно для констатации дефицита системы комплемента. Тесты диагностически значимы для заболеваний печени, ангионевротического отека (при дефиците C1-ингибитора). Кроме этого, снижение концентрации компонентов комплемента развивается при реакции активации системы и потреблении комплемента, при некоторых аутоиммунных заболеваниях
2. Определение функциональной активности путей активации и отдельных компонентов	Позволяет определить достаточность функциональной активности СК, что важно при диагностике системных аутоиммунных заболеваний, острых и хронических инфекционных заболеваниях, сопровождающихся иммунопатологическими реакциями
3. Определение концентрации субкомпонентов, не участвующих в каскаде активации (Ba, C4a, C3a, C5a)	Позволяет определить, по какому пути происходит активация СК и связано ли снижение активности или концентрации СК с ее дефектами, или это снижение – результат активации и потребления компонентов

Принцип метода определения функциональной активности отдельных компонентов комплемента

Принцип метода заключается в использовании специальных реагентов (R). Реагент представляет собой сыворотку крови человека (приготавливают из пула сывороток крови, то есть из смеси сыворотки крови, полученных от многих доноров), из которой физико-химическим методом избирательно удален конкретный компонент комплемента. В этом случае добавление реагента к исследуемым образцам сыворотки крови ограничивает активацию комплемента только тем содержанием компонента, который присутствует в исследуемом образце, а, значит, определяет уровень гемолитической активности комплемента в целом (рис. 2.1).

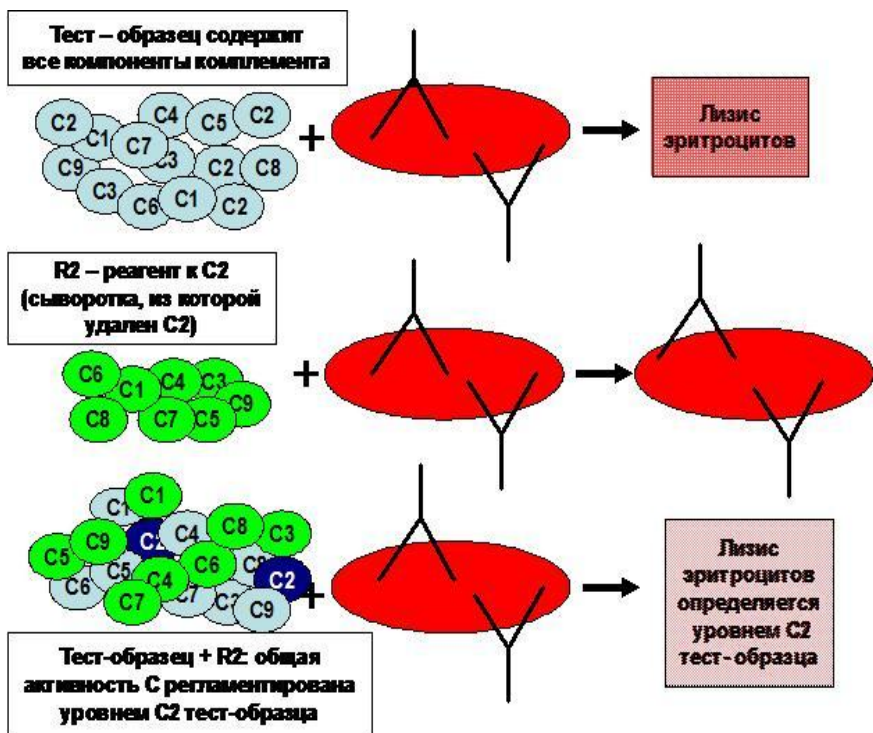


Рис. 2.1 Схема определения функциональной активности C2

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Проведите определение функциональной активности отдельных компонентов комплемента согласно приведенному протоколу:

А) Приготовление реагента R2 для определения гемолитической активности компонента C2. Сыворотку, полученную из крови здоровых доноров, разливают в тонкостенные пробирки по 3 мл и инкубируют в водяном термостате при 50 °С в течение 30 мин.

Б) Приготовление изотонического вероналового буфера. На 1 л раствора взвесить 5,095 г веронала и 41,5 г NaCl, довести pH до 7,40 с помощью 1 М раствором NaOH. Перед работой буфер разбавляют в 5 раз.

В) Приготовление гемсистемы проводится аналогично методу CH50 (см. Лабораторные практикум по иммунологии для студентов 3 курса, с. 6). Концентрацию сенсibilизированных эритроцитов барана в вероналолом буфере контролируют спектрофотметрически: оптическая плотность 0,2 мл гемсистемы (ЕА) + 2,8 мл дистиллированной воды должна быть равна 1,0 на длине волны $\lambda = 412$ нм.

Г) Определение гемолитической активности компонента С2.

К 0,2 мл стандартизованной суспензии эритроцитов барана в изотоническом вероналовом буфере VBS добавляют 0,05 мл реагента R2 в соответствующем разведении и 0,25 мл тестируемой пробы (образец предварительно разводят в 100 раз 0,15 М NaCl). Смесь инкубируют 30 мин при 37 °С, добавляют 2,5 мл 0,15 М NaCl и центрифугируют при 1500 g в течение 5 мин. Степень гемолиза определяли по поглощению при $\lambda = 412$ нм, измеренному против буфера.

Д) Постановка контролей. Дополнительно ставятся: контроль спонтанного лизиса гемсистемы, или контроль гемсистемы (0,2 мл гемсистемы и 0,3 мл буфера) – **КЕА**, контроль реагента (0,2 мл гемсистемы + 0,05 мл реагента + 0,25 мл буфера) – **КR**, контроль полного лизиса эритроцитов (0,2 мл эритроцитов и 2,8 мл дистиллированной воды) – **KL**. Все процедуры инкубации, добавления 2,5 мл 0,15 М NaCl, центрифугирования и измерения оптической плотности проводятся аналогично опытным образцам (кроме KL).

Е) Учет результатов производят на основании расчета количеств эффективных молекул по формуле:

$$Z = ((OD_X - OD_{KEA} - OD_{KR}) / (OD_{KL} - OD_{KEA} - OD_{KR})) \times (1,5 \times 10^8) \times 100,$$

где Z – число эффективных молекул компонента в 1 мл сыворотки крови,

OD_X – оптическая плотность исследуемого образца,

OD_{KEA} – оптическая плотность контроля гемсистемы,

OD_{KR} – оптическая плотность реагента,

OD_{KL} – оптическая плотность контроля лизиса,

$1,5 \times 10^8$ – концентрация эритроцитов в гемсистеме,

100 – фактор разведения сыворотки крови.

2. Решите предложенные задачи и сделайте заключение об изменении состояния системы комплемента

Содержание отчета

Приведите расчетные данные по выполнению задания 1. Проанализируйте диагностическое значение полученных результатов.

Приведите заключения по предложенным для решения задачам.

Контрольные вопросы

1. Система комплемента, состав, особенности биосинтеза.
2. Пути активации системы комплемента. Функции компонентов и субкомпонентов комплемента. Регуляция активности системы комплемента.

3. Физиологическая и патофизиологическая роль системы комплемента.

Литература

1. 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»// М. М. Зафрнаская и др. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. 88 с.
2. *Kabat E. A. and Mayer M. M.* Experimental Immunochemistry, 2nd ed, P. 149–153 (1961).
3. *Кириллова Е. А., Маряхина В. С.* Методы спектрального анализа: учебное пособие. Оренбург, 2013. 105 с.
4. Journal of Immunological Methods. ISSN: 0022-1759. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-immunological-methods>.
5. Current Protocols in Immunology. ISBN: 9780471142737. [Электронный ресурс]. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/-10.1002/0471142735/homepage/Archive.html>

Лабораторная работа № 3

Методы исследования уровня иммуноглобулинов в биологическом материале

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, освоение методов исследования и определения количественных параметров иммуноглобулинов.

Оборудование, приборы, принадлежности: холодильник, термостат, ИФА-ридер, одноканальные и многоканальные автоматические дозаторы и наконечники к ним, 96-луночные полистироловые платы, буферные растворы, ортофенилендиамин, 50 % серная кислота, 30 % раствора H_2O_2 , анти-IgG1 антитела, конъюгат (анти-IgG1 –пероксидаза хрена), исследуемые образцы сыворотки крови.

Методы исследования Ig включают в себя определение уровня Ig разных классов и подклассов и АТ к определенным АГ. Классические методы иммунохимического анализа основаны на регистрации образованного антителами в присутствии АГ преципитата, однако для визуальной регистрации процесса преципитации необходимы высокие концентрации компонентов и длительное время проведения реакции. Результаты такого анализа не всегда можно однозначно интерпретировать и, кроме того, в большинстве случаев они носят качественный или полуколичественный характер. Кроме того, для многих одновалентных АГ (гаптепов), например гормонов, лекарственных соединений, эти методы непригодны.

Индикация образовавшегося комплекса АГ-АТ в растворе может быть осуществлена, если в один из исходных компонентов реакционной системы ввести метку – изотопную, ферментную, флуоресцентную, парамагнитную, которая легко детектируется соответствующим физико-химическим методом.

Условно методы иммунохимического анализа можно разделить на четыре большие группы:

1) прямые (непосредственные) методы определения реакции АГ-АТ. Образующийся при этом комплекс АГ-АТ идентифицируется визуально в процессе постановки реакции агглютинации (бактериальных клеток и простейших) и гемагглютинации (реакции агглютинации эритроцитов антителами или вирусами) либо при помощи простых оптических устройств (методами нефелометрии и турбодиметрии);

2) реакции пассивной агглютинации, т. е. агглютинации частиц, с поверхностью которых связаны АГ или АТ. К этим методам относятся реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и непрямой гемагглюти-

нации (РНГА), латексагглютинации, коагглютинации, агглютинации частиц бентонита, желатиновых капсул, частиц сефарозы и др.;

3) индикаторные методы, основанные на использовании различного рода меток для выявления реакции АГ-АТ. Наиболее распространены иммуноферментный, иммунофлуоресцентный, радиоиммунологический анализ;

4) иммуносенсоры.

Оптические методы идентификации комплексов антиген–антитело

Нефелометрия – определение концентрации взвешенных частиц и высокомолекулярных веществ в растворе, основанное на оценке интенсивности рассеяния света. Нефелометрия может быть использована для определения концентрации АГ, поскольку при добавлении к ним АТ образуются иммунные комплексы, рассеивающие проходящий свет. Нефелометрия позволяет с высокой точностью определить концентрацию IgG, IgA, IgM, подклассов IgG, C3, C4, фактора В, С-реактивного белка и некоторых других сывороточных белков. Этот метод подходит для определения белков в низкой концентрации, например IgE, уровень которого в сыворотке не превышает 1 мкг/мл. Для нефелометрии оптимальны растворы низкой концентрации (в отличие от турбидиметрии, для которой оптимальны растворы высокой концентрации, поскольку в этом случае измеряется потеря проходящего света).

Чувствительность метода – 100 мкг/мл при исследовании цельной сыворотки и 1 мкг/мл при исследовании чистых растворов. Данным методом можно проводить до 120 анализов в час.

Аппаратура для нефелометрических исследований представляет собой специализированные спектрофотометры для измерения интенсивности рассеянного света под углом к направлению падающего на раствор светового потока. Длины волн, используемые в большинстве нефелометров, находятся в диапазоне 340–650 нм.

Первым способностью частиц рассеивать свет описал Дж. Рэлей (J. Rayleigh) более 100 лет тому назад. Важная в прикладном плане суть этого явления заключается в том, что интенсивность и направление светового потока, рассеянного гомогенной взвесью частиц, зависят от размера частиц (рис. 4.1). Рэлеевское, или симметричное, рассеяние имеет место, когда размер частиц не превышает 0,1 от длины волны – вариант «А». Частицы больших размеров рассеивают свет неравномерно. Когда размер (d) приблизительно равен длине волны светового потока (X), вперед – по направлению потока рассеивается больше света, чем в обратном направлении – случай «Б» на рис. 3.1.

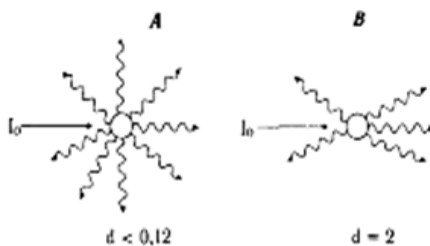


Рис. 3.1. Рассеяние света при различных соотношениях размера частиц d и длины волны электромагнитного излучения λ

Схема анализатора-нефелометра представлена на рис. 3.2.

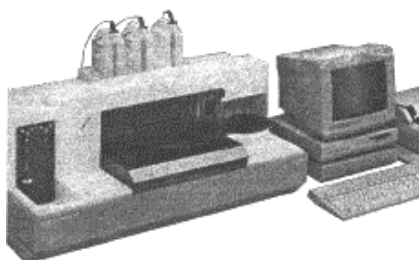
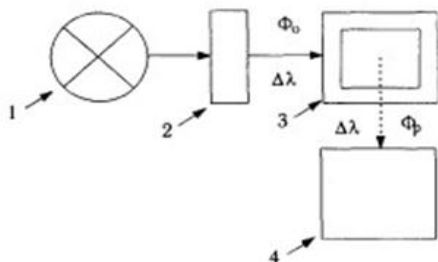


Рис. 3.2. Принципиальная схема нефелометра: 1 – источник световой энергии; 2 – полосовой фильтр; 3 – кювета; 4 – фотоприемник; Φ_0 – падающий поток световой энергии; Φ_p – поток световой энергии, рассеянный жидкой дисперсной системой; $\Delta\lambda$ – полоса пропускания светофильтра

Турбидиметрический метод анализа. Данный вид исследования мутных сред основан на измерении изменения интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Изменение потока световой энергии вызвано как поглощением, так и его рассеянием дисперсной системой. Несмотря на то, что в отношении определения

концентрации Ig метод нефелометрии более чувствителен, преимуществом турбидиметрического анализа является возможность проведения измерения практически на любом колориметре или фотометре. Направления прохождения потоков световой энергии, поясняющие принципы проведения турбидиметрических исследований, показаны на рис. 3.3. Основные компоненты, которые используются при построении нефелометрических и турбидиметрических приборов, похожи и включают источник света, фильтр и фокусирующую световой поток систему линз, кювету с образцом и детектор с устройствами отображения и регистрации результата. В качестве источника света обычно используются ртутные дуговые лампы, вольфрамо-йодистые лампы и гелий-неоновые лазеры. Лазеры излучают монохроматический свет, сконцентрированный в узкий и интенсивный луч.

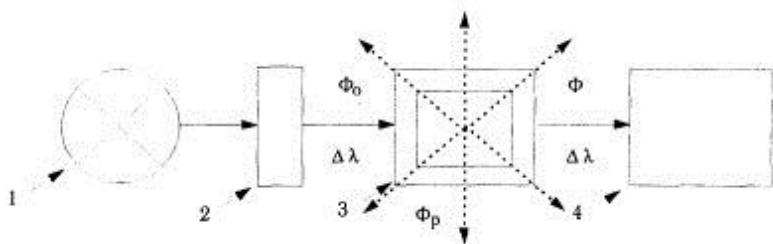


Рис. 3.3. Схема, иллюстрирующая направления светового потока при турбидиметрии: 1 – источник световой энергии; 2 – полосовой фильтр, в некоторых случаях фильтр отсутствует, и измерение проводится в «белом» свете; 3 – кювета; 4 – фотоприемник; Φ_0 – падающий поток световой энергии; Φ_r – поток световой энергии, рассеянный жидкой дисперсной системой; Φ – поток световой энергии, прошедший раствор; $\Delta\lambda$ – полоса пропускания светофильтра

Индикаторные методы

К группе индикаторных методов относятся иммунохимические методы определения концентрации Ig, использующие в качестве меченых агентов различные варианты маркерных веществ, позволяющих количественно регистрировать с высокой точностью образовавшиеся комплексы «АГ-АТ».

Радиоиммунный анализ (РИА). Этот высокочувствительный метод разработан более 40 лет назад и сначала использовался для определения концентрации инсулина и других гормонов. Существует несколько модификаций метода. Одна из них основана на конкурентном связывании меченого радиоактивным изотопом и немеченого АГ с АТ.

Принцип метода заключается в следующем: 1) известное количество АТ смешивают с известным количеством меченого АГ и исследуемой пробой (содержащей неизвестное количество АГ); 2) АГ, содержащийся

в пробе, и стандартный меченый АГ связываются с АТ, 3) чем выше содержание немеченого АГ, тем меньше меченого АГ свяжется с АТ.

Концентрацию АГ в исследуемой пробе оценивают по уровню радиоактивности ИК. Тот же подход может быть использован для определения концентрации АТ в пробе. В этом случае известное количество АГ смешивают с известным количеством стандартных меченых АТ и исследуемой пробой (содержащей неизвестное количество АТ). Другая модификация метода основана на иммобилизации АГ или АТ на твердой подложке.

Основные недостатки метода — необходимость дорогостоящего оборудования и реактивов, а также условий для работы с радиоактивными изотопами.

Иммуоферментный анализ (ИФА). В середине 60-х годов для идентификации и локализации АГ в гистохимических препаратах и выявления полос преципитации в иммунодиффузионных и иммуноэлектрофоретических методах в качестве высокочувствительной метки было предложено использовать молекулы ферментов. Являясь по своей природе мощными химическими катализаторами, ферменты способны эффективно осуществлять наработку легко детектируемого продукта, что делает возможным определение ферментной метки в весьма малых концентрациях (до 10–12 М и ниже). В настоящее время иммуоферментные методы анализа являются наиболее широко используемыми в лабораторной практике.

Основные принципы ИФА:

- комплекс АГ-АТ можно выявить, если ввести в состав одного из участников иммунной реакции (ковалентно присоединить) одну или несколько молекул фермента. Причем процесс конъюгирования с ферментом ни на промежуточных (в процессе конъюгирования), ни на финальной стадии (конъюгат антигена или антитела с ферментом) не должен изменять иммунные свойства фермент-меченого участника иммунной реакции;

- проявление ИК осуществляется с использованием способности фермента расщеплять субстрат, который при ферментативной модификации изменяет свой цвет. Способ детекции – спектрофотометрический;

- ИК можно выявлять как в растворе, так и при адсорбции (или ковалентной иммобилизации) на твердом носителе.

Выделяют следующие виды ИФА: твердофазный (иммобилизированные антитела сорбированы на твердом носителе, например, полистирольном планшете), гомогенный (в гомогенном растворе), флуоресцентный (с использованием флуоресцентных меток). В зависимости от стадийности выполнения различают прямой, непрямой ИФА и ИФА с комплементом.

В иммунодиагностике ИФА нашел широкое применение для количественного анализа субклассов Ig. Иммуноферментный анализ, основе которого лежит применение антител, связанных с ферментом, в англоязычной литературе получил название ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Количественное определение IgG1 в сыворотке крови (определение других изотипов IgG проводится аналогично с использованием соответствующих тест-систем)

Для углубленной оценки гуморального иммунитета определяют уровень подклассов IgG. Хотя в большинстве случаев изменение уровня подклассов IgG не сопровождается выраженными клиническими проявлениями, у пациентов с рецидивирующими инфекциями относительное содержание подклассов IgG значительно отличается от нормы. При этом общий уровень IgG и других Ig может быть нормальным. Определение субклассов может проводиться с использованием любого из вышеперечисленных видов иммуноанализа, но наиболее часто применяется твердофазный ИФА.

Для определения концентрации субклассов IgG1 в сыворотке крови применяется вариант двуцентрового ИФА. В качестве АГ используется стандартный препарат IgG1 человека. Высокоспецифичные МАТ к IgG1 человека иммобилизуются с помощью физической сорбции на поверхности твердой фазы (иммунологический полистирольный планшет; рис. 4.5). Специфические АТ к IgG1 определяются с помощью калибровочной кривой, для построения которой известны количества стандартных IgG1 вносятся в лунки полистирольного планшета и образуют комплексы с анти-IgG1 антителами на твердой фазе. Образующиеся на твердой фазе комплексы «анти-IgG1 – IgG1» проявляются с помощью конъюгата кроличьих АТ к суммарной фракции иммуноглобулинов IgG1 человека, меченых пероксидазой хрена. Последующая инкубация с хромогенными субстратами пероксидазы приводит к развитию интенсивного окрашивания, плотность которого определяется спектрофотометрически. Исследуемые пробы разведенной сыворотки крови человека анализируют аналогично калибровочным пробам. Количество специфических IgG1 антител в исследуемых пробах определяют с помощью калибровочной кривой, используя полученные значения оптической плотности в исследуемой пробе.



Рис. 3.5. Схема проведения твердофазного ИФА

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Изобразите графически молекулярную схему иммуноферментного анализа.

2. Выполните ИФА в соответствии с приведенным протоколом (используя полученные данные, постройте калибровочный график и рассчитайте концентрацию антител в анализируемых образцах сыворотки крови по предложенной формуле):

А. Приготовление реагентов

Иммобилизация анти- IgG1 антител

В лунки полистирольного планшета вносится раствор анти- IgG1 антител в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl (Na-ФСБ), в количестве 200 мкг на лунку и инкубируется в течение 24 ч при температуре +4 °С. Несорбированный АГ удаляется трехкратным промыванием планшета дистиллированной водой.

Приготовление калибровочных проб

Лиофилизированный препарат человеческих иммуноглобулинов G13у разводится дистиллированной водой до концентрации 5 мкг в мл и из него готовятся кратные разведения, согласно следующей схеме:

Стандарт 500 нг буфера	500 мкл исходного раствора	+	500 мкл
Стандарт 250 нг буфера	500 мкл стандарта 500	+	500 мкл
Стандарт 100 нг буфера	500 мкл стандарта 250	+	750 мкл
Стандарт 50 нг буфера	500 мкл стандарта 100	+	500 мкл
Стандарт 25 нг буфера	500 мкл стандарта 50	+	500 мкл
Стандарт 0 нг*	500 мкл буфера		

*Данный стандарт используется для контроля уровня неспецифического связывания

Приготовление анализируемого образца сыворотки

Анализируемый образец сыворотки разводят путем кратных разведений в 16, 32 и 64 раза буфером Na-ФСБ, в анализ берут два последних разведения по 200 мкл в пробу, в повторах.

Приготовление проявляющего реагента

В качестве проявляющего реагента используют коммерческий препарат конъюгата кроличьих АТ к суммарной фракции иммуноглобулинов IgG1 человека, меченых пероксидазой хрена, который разводится буфером Na-ФСБ в соотношении 1 : 1000. Объем на одну пробу – 200 мкл разведенного конъюгата антиIgG-ПХ.

Приготовление хромогенной смеси

Субстратная смесь для конечной стадии анализа готовится **непосредственно перед употреблением** по следующей методике: 8 мг ортофенилендиамина (ОФД) растворяют в 20 мл 0,1 М натрий-цитратного буфера, pH 5,0; к полученному раствору добавляют 8 мкл 30 % раствора H₂O₂.

Б. Выполнение анализа

1 стадия: взаимодействие АТ с иммобилизованным на полистироле анти- IgG1 АТ

- **Калибровочная кривая**

В лунки полистирольного планшета с иммобилизованными анти-IgG1 антителами вносят по 200 мкл раствора каждого стандарта (от 0 до 500 нг) в повторах

- **Анализируемые пробы**

В лунки полистирольного планшета с иммобилизованными анти-IgG1 антителами вносят по 200 мкл анализируемой сыворотки крови, разведенной в 32 и 64 раза в повторах. Планшет инкубируют при комнатной температуре при слабом перемешивании на лабораторном шейкере в течение 60 мин, затем раствор удаляют и планшет трижды промывают дистиллированной водой для удаления несвязанных АТ.

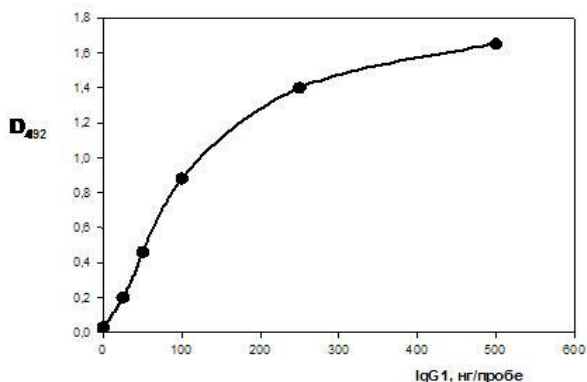


Рис. 3.6. Калибровочный график определения концентрации IgG в сыворотке крови

2 стадия: проявление образовавшихся на твердой фазе иммунных комплексов с помощью конъюгата анти-IgG1 –ПХ

- в лунки планшета с калибровочными и анализируемыми пробами вносят по 200 мкл раствора анти- IgG1 – ПХ;
- планшет инкубируют при комнатной температуре и слабом перемешивании на лабораторном шейкере в течение 45 мин, затем раствор удаляют и планшет трижды промывают дистиллированной водой для удаления несвязанного конъюгата анти- IgG1 ПХ;
- в лунки планшета с калибровочными и анализируемыми пробами вносят по 150 мкл свежеприготовленного раствора хромогенной смеси;
- планшет инкубируют при комнатной температуре при слабом

перемешивании на лабораторном шейкере в течение 15 мин для развития окраски (от бледно-лимонного до насыщенно-оранжевого цвета);

- реакцию останавливают внесением в каждую лунку по 50 мкл 10 % раствора H_2SO_4 ;
- оптическую плотность в пробах измеряют с использованием ИФА-риддера с длиной волны 492 нм.

В. Построение калибровочной кривой и определение концентрации иммуноглобулина IgG1 в анализируемых пробах

Для построения калибровочной кривой используют среднее от результатов измерения в двух аналогичных пробах. Калибровочная кривая строится как зависимость полученных значений оптической плотности (B_{OD492}) от концентрации антител в пробе (от 0 до 500 нг) (рис. 4.13).

Определение концентрации АТ в анализируемых пробах проводится с использованием калибровочного графика.

Полученные значения концентрации АТ в пробе используются для расчета содержания IgG1 в миллилитре сыворотке крови по следующей формуле:

$$C = 5 \cdot n \cdot c ,$$

где n – разведение образца сыворотки, c – концентрация АТ в анализируемой пробе разведенной.

Содержание отчета

Зарисуйте необходимые схемы и графики. Приведите расчетные данные по определенным количественным параметрам результатов ИФА.

Проанализируйте диагностическое значение полученных результатов.

Контрольные вопросы

- 1 Структура молекулы АТ. Функции отдельных участков молекулы Ig.
2. Нормативные показатели концентрации Ig разных классов сыворотки крови человека.
3. Физиологическое и патофизиологическое значение Ig разных классов.
4. Методы определения концентрации основных изоформ иммуноглобулинов (реакция простой радиальной иммунодиффузии по Манчини).
5. Реакции серологического метода и их значение в детекции антител.

Литература

1. *Бурместр Н.-Р., Пецутто А.* Наглядная иммунология; пер. с англ. 2-е изд., испр. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 320 с.

2. Иммунология. Практикум: учеб. пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. М., 2012. 176 с.

3. Практикум по иммунологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / И. А. Кодратъева, А. А. Ярилин, С. Г. Егорова и др.; под ред. И. А. Кодратъевой, А. А. Ярилина. 2-е изд., испр. и доп. М.: Издательский центр «Академия», 2004. 272 с.

4. *Кириллова Е. А., Маряхина В. С.* Методы спектрального анализа: учеб. пособие. Оренбург, 2013. 105 с.

5. Journal of Immunological Methods. ISSN: 0022-1759. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-immunological-methods>.

6. Current Protocols in Immunology. ISBN: 9780471142737. [Электронный ресурс]. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142735/homepage/Archive.html>

7. Immunology / Male D. [et al.] [Electronic resource]. – 7th ed. – Elsevier, 2006. URL: <http://rapidlibrary.biz/i/immunology+-7th+ed.html>. – Date of access: 31.03.2017.

Лабораторная работа № 4.

Количественное исследование субпопуляций лимфоцитов

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, освоение практических навыков определения супопуляционного состава лимфоцитов.

Оборудование, приборы, принадлежности: проточный цитофлуориметр, люминесцентный микроскоп, холодильник, термостат, центрифуга, автоматические дозаторы и наконечники, центрифужные и полистироловые пробирки, предметные стекла с лунками, буферные растворы, моноклональные антитела, исследуемые образцы крови.

Количественные методы исследования популяций и субпопуляций лимфоцитов

На мембране иммунокомпетентных клеток (ИКК) экспрессируется большое количество гликопротеиновых молекул, которые выполняют функцию рецепторов и классифицированы по системе Cluster of differentiation (CD). В зависимости от экспрессируемых ИКК рецепторов можно определить следующие параметры: 1) принадлежность клетки к той или иной субпопуляции; 2) стадию дифференцировки лимфоцита; 3) функциональное состояние иммунного ответа (активированные или неактивированные ИКК). Метод определения совокупности рецепторов/маркеров ИКК и, как следствие, принадлежности клеток к той или иной популяции называется иммунофенотипированием и имеет решающее значение в исследовании состояния иммунной системы человека. Основные поверхностные маркеры лимфоцитов представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Основные рецепторы (маркеры) ИКК

Популяция ИКК	Маркеры	
	Номер в системе CD	Функции
Лейкоциты	CD45	Протеин-тирозин фосфатаза. Активация
Т-лимфоциты	CD3	Часть рецепторного комплекса TCR – CD3
	CD4	Корецептор Т-хелперов, лиганд МНС II класса
	CD8	Корецептор Т-киллеров, лиганд МНС I класса
	CD45RA	Изоформа протеин-тирозин фосфатазы, экспрессируемая на наивных Т-лимфоцитах.

Популяция ИКК	Маркеры	
	Номер в системе CD	Функции
Т-лимфоциты	CD45RO	Изоформа протеин-тирозин фосфатазы, экспрессируемая на Т- клетках памяти
	CD 5	Костимуляция Т-лимфоцитов. Лиганд CD72
В-лимфоциты	CD19	Корецептор В-лимфоцитов
	CD 20	Ca ²⁺ – канал. Регуляция активации В-лимфоцитов
	CD21	Корецептор В-лимфоцитов; рецептор компонента 2-го типа CR2; лиганд iC3b, C3dg, C3d, EBV
	CD 22	Адгезия В-лимфоцитов на Т-лимфоцитах и моноцитах
	CD 72	Лиганд CD5
NK-лимфоциты	CD56	Медиатор цитотоксичности. Адгезия. Изоформа N-CAM
	CD16	FcγIIIa. Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность
Моноциты/ макрофаги	CD14	Паттерн-распознающий рецептор
	CD33	Лектиновый рецептор
Дендритные клетки	CD11c	α-субъединицы β ₂ -интегринов. Активация
	CD123	α-рецептор ИЛ-3. Трансдукция сигнала
Гранулоциты	CD66b	Адгезия, миграция, связывание патогенных структур
Активированные лимфоциты и моноциты	CD 25	α-Цепь рецептора ИЛ-2. Поздний маркер активации
	CD38	Трансдукция сигнала. Адгезия
	CD 69	Передача сигнала. Ранний маркер активации
	HLA-DR,-DQ,-DP	МНС II класса. Трансдукция сигнала

Иммунологические реакции, позволяющие проводить иммунофенотипирование, различны по степени экономических затрат, трудоемкости, необходимости применения высокотехнологичного оборудования. Выбор той или иной реакции (метода) чаще всего определяется важностью получаемой диагностической информации и экономическими затратами.

Иммунофенотипирование – метод, основанный на реакции антиген-антитело, где в качестве антигена выступают поверхностные

и внутриклеточные рецепторы/маркеры лимфоцитов, а в качестве анти-тел используются моноклональные антитела (МАТ), конъюгированные с меткой. Для визуализации данного взаимодействия используют различные приемы: рутинные (комплемент-зависимый цитолиз) или высоко технологичные с использованием лазерных проточных цитофлуориметров, люминесцентных или электронных микроскопов для регистрации реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Реакция комплементзависимого цитолиза

Для метода учета цитолитического эффекта после взаимодействия клеток с антителами в систему вносят комплемент. Комплемент активируется, результатом чего становится лизис тех лимфоцитов, которые обладают соответствующими рецепторами. Микроскопически определяют число (или процент) поврежденных клеток.

Достоинства метода – возможность применения без дорогостоящих реактивов и оборудования. В качестве антисывороток можно использовать антисыворотки к Ig, выпускаемые для реакции иммунодиффузии. Недостатки – трудоемкость, субъективный учет, ограниченность числа определяемых рецепторов, низкая воспроизводимость и большое количество ложных результатов.

Вышеуказанных недостатков лишены реакции, в которых используются МАТ. Однако для регистрации взаимодействия клетка – МАТ также необходима метка. В зависимости от метода учета в качестве меток используют: флуорохромы (FITC, PE и др., см. табл. 4.2), ферменты (щелочная фосфатаза, например), изотопы, ферритин, золото и др. В иммунологии наиболее широко применяются флуорохромы и ферменты (при иммунофлуоресцентном методе и иммуноферментном анализе, соответственно). Другие способы учета (с помощью электронного микроскопа и др.) применяются в научных целях, обычно не связанных с иммунофенотипированием.

Таблица 4.2

Используемые флуорохромы в иммунофлуоресценции

Флуорохром	Пик возбуждения (нм)	Пик эмиссии (нм)	Лазер* (нм)	Цвет флуоресцентной эмиссии
FITC, Fluorescein Isothiocyanate	495	520	488 А	зеленый
PE, Phycoerythrin	564	576	488 А	желтый
TX, Texas Red	595	620	595	оранжевый
APC, Allophycocyanin	650	660	630 Н	красный
PE-Cy7, Phycoerythrin-cyanine7 conjugate	495	755	488 А	инфракрасный

Примечание. * А – аргон-ионный лазер, Н – гелий-неонный лазер.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

Реакция иммунофлуоресценции получила наиболее широкое применение в связи с большим преимуществом перед использованием других методов за счет большей точности, скорости, возможности одновременной регистрации нескольких антигенов на одной клетке. Учет проводится на люминесцентном микроскопе или проточном цитометре. Люминесцентная микроскопия для иммунофенотипирования далеко не лучший вариант вследствие трудоемкости (любое фенотипирование – 1-е исследование – предполагает определение не менее 4–5 маркеров) и лучевой нагрузки на глаза лаборанта. Этот недостаток был преодолен с разработкой проточных цитометров и лазерных сортировщиков клеток.

Проточная цитометрия как современная технология быстрого измерения характеристик клеток, направленная в сторону их автоматизации, появилась в результате естественного развития традиционных гистохимических и цитохимических методов анализа. В отличие от классической биохимии и молекулярной биологии современную цитометрию отличает возможность анализировать не усредненные молекулярные характеристики по всей популяции, а индивидуальные параметры для каждой из клеток. Проточная цитофлуориметрия позволяет: 1) устанавливать фенотип клеток в диагностике патологии иммунной системы, гемобластозов, анемий, иммунодефицитных состояний; 2) анализировать анеуплоидные клеточные клоны, что является важным критерием при диагностике злокачественных опухолей; 3) оценивать распределение клеток по фазам клеточного цикла, то есть пролиферативную активность популяций; 4) определять внутриклеточную продукцию цитокинов; 5) изучать механизмы апоптотической гибели клеток.

Принцип работы *проточного цитофлуориметра* основан на регистрации параметров светорассеяния и флуоресценции от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии и быстром количественном анализе множества свойств одиночных клеток. Клетки по одной проходят через специальную камеру, пересекая пучок света высокой интенсивности (лазерный пучок), со скоростью несколько тысяч в секунду. Каждая клетка, проходя через луч света, испускает рассеянные и флуоресцентные световые сигналы (см. рис. 4.1). Эти сигналы регистрируются при помощи светочувствительных датчиков, усиливаются и при помощи аналого-цифровых преобразователей переводятся в цифровые значения. Для переработки и хранения информации используются компьютеры.

После разработки первых проточных лазерных цитометров особое внимание уделялось поиску и созданию новых флуорохромов, а точнее подбор флуорохромов, возбуждающихся на разных длинах волн. Этот подход позволил создать и применить для фенотипирования нескольких типов МАТ, меченных разными флуорохромами (пример результата та-

кого анализа представлены на рис. 4.1). В этом случае метод не только даст информацию о процентном содержании клеток, экспрессирующих определенный рецептор, но определяет число клеток, несущих сочетание нескольких маркеров (разрабатываются системы для одновременного учета 32 маркеров!). Эти современные методы позволяют давать комплексную оценку иммунологического фенотипа ИКК, причем система учета автоматизирована и объективна.

Можно отметить существование двух направлений в цитометрии: собственно проточная цитометрия и проточная цитометрия-сортировка. Первое направление представляет собой чисто аналитический подход, второе – помогает отобрать интересующие субпопуляции клеток, и в дальнейшем проводить с ними работу. Ряд приборов, называемыми *сортерами*, оснащены устройством для препаративной сортировки клеток, при помощи которого объекты могут быть отсортированы в разные пробирки. Все клеточные сортеры являются проточными цитофлуориметрами, но не все проточные цитофлуориметры обязательно являются сортерами. Сортировка пока используется только в научных целях, но имеет очень важное преимущество – интересующие исследователя объекты могут быть получены в чистом виде и изучены с помощью других методов.

Собственно процедура иммунофенотипирования ИКК заключается в постановке реакции иммунофлуоресценции. При учете на люминесцентном микроскопе маркирование клеток МАТ проводят, используя выделенную суспензию мононуклеаров и вариант непрямой РИФ. При использовании проточной цитофлуориметрии чаще всего фенотипируют цельную кровь методом прямой РИФ. В отдельных случаях для иммунофенотипирования используют биологические жидкости организма (слюна, ликвор, спинномозговая, суставная, плевральная или асцитическая жидкости и т. д.).

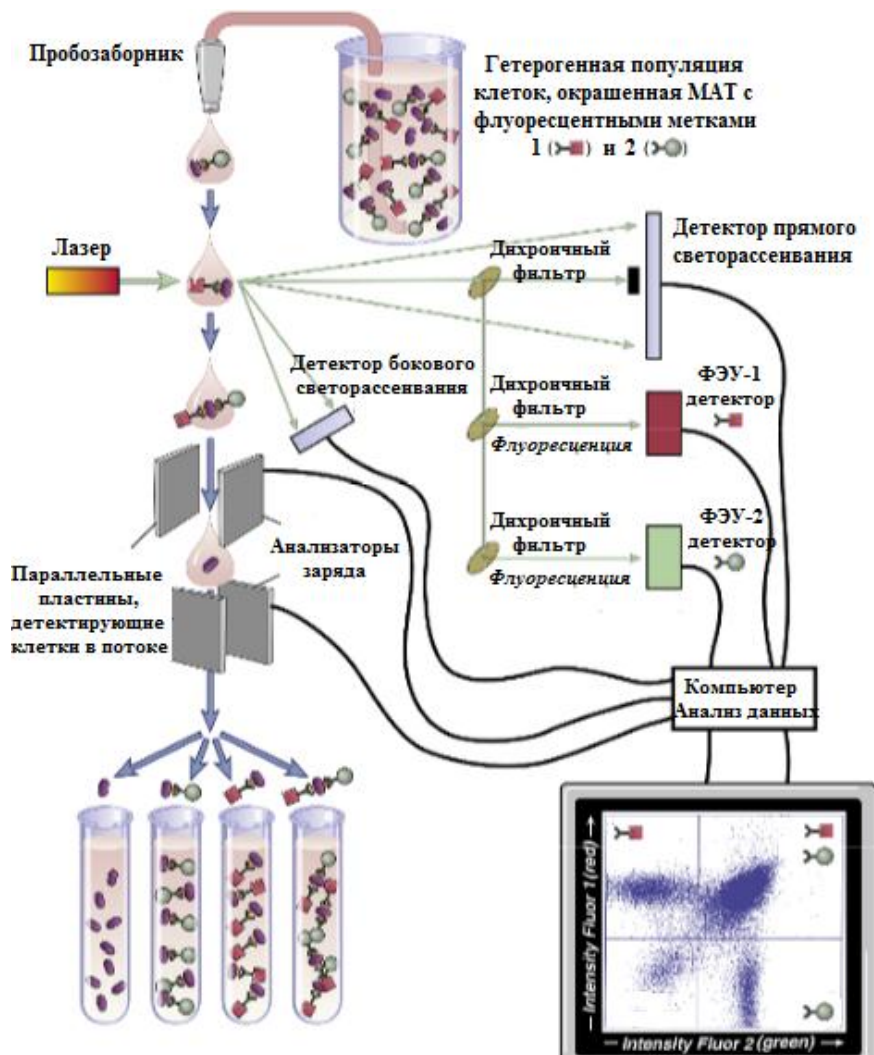


Рис. 4.1. Схема флуоресцентного клеточного сортера «FACSII»

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Поставьте непрямую РИФ для иммунофенотипирования лимфоцитов по представленному протоколу (с регистрацией результатов микроскопическим методом).

Выделение мононуклеарных клеток проводится по стандартной процедуре (см. лаб. работу № 1).

Для постановки реакции используются специальные предметные стекла с полимерным покрытием, в котором проделаны лунки. Инкубацию проводят во влажной камере.

1. В лунки стекол, обезжиренных смесью Никифорова внести по 10 мкл 3 % глютарового альдегида. Поместить в термостат на 30 мин.

2. Отмыть стекло в PBS дважды, лунки оставив влажными.

3. Внести в каждую лунку по 10 мкл суспензии исследуемых клеток ($1-2 \times 10^6$ клеток/мл). Инкубировать клетки 30 мин при 37 °С.

4. Промыть стекла в PBS. Внести в каждую лунку по 10 мкл МАТ. Инкубировать 30 мин при 20 °С.

5. Отмыть стекла трижды в PBS по 1 мин. Внести в каждую лунку по 10 мкл рабочего раствора FITC-конъюгатов вторичных антител. Инкубировать клетки 30 при 4 °С

6. Отмыть стекла трижды в PBS по 1 мин. В каждую лунку внести по 10 мкл 50 % раствора PBS на глицерине. Покрыть препарат покровными стеклами, обезжиренными в смеси Никифорова. Препарат можно хранить в холодильнике 24–48 ч или подсчитать клетки немедленно. Подсчитать клеткам в флуоресцентном микроскопе: на 100 клеток учитываются как светящиеся, так и несветящиеся.

2. Поставьте прямую РИФ для иммунофенотипирования лимфоцитов по представленному протоколу (с регистрацией результатов методом точной цитофлуориметрии).

Реакцию проводят на цельной венозной крови или на выделенной из крови суспензии мононуклеарных клеток в концентрации $2,5-5,0 \times 10^6$ клеток/мл. Выделение мононуклеарных клеток проводится по стандартной процедуре (см. лаб. работу № 1).

1. В пластиковую пробирку (12×75 мм) вносят 100 мкл крови или мононуклеарной фракции, добавляют 10 мкл МАТ, меченных флуорохромом, тщательно перемешивают и инкубируют в темноте при комнатной температуре 15 мин.

2. В образец вносят 1 мл лизирующего эритроциты раствора (0,84 MNH₄Cl в буферном растворе) на 3–5 мин, затем добавляют 1 мл PBS) и выполняют измерения.

3. Для длительного хранения окрашенных образцов выполняют фиксацию клеток путем отмывания и добавления 0,5 мл 2 % раствора параформальдегида.

4. После измерения выполните анализа данных проточного цитофлуориметра с помощью выделения какой-либо популяции клеток (гейтирование), и дальнейшего анализа событий, относящихся только к интересующей популяции. Гейтирование может производиться по любым регистрируемым параметрам (флуоресценция, прямое и боковое светорассеяние) с использованием любых логических комбинаций (рис. 4.2).

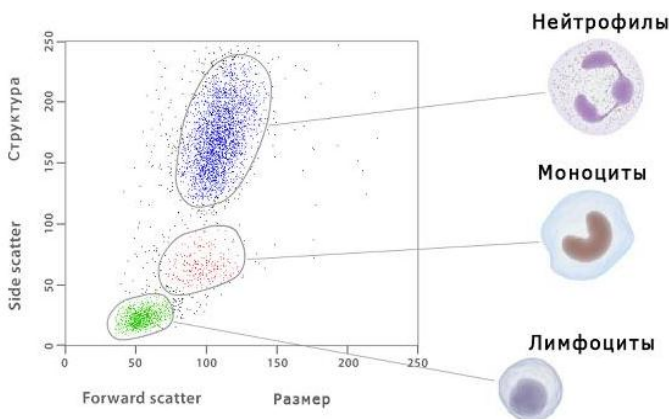


Рис. 4.2. Гейтирование популяций лейкоцитов по параметрам прямого и бокового светорассеяния

Содержание отчета

Зарисуйте необходимые схемы окрашивания клеток, микроскопические изображения клеток и логические комбинации гейтирования клеточных субпопуляций. Приведите расчетные данные (относительные и абсолютные) по полученным результатам.

Контрольные вопросы

1. Субпопуляционная дифференцировка ИКК на основе мембранных рецепторов.
2. Функции основных мембранных рецепторов лимфоцитов.
3. Основные стадии лимфопоэза и смена мембранных маркеров лимфоцитов в процессе лимфопоэза и иммуногенеза.
4. Принцип работы проточного цитофлуориметра.

Литература

1. Зафранская М. М., Нижегородова Д. Б., Ламовская Н. В. и др. Использование CFSE-метода для оценки пролиферации клеток. Клиническая лабораторная диагностика в XXI веке: сб. материалов VII съезда специалистов клинической лабораторной диагностики Республики Беларусь. 2007. С. 123–125.
2. Кудрявцев И. В., Хайдуков С. В., Зурочка А. В. и др. Проточная цитометрия в экспериментальной биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012. 192 с.
3. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: учеб.-метод. пособие. – СПб.: СОЛО, 2008. 72 с.

4. Хайдуков С. В., Зурочка А. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине // Медицинская иммунология. 2007, Т. 9, № 4–5, С. 373–378.

5. Battye F. L., Light A. Tarlinton DM. Single cell sorting and cloning // J. Immunol Methods. 2000; 243(1–2), P. 25–32.

6. Joseph R. Lakowicz Principles of Fluorescence Spectroscopy. – Springer Science+Business Media, 2006.

7. Robinson J. P., Darzynkiewicz Z, Hyun W, et al. Current protocols in cytometry. New York: John Wiley & Sons; 2004.

8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Eighth edition. Philadelphia: Elsevier. 2016. 535 p.

Лабораторная работа № 5

Исследование функциональной активности нейтрофилов

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, освоение методов оценки функциональных свойств нейтрофилов.

Оборудование, приборы, принадлежности: микроскоп, холодильник, термостат, автоматические дозаторы с наконечниками, центрифужные пробирки, предметные стекла, камера Горяева, буферные растворы, 3 % уксусная кислота с добавлением метиленового синего, краситель Романовского–Гимзы, нитросиний тетразолий.

Оценка функциональных параметров нейтрофилов имеет значение при частых рецидивирующих гнойных воспалительных процессах, длительно не заживающих ранах, развитии послеоперационных осложнений, при подозрении на наличие иммунодефицита, связанного с нарушением функций этих клеток. Следует учитывать, что функциональные свойства нейтрофилов тесно связаны с активностью компонентов комплемента, концентрацией иммуноглобулинов, наличием факторов опсонизации.

Так как основная функция нейтрофилов – это фагоцитоз, представляющий собой динамический стадийный процесс, то в настоящее время разработаны отдельные методы для определения параметров большинства стадий фагоцитарной реакции или функций нейтрофилов, определяющих ту или иную стадию (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Основные стадии фагоцитарной реакции

Интегральной характеристикой функционального состояния нейтрофилов является оценка их фагоцитарной активности *in vitro* на основании определения фагоцитарного индекса Гамбургера, фагоцитарного числа Райта, коэффициента фагоцитарного числа и опсонического индекса поглощения. Тем не менее, выявление дисфункций отдельных этапов фагоцитоза также может иметь диагностическое значение. Для этого оценивают такие параметры, как адгезивная, миграционная и метаболическая активность, хемилюминесцентной способности, скорость поглощения кислорода, ее изменение в тестах со специфической лекарственной нагрузкой.

Исследование адгезивной активности нейтрофилов

Межклеточная адгезия и, следовательно, адгезивные молекулы играют важную роль при таких различных физиологических и патологических процессах, как эмбриогенез, рост тканей, регенерация, иммунологические реакции. С участием адгезивных молекул происходит, в частности, взаимодействие нейтрофилов с клетками сосудистого эндотелия. Оценка способности нейтрофилов к адгезии имеет значение при септических и тяжелых воспалительных состояниях, поскольку повышенная адгезия нейтрофилов к эндотелию стимулирует высвобождение повреждающих его токсичных субстанций; при подозрении на иммунологическую недостаточность, связанную с дефектом молекул адгезии. Исследование выполняют следующим образом:

1. Готовят суспензию нейтрофилов в культуральной среде в концентрации 2×10^6 кл/мл.

2. Для каждого исследования используется 9 лунок плоскодонного 96-луночного планшета. В первую по шестую лунки вносят по 10 мкл раствора Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) (фоновая оптическая плотность и спонтанная активность клеток), в седьмую по девятую – по 10 мкл раствора стимулятора, например, РМА (стимулированная активность клеток).

3. Суспензию НФ вносят в каждую из подготовленных лунок по 90 мкл/лунку.

4. Клетки инкубируют при 37°C в течение 60 мин в атмосфере с 5 % CO_2 .

5. Лунки с 4-й по 9-ю (то есть кроме лунок для определения фоновой оптической плотности) три раза осторожно промывают холодным ($T = 4^\circ\text{C}$) раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) для удаления не адгезировавших клеток.

6. Планшет высушивают и проводят фиксацию и окраску клеток в течение 10 мин, добавляя 100 мкл раствора 0,5 % кристаллического фиолетового в метаноле во все лунки.

7. Краситель удаляют, лунки тщательно промывают физиологическим раствором, высушивают на воздухе.

8. Клеточный монослой лизируют внесением по 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного соляной кислотой до 0,04 М концентрации последней.

9. Измеряют оптическую плотность всех лунок при длине волны 540 нм.

10. Вычисляют среднюю оптическую плотность для каждого триплета.

11. Вычисляют процент адгезировавшихся клеток в спонтанном и стимулированном вариантах теста, по отношению к фоновой оптической плотности, взятой за 100 %. Результаты можно выражать также в абсолютных показателях при расчете количества клеток, внесенных в лунку.

12. Вычисляют индекс стимуляции как отношение количества адгезировавшихся клеток в присутствии стимулятора к количеству адгезировавшихся клеток в отсутствие стимулятора.

Нормативные значения: спонтанная активность – 40–55 %; стимулированная активность – 70–80 %; индекс стимуляции – 1,2–2 [10].

Исследование миграционной активности нейтрофилов под агарозой

Оценка хемотаксиса лейкоцитов осуществляется двумя распространенными методами. Метод Бойдена основан на принципе прохождения лейкоцитов из одной половины камеры со взвесью клеток в другую половину с хемоаттрактантом, разделенных между собой мембранным фильтром. С использованием камеры Бойдена возможно изучение эластичности клеток. Другой метод основан на хемотаксисе под слоем агарозы. Принцип этого метода состоит в способности клеток мигрировать в микропространстве между агарозой и поверхностью, на которую последняя нанесена. Движение клеток при отсутствии хемотаксического стимула дает характеристику случайной двигательной активности (спонтанная миграция) фагоцитов. В качестве хемоаттрактанта используют обработанную зимозаном или липополисахаридом сыворотку, казеин, фильтрат культуры *E. coli* или других микроорганизмов, синтетические формилпептиды. Оценка миграционной активности нейтрофилов имеет значение при наличии послеоперационных осложнений. Исследование выполняют следующим образом:

1. Готовят раствор агарозы в стерильной бидистиллированной воде в концентрации 2 мг/мл. Для этого агарозу добавляют в стерильную деионизированную воду (можно бидистиллированную) в концентрации

2 мг/мл, кипятят на водяной бане при 100 °С в течение 20 мин.

2. Раствор охлаждают до 50 °С и смешивают с двукратной полной культуральной средой, нагретой до 50 °С в соотношении 1:1.

3. В стерильные пластиковые чашки Петри заливают необходимый объем агарозы так, чтобы толщина слоя составила 3 мм.

4. За час до проведения исследования с помощью пробойника в агарозе делают лунки диаметром 3 мм на расстоянии 3 мм друг от друга по 3 лунки в ряду и помещают в термостат (37 °С).

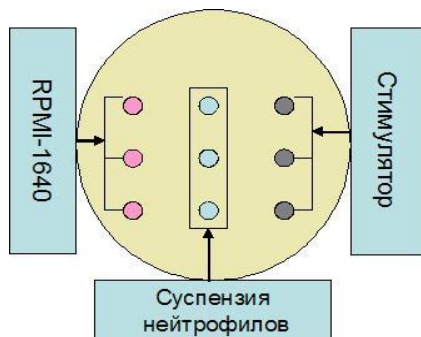


Рис. 5.1. Исследования миграционной активности нейтрофилов под агарозой

5. В центральные лунки вносят по 10 мкл суспензии НФ в концентрации 10^7 кл/мл, в один столбец из боковых лунок – 10 мкл среды RPMI-1640, во второй столбец боковых лунок – 10 мкл стимулятора (например, fMLP – 10^{-5} М) (рис. 5.1).

6. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 90 мин.

7. После окончания инкубации в чашки заливают по 4 мл 10 % раствора формалина и оставляют при комнатной температуре в течение 30 мин.

8. Формалин сливают и осторожно удаляют слой агарозы.

9. Чашки промывают бидистиллированной водой и высушивают на воздухе.

10. Окраску клеток можно проводить красителем Романовского–Гимзы.

11. Учет результатов проводят с использованием микроскопа с окуляром-микрометром. Измеряют длину пробега клеток по направлению к среде и длину пробега клеток к хемоаттрактанту. Вычисляют индекс миграции – отношение длины пробега клеток к хемоаттрактанту к длине пробега клеток к среде.

Нормативные значения: индекс миграции к FMLP – 2,6–2,8 к ИЛ-8 – 1,7–3.

Оценка метаболической активности нейтрофилов в НСТ-тесте

Функцию нейтрофилов в антимикробной защите нередко оценивают в тесте по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ). Краситель НСТ попадает в фагосому, где после слияния с лизосомой, подвергается деградации под воздействием лизосомальных ферментов и активных форм кислорода с превращением в формазан. Гранулы формазана, в отличие от НСТ, имеют синюю окраску. Тест дает возможность судить о фагоцитарной и метаболической функции гранулоцитов по образованию в цитоплазме гранул формазана. НСТ-тест имеет значение при инфекционных заболеваниях бактериальной этиологии, при гнойно-воспалительных процессах, злокачественных новообразованиях. Возможны спектрофотометрический и микроскопический варианты учета теста. Готовят раствор нитросинего тетразолия, для чего к навеске нитросинего тетразолия (НСТ) добавляют безводный диметилсульфоксид, нагревают до 50 °С и после остывания медленно добавляют раствор Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) до расчетного объема. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Исследование хемилюминесцентной способности клеток

В основе феномена клеточной хемилюминесценции фагоцитов лежит образование супероксидного анион-радикала в результате одно-электронного восстановления молекулярного кислорода ферментной системой NADPH-оксидазой. Дальнейшие превращения этого радикала сопровождаются хемилюминесценцией. Хемилюминесцентный анализ позволяет выявлять первичные дефекты фагоцитоза. Например, при хронической гранулематозной болезни резко снижена (вплоть до полного отсутствия) хемилюминесценция, подавлен киллинг фагоцитированных микроорганизмов. С помощью хемилюминесцентного анализа фагоцитов удастся не только установить дефекты на уровне клеток, но и выявить дефекты опсонинов в сыворотке крови, в том числе индуцирующихся при активации комплемента по альтернативному пути, специфических антител. Хемилюминесценции фагоцитов возникает не только непосредственно при фагоцитозе частиц, но и уже при адгезии клеток, что дает возможность использования этого метода в процессе изучения кислородного метаболизма фагоцитов. Исследование проводят следующим образом:

1. Готовят 0,01 % раствор люминола в растворе Хенкса без фенолового красного. Растворяют в течение 18 ч в темноте на магнитной мешалке. Конечная концентрация – $5,6 \times 10^{-4}\text{M}$.

2. Готовят раствор 1 (для снижения агрегации нейтрофилов). Все составляющие смешиваются и доводятся до 1 литра дистиллированной

водой: NaCl – 8 г, KCl – 0,4 г, Na₂PO₄ – 0,4 г, KH₂PO₄ – 0,4 г, глюкоза – 1 г, HEPES – 2,7 г.

3. Готовят раствор 2: все составляющие смешиваются и доводятся до 100 мл раствором Хенкса: сывороточный альбумин – 50 мкг, HEPES – 50 мкг, раствор люминола (5,6×10⁻⁴M) – 200 мкл.

4. Готовят раствор зимозана – 20 мкг/мл.

5. В каждый флакон для сцинтиляционного счета добавляют 2 мл раствора 2.

6. Во флаконы вносят суспензию нейтрофилов в растворе 1 так, чтобы конечная концентрация составила 0,5×10⁶ в мл.

7. Перемешивают содержание флаконов и помещают их в жидкостной сцинтиляционный β-спектрометр, снабженный термостатируемым кюветным отделением.

8. Проводят измерение хемиллюминесценции при 37 °С в 0,1-минутные интервалы на протяжении 90–120 мин.

9. В первый момент регистрации фиксируется фоновый показатель хемиллюминесценции, за которым быстрое возрастание пика реакции. Этот показатель крайне низок и не учитывается в реакции, однако, если его значение превышает 0,06 имп/мин клетка, он вычитается из пикового значения, по которому оценивается реакция. Обычно через 45–60 мин после начала измерения заканчивается адгезия клеток к стеклу, интенсивность хемиллюминесценции приближается к фоновому уровню, в этот период во флаконы вносят суспензию зимозана в концентрации по 2 мг/мл 20 мкл (исходная суспензия 20 мг/мл разбавляется в 10 раз) и снова измеряют хемиллюминесценцию, фиксируют число импульсов на протяжении 60 мин. Делают пересчет импульсов на клетку и выражают хемиллюминесценцию условно в имп/мин клетка.

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Проведите НСТ-тест для определения метаболической активности нейтрофилов, рассчитайте средний цитохимический коэффициент согласно приведенному протоколу.

а) в 2 лунки 96-луночного плоскодонного планшета для каждого исследования вносят по 10 мкл раствора стимулятора (например, РМА в конечной концентрации 100 нг/мл). Для постановки спонтанного варианта теста в 2 другие лунки вносят по 10 мкл раствора Хенкса (без Ca²⁺ и Mg²⁺),

б) во все лунки вносят по 40 мкл раствора НСТ в концентрации 0,25 %.

в) во все лунки добавляют по 50 мкл клеточной суспензии в концентрации 2×10⁶ кл/мл в полной культуральной среде,

г) тщательно ресуспендируют и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин в атмосфере с 5 % CO₂. При микроскопическом варианте учета

НСТ-теста возможно использование цельной крови, а также постановка реакции не в планшете, а в центрифужных пробирках.

Результаты реакции регистрируют спектрофотометрически или микроскопически.

Спектрофотометрический метод:

а) после инкубации планшеты центрифугируют при 150 g в течение 5 мин и удаляют надосадочную жидкость,

б) лунки промывают раствором Хенкса (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) ($T = 4^\circ\text{C}$) и двумя сменами 96 % этанола ($T=4^\circ\text{C}$), центрифугируя после каждой отмывки планшет при 400 g в течение 7 мин,

в) планшет высушивают и клетки разрушают внесением в каждую лунку по 120 мкл 2М раствора гидроксида калия и 140 мкл 99 % ДМСО,

г) проводят спектрофотометрию при длине волны 620 нм,

д) полученные единицы оптической плотности пересчитывают на количество образовавшегося диформаза, согласно калибровочной кривой зависимости оптической плотности раствора от концентрации диформаза. Результаты выражают в количестве микромолей образовавшегося диформаза в объеме раствора на 10^9 клеток за 30 мин инкубации. Вычисляют ИС, равный отношению количества образовавшегося диформаза при инкубации клеток в присутствии стимулятора к количеству диформаза, образовавшегося в отсутствие стимулятора.

Нормативные значения: спонтанная активность – 4–6 мкМ формаза/литр на 10^9 клеток в 30 мин, стимулированная активность – 5,5–8 мкМ формаза/литр на 10^9 клеток в 30 мин, индекс стимуляции – 1,2–2.

Микроскопический учет теста:

а) после этапа инкубации пробирки центрифугируют 5 мин при 400 g, после чего надосадок удаляют и снимают нейтрофильную пленку, осевшую на слое эритроцитов (при использовании цельной крови),

б) полученные клетки ресуспендируют и готовят мазки, которые фиксируют и окрашивают по Романовскому–Гимзе,

в) подсчитывают 100 нейтрофилов, определяют количество положительных по НСТ клеток и степень заполнения цитоплазмы гранулами формаза, образовавшегося в клетках. Рассчитывают средний цитохимический коэффициент:

$$\text{СЦК} = ((A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3)) / (A + B + C + D),$$

где А – количество клеток без гранул, В – количество клеток с числом гранул от 1 до 3, С – количество клеток с числом гранул от 3 до 8, D – количество клеток с числом гранул больше 8. Необходимо подсчитать не менее 100 клеток ($(A+B+C+D) \geq 100$).

Нормативные значения: НСТ клетки – 8–12 %, СЦК = 0,06–0,14, индекс стимуляции = 1,2–2

2. Решите предложенные задачи. Оцените ситуации, в которых возможны полученные результаты.

Содержание отчета

Зарисуйте необходимые схемы, проведите расчеты показателей НСТ-теста. Решение задач с заключениями приведите в письменном виде.

Контрольные вопросы

1. Структура и функции нейтрофилов. Особенности нейтрофилопоэза.
2. Регуляция функциональной активности нейтрофилов
3. Особенности и отличия макрофагального и нейтрофильного фагоцитоза.
4. Физиологическое и патофизиологическое значение фагоцитоза.

Литература

1. Immunobiology: the immune system in health and disease / C. A. Janeway, Jr., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik 5th ed., 2001. 732 p.
2. *Ляликов С. А., Тихон Н. М.* Клиническая иммунология и аллергология : учеб. пособие // Минск : Вышэйш. шк., 2015. 366 с.
3. Иммунология. Практикум / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. М., Изд-во: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 192 с.
4. Medical immunology / edited by Gabriel Virella. 6th ed. 2007. 465 p.
5. *Hay F. C.* Practical immunology / Frank C. Hay, Olwyn M.R. Westwood; 4th ed. Oxford : Blackwell Publishing Company, 2002. 409 p.

Лабораторная работа № 6

Типирование молекул главного комплекса гистосовместимости

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, овладение навыками работы с оснащением для постановки лимфоцитотоксического теста, освоение лимфоцитотоксического теста. Овладение навыками работы с оснащением для постановки ПЦР (PCR-SSP (sequence specific primers)), освоение PCR-SSP.

Типирование молекул и/или генов ГКГС представляет собой чрезвычайно важную задачу, позволяющую решить ряд иммунодиагностических проблем. Типирование ГКГС используют в трансплантологии, при диагностике аутоиммунных заболеваний, а также в научно-исследовательских целях (при исследовании процессов эволюции и становления рас и народностей), причем варианты типирования ГКГС различны как по определяемым параметрам, так и по решаемым задачам:

Таблица 6.1

Области применения типирования молекул и генов главного комплекса гистосовместимости

Области медицины Показатели	Трансплантология	Диагностика аутоиммунных заболеваний
Спектр определяемых параметров	Типирование проводится в отношении максимально большого количества определяемых молекул/генов ГКГС	Проводится определение лишь тех конкретных молекул ГКГС, которые связаны с развитием диагностируемого заболевания
Решаемые задачи	Позволяет определить совместимость пары донор-реципиент и минимизировать возможность развития отторжения трансплантата	Позволяет определить генетическую предрасположенность к развитию заболевания, либо подтвердить диагноз

Методы типирования молекул HLA (или ГКГС человека) условно можно разделить на 2 группы: фенотипические, то есть определение антигенной специфичности молекул HLA (A) и молекулярно-генетические – идентификация различных локусов генов системы HLA, характерных для индивидуума (B).

А. Фенотипические (серологические методы):

1. Микролимфоцитотоксический тест

Основной серологический метод типирования антигенов HLA – микролимфоцитотоксический тест.

Принцип метода. Основан на взаимодействии HLA-молекул на поверхности лимфоцитов обследуемого человека со специфическими анти-HLA-антителами (сыворотками) и комплементом, что приводит к гибели клеток. Гибель клеток определяется при обычном световом микроскопировании после окрашивания витальными красителями.

Технология метода: 1) в лунки планшета, где под слоем вазелинового масла внесены образцы анти-HLA сывороток, добавляют приготовленную взвесь исследуемых лимфоцитов; 2) смесь инкубируют при температуре 22 °С в течение 30–60 мин, после чего вводят комплемент (его источником может служить кроличья сыворотка) и продолжают инкубировать в течение 1 ч при той же температуре; 3) по окончании инкубации добавляют свежеприготовленный 0,3 % раствора трипанового синего и, после 3-минутной инкубации при комнатной температуре, надсадочную жидкость удаляют путем стряхивания; 4) учет результатов реакции производят при микроскопировании лимфоцитов непосредственно в лунках камеры. Результат оценивают по относительному числу погибших лимфоцитов.

Основным недостатком является возможность типирования только по локусам А, В, С, DRB1 в низком разрешении (на уровне групповой специфичности). Тому же получение диагностических сывороток – трудоемкий и дорогостоящий процесс. Он сводится к исследованию большого количества проб сывороток от рожавших несколько раз женщин с помощью панелей лимфоцитов, типированных по антигенам HLA. Особенно трудно получить сыворотки к редким антигенам HLA.

Все варианты постановки тестов на комплементзависимую цитотоксичность (лимфотоксичность) основаны на использовании микро-техники, предложенной американским исследователем П. Терасаки: шестиствольный шприц (или многоканальный дозатор) для раскапывания сывороток, шприц (или одноканальный дозатор) для раскапывания комплемента, одноствольный шприц с диспенсером, планшет Терасаки, планшет Меллера для техники двойной флуоресцентной окраски. Пластиковые микропробирки для разлива сывороток (1 мл) и комплемента (2 мл).

2. Метод смешанной культуры лимфоцитов

Принцип метода. После распознавания чужеродного антигена начинается пролиферация Т-лимфоцитов. Этот процесс можно воспроизвести *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов, состоящей из лим-

фоцитов донора и реципиента. Если донор и реципиент несут разные антигены HLA класса II, в смешанной культуре отмечается пролиферация. Чтобы оценить иммунный ответ лимфоцитов только одного из исследуемых (отвечающих клеток), лимфоциты другого (стимулирующие клетки) инактивируют облучением или **МИТОМИЦИНОМ**. Смешанная культура лимфоцитов позволяет выявить различия по антигенам HLA, которые нельзя обнаружить серологическими методами, например различия по антигенам HLA-DR и HLA-DQ.

Технология метода. Для приготовления смешанной культуры лимфоцитов равное количество лимфоцитов донора и реципиента смешивают и инкубируют при температуре 37 °С. После окончания инкубации в культуру добавляют смесь моноклональных антител, меченых различными флуорохромами (анти-HLADR-PE/анти-CD3-FITC). Лимфоциты инкубируют и результаты оценивают с помощью проточной цитометрии. Основными недостатками клеточных методов являются продолжительность исследования, трудоемкость, высокая возможность технических погрешностей и артефактов.

В. Молекулярно-генетические методы

Эти методы основаны на генотипировании локусов ДНК HLA-системы. Они лишены основных недостатков серологических методов: позволяет выполнять типирование с высоким разрешением (уровень аллелей), дает возможность детектировать новые аллели, предоставляет возможность выполнять большие объемы исследований. Генетическое типирование стало возможным после расшифровки нуклеотидной последовательности генов HLA и выявления различий между разными аллелями этих генов.

Молекулярно-генетические методы типирования подразделяются на технологии основанные на ПЦР (SSP, SSO) и технологии на основе секвенирования нуклеотидных последовательностей ДНК (секвенирование по Сэнгеру и секвенирование второго поколения), являющиеся «золотым стандартом» генотипирования системы HLA.

1. Генотипирование локусов на основе ПЦР HLA (PCR-SSO).

Принцип метода. ПЦР, в которой амплифицированный продукт, полученный с использованием локус-специфичных праймеров, гибридизуется со специфичными олигонуклеотидными пробками SSO (Sequence-Specific Oligonucleotide), нанесенными на мембрану или другие носители. Так как аллели генов HLA иногда отличаются друг от друга лишь по одной паре нуклеотидов, то возможно синтезировать одноцепочечные олигонуклеотидные зонды, состоящие из 19–24 нуклеотидов, полностью комплементарные уникальным последовательно-

стям каждого известного аллеля гена HLA. Созданы также зонды, комплементарные общим для нескольких аллелей последовательностям. При этом для определения неизвестного аллеля можно использовать серию зондов разной специфичности.

Технология метода. HLA-типирование методом SSO применяется для молекулярно-генетического определения HLA-генотипа с низким разрешением и основано на специфической амплификации экзонов HLA-A, B, C, DQB1, DRB1 в образцах ДНК пациента методом ПЦР. В реакционной смеси содержатся: избыток dNTPs, биотинилированные праймеры и термостабильная ДНК-полимераза. Полученный ПЦР-продукт подвергается обратной гибридизации с использованием стрипов, с нанесенными на них в виде параллельных линий специфическими к определенным аллелям HLA олигонуклеотидными зондами. За этим следует этап жесткой промывки, в ходе которой удаляется любой несвязавшийся с зондами амплификационный материал. После добавляется стрептавидин, конъюгированный со щелочной фосфатазой, который связывается с любым ранее образовавшимся биотинилированным гибридом. Инкубация с субстратным раствором, содержащим хромоген, приводит к образованию преципитата коричневого цвета. Реакция прекращается с помощью этапа промывки, и конфигурация зондов обрабатывается при помощи программного обеспечения (рис. 1).

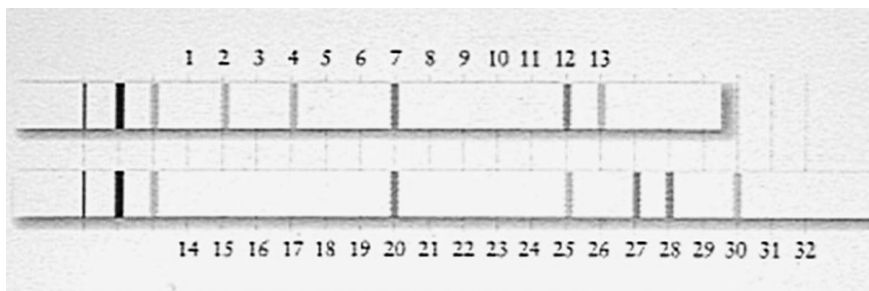


Рис. 1. Расположение линии отметки (черной), контрольной линии конъюгата, контрольная линия HLA-локуса и 32 последовательно-специфических ДНК зонда на полосках. Положительные реакции с зондами 2, 4, 7, 12, 13, 20, 25, 27, 28, 30

Недостатком метода является только возможность типирования локусов HLA только с низким разрешением.

2. Генотипирование локусов на основе ПЦР HLA (PCR-SSP).

Принцип метода. HLA-типирование методом SSP (sequence specific primers) применяется для молекулярно-генетического определения HLA-генотипа с низким и высоким разрешением и основано на специфической

амплификации экзонов HLA-A, B, C, DQB1, DRB1 в образцах ДНК пациента методом ПЦР.

Технология метода. 1. Выделение ДНК из исследуемого образца крови, костного мозга или ткани. Спектрофотометрический подсчет ее концентрации. 2. ДНК раскапывается в лунки планшета, каждая из которых содержит высушенные праймеры определенной специфичности (SSP). Количество лунок (ПЦР реакций), таким образом, определяется количеством типизируемых локусов и количеством аллельных вариантов в каждом локусе. 3. Затем следует этап ДНК амплификации в термоциклере. 4. После амплификации ампликоны переносятся в лунки агарозного геля, где проводится электрофорез. В тех лунках, где специфические праймеры амплифицировали ДНК, мы видим полосу продукта в геле. 5. По таблице интерпретации или при помощи программы определяем какой HLA-аллели она соответствует. Основным достоинством SSP технологии является возможность типирования как на низком, так и на высоком разрешении, определяя точечный аллельный полиморфизм (практически сравнимый с секвенированием). Основным недостатком SSP HLA-типирования является его низкая производительность.

Методические указания к выполнению лабораторной работы (микролимфоцитотоксического теста)

Оборудование, приборы, принадлежности: микроскоп, холодильник, термостат, планшеты Терасаки, микрошприц, автоматические дозаторы с наконечниками, буферные растворы, антисыворотки к молекулам МНС, трипановый синий, вазелиновое масло, исследуемые образцы лимфоцитов.

1. Нарисуйте схему лимфоцитотоксического теста.

2. Проведите лимфоцитотоксический тест для определения специфичностей молекул HLA по предложенному протоколу:

а) выделение лимфоцитов проводят по стандартной методике (см. лаб. работу № 2),

б) типизирующие сыворотки раскапывают (5 мкл) в лунки планшетов Терасаки под вазелиновое масло и замораживают при -20°C до момента использования; перед использованием размораживают при комнатной температуре,

в) лимфоцитарную взвесь раскапывают микрошприцем Терасаки (№ 705) в планшеты по 1 мкл (2000 клеток) на лунку и инкубируют при 22°C 30 мин вместе с типизирующей сывороткой,

г) в каждую лунку добавляют по 5 мкл свежеразмороженного кроличьего комплемента и инкубируют при комнатной температуре 1 ч,

д) резко стряхивают планшеты для удаления вазелинового масла и закапывают в каждую лунку 1 μl трипанового голубого; через 10 мин

избыток краски удаляют стряхиванием и учитывают реакцию; клетки, «убитые» цитотоксическими антителами, окрашены в голубой цвет и имеют нечеткие контуры вследствие начавшегося лизиса.

Интенсивность цитотоксической реакции оценивают при увеличении 10x15 микроскопа по следующей шкале:

8–100 – 81 % гибель клеток – сильно выраженная положительная реакция;

6–80 – 41 % гибель клеток – выраженная положительная реакция;

4–40 – 31 % гибель клеток – положительная реакция;

2–30 – 20 % гибель клеток – сомнительная реакция;

1–20 – 0 % гибель клеток – отрицательная реакция.

0 – реакция не читаема

Содержание отчета

Зарисуйте необходимые схемы, микрокопические препараты лунок планшета Терасаки. Приведите расчетные показатели. Проанализируйте ситуации, в которых возможны полученные результаты.

Методические указания к выполнению лабораторной работы (PCR-SSP)

Материалы: набор реактивов для амплификации (амплификационный буфер, плашка с лиофилизированными праймерами, адгезивная пленка для плашек, лот специфические таблицы и инструкции), Taq-полимераза, образцы ДНК (концентрация – 15 ng/μl, A260nm/A280nm 1.6 – 2.0), дистиллированная вода. Для агарозного геля: агароза, 1X TBE буфер, этидиум бромид.

Оборудование: дозаторы 1 10 μl, 20–200 μl, 200–1000 μl, стерильные наконечники и микропробирки, спектрофотометр, центрифуга, термоциклер, СВЧ, магнитная мешалка, магнит, камера для горизонтального электрофореза, система гельдокументирования.

1. Выполнение исследований

Разморозить при комнатной температуре компоненты набора и образцы ДНК, вортексировать и центрифугировать. Разместить планшет с праймерами в штатив. Внести в чистую 0,5-мл или 1,5-мл пробирку мастермикс, Taq-полимеразу (5 ед/мкл) и диН₂О согласно таблице приведенной внизу (на льду!). Закрыть крышку пробирки и вортексировать 5 сек, затем кратко центрифугировать для осаждения капель. Внести 8 мкл смеси мастермикса с полимеразой и 2 мкл диН₂О в лунку с негативным контролем (последняя лунка в планшете см. схему ниже). В пробирку с оставшейся смесью мастермикса с по-

лимеразой и водой добавить образец ДНК в соответствии с количествами, приведенными в табл. 6.2.

Таблица 6.2

**Объемы компонентов, необходимых для планшетов
с различным количеством лунок**

No. of wells per test	Volume of Master Mix (µl)	Volume of DNA sample (µl)	Volume of dH ₂ O (µl)	Volume of Taq polymerase (µl)
2	12	8	19.7	0.3
3	15	10	24.6	0.4
4	18	12	29.5	0.5
5	21	14	34.4	0.6
6	24	16	39.4	0.6
7	27	18	44.2	0.8
8	30	20	49.2	0.8
9	33	22	54.1	0.9
10	36	24	59	1.0
11	39	26	63.9	1.1
12	42	28	68.9	1.1
13	45	30	73.8	1.2
14	48	32	78.7	1.3
15	51	34	83.6	1.4
16	54	36	88.6	1.4
17	60	40	98.4	1.6
18	63	42	103.3	1.7
19	66	44	108.2	1.8
20	69	46	113.2	1.8
21	72	48	118.1	1.9
22	75	50	123	2.0
23	78	52	127.9	2.1
24	81	54	132.8	2.2
25	87	58	142.7	2.3
26	90	60	147.6	2.4
27	93	62	152.5	2.5
28	96	64	157.4	2.6
29	99	66	162.4	2.6
30	102	68	167.3	2.7
31	105	70	172.2	2.8
32	108	72	177.1	2.9
36	126	84	206.6	3.4
40	138	92	226.3	3.7
44	150	100	246	4.0
48	162	108	265.7	4.3
52	174	116	285.4	4.6
56	186	124	305	5.0
60	198	132	324.7	5.3
64	210	140	344.4	5.6
68	228	152	373.9	6.1
72	240	160	393.6	6.4
76	252	168	413.3	6.7
80	264	176	433	7.0
84	276	184	452.6	7.4
88	288	192	472.3	7.7
92	300	200	492	8.0
96	312	208	511.7	8.3

Внести по 10 мкл приготовленной реакционной смеси с ДНК во все лунки планшета, за исключением лунки с негативным контролем. Центрифугировать, поместить планшет в термоциклер. Заклеить планшет адгезивной пленкой. Проверить, чтобы все лунки были тщательно загерметизированы для исключения выпаривания ПЦР-смеси. Не допускать задержки между приготовлением ПЦР-смеси и началом термоциклирования более 5 мин! Поместить планшет в термоциклер (если необходимо, использовать соответствующий адаптер для планшетов). Использовать приведенную ниже программу амплификации (табл. 6.3).

Программа амплификации

№ шага	Название шага	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	Денатурация	94	2 мин	1
2	Денатурация	94	10 сек	10
3	Отжиг и элонгация	65	60 сек	
4	Денатурация	94	10 сек	20
5	Отжиг праймеров	61	50 сек	
6	Элонгация	72	30 сек	
7	Удержание	RT 4 °С	Если хранение не более 8 ч Если хранение более 8 ч	

После окончания протокола термоциклирования удалить планшет из амплификатора. Убедиться, что объем реакционной смеси в каждой лунке планшета примерно одинаковый.

Для детекции результатов ПЦР провести гель-электрофорез полученных образцов. Для этого использовать 2 % агарозный гель, внести ДНК-маркер в две лунки на ряд. Сфотографировать гель при помощи системы геледокументирования. Распечатать полученную фотографию геля на термопринтере.

2. Содержание отчета. Интерпретировать полученные результаты типирования с помощью специфических интерпретационных таблиц и/или с помощью программного обеспечения. Для этого внести данные пациента в рабочее окно, лот-специфическую информацию и номера позитивных лунок в агарозном геле. Документировать полученные результаты в Pdf файл.

Контрольные вопросы

1. Генетическая карта главного комплекса гистосовместимости. Функции.

2. Понятие о генах и антигенах гистосовместимости. HLA система человека.

3. Номенклатура, ее особенности.

4. Понятие HLA фенотипа, генотипа, гаплотипа. Особенности наследования.

5.

6. Методы исследования и типирования HLA системы: серологические, молекулярно-генетические.

7. Практические аспекты типирования HLA антигенов. HLA в популяциях, биологическое значение.

6. HLA и заболевания человека, механизмы ассоциации.

Литература

1. Хаитов Р. М., Игнатъева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. Норма и патология: учебник. 3-е изд. М.: Медицина, 2010. 752 с.

2. Хаитов Р. М. Иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2006. 320 с.

3. Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore, Darnell. Molecular Cell Biology, 5th Edition, ©2003 W. H. Freeman & Co.

4. HLA MANUAL. A Guide to the completion of the EBMT Form HISTOCOMPATIBILITY, 2004. 17 с.

5. Kathryn J. Tinckam. Basic Histocompatibility Testing Methods. URL: <http://www.springer.com/978-1-4614-0007-3>.

Лабораторная работа № 7

Исследование цитотоксической и пролиферативной активности лимфоцитов

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, овладение навыками культурального метода, постановки цитотоксического и пролиферативного тестов.

Оборудование, приборы, принадлежности: микроскоп, холодильник, CO₂-инкубатор, центрифуга, автоматический счетчик клеток, ИФА-ридер, ламинарный бокс, автоматические дозаторы с наконечниками, буферные растворы и питательные среды, митогены или иные активаторы лимфоцитов, трипановый синий, исследуемые образцы лимфоцитов.

Существует большое количество методов оценки функциональной активности лимфоцитов [9]. Как правило, методы оценки функциональных свойств лимфоцитов отличаются необходимостью значительного количества клеток, длительностью исследования, требуют специального оборудования. В то же время диагностическое значение получаемой информации не всегда адекватно поставленным задачам, что связано с особенностями доступных для исследования лимфоцитов (см. практ. занятие 1). В силу данных причин введение многих методик оценки функциональных свойств в иммунодиагностическую практику затруднено, а спектр научно-исследовательских методов более обширен. В настоящее время оценка функциональных свойств лимфоцитов в рамках иммунодиагностики включает три основных направления, обладающих собственной диагностически значимой информацией (табл. 7.1):

Таблица 7.1

Основные направления исследований функциональных свойств лимфоцитов

Направление исследования	Предмет исследования
1) пролиферативная активность лимфоцитов	способность клеток реагировать на активационный сигнал бластной трансформацией, вступлением в митотический цикл и последующей пролиферацией
2) цитокинпродуцирующая активность лимфоцитов и других типов иммунокомпетентных клеток	регуляторные функции клеток и особенностей механизмов иммунных реакций
3) эффекторные функции лимфоцитов, включая цитотоксическую активность, продукцию антител, развитие ГЗТ	способность к развитию эффекторных реакций лимфоцитов, выполняемых клетками в рамках эффекторной/продуктивной фазы иммунного ответа

Определение отдельных параметров функциональной активности лимфоцитов или их комплекса имеет значение при диагностике иммунодефицитных состояний, аутоиммунных процессах, для мониторинга эффективности иммунокоррекции. Хотя нужно иметь в виду, что данная область иммунодиагностики и в настоящее время является развивающейся областью, а это означает возможный пересмотр и переоценку получаемой информации.

В большинстве случаев исследование функциональной активности лимфоцитов предполагает более или менее длительное поддержание суспензии клеток в искусственных условиях, то есть их культивирование. Культивирование клеток осуществляется в рамках культурального метода.

Культуральный метод в комплексе иммунологических методов

Как известно, культуры клеток могут находиться в 2 основных видах – суспензионной (клетки не прикрепляются к стенкам или дну сосуда) и монослойной (клетки адгезируются к поверхности дна лабораторной посуды, образуя сплошной слой). Лимфоциты в большинстве случаев культивируют в виде суспензионной культуры.

В иммунодиагностике культуральный метод применяют как для поддержания исследуемых лимфоцитов, так и для культивирования клеток-мишеней, необходимых для изучения, например, цитотоксической активности лимфоцитов. Такой подход часто требует различных условий для обеспечения культур клеток всем необходимым. Проведение культурального метода нуждается в специальном оборудовании и хорошо обученном персонале.

Для поддержания жизнеспособности и функциональной активности клеток в искусственных условиях требуется соблюдение ряда правил:

1) поддержание стерильности среды. Осуществляется путем использования только стерильного инструментария, посуды, питательных сред и иных добавок. Все процедуры предварительной подготовки клеток к культивированию, мониторинга состояния культуры клеток в процессе исследования проводят в ламинарных боксах, обеспечивающих поток стерильного воздуха в зоне работы. В оборудовании для инкубации клеток также предусматривается подача стерильной газовой среды, либо полная изоляция емкостей с клетками от внешней среды. Дополнительно в питательную среду для культивирования клеток добавляют смесь противомикробных препаратов, включая антибиотики широкого спектра действия и антифунгицидные препараты. Дозы этих веществ рассчитывают, исходя из рекомендуемых терапевтических доз с учетом объема питательной среды (эти данные всегда можно уточнить в протоколах культивирования клеток);

2) обеспечение культивируемых клеток оптимальной газовой средой. В процессе метаболизма клетки нуждаются в присутствии 5 % CO₂, уровень которого поддерживается специальным оборудованием: CO₂-инкубатором, представляющим собой термостат со стационарно подведенной подачей смеси воздух: CO₂. При необходимости клетки культивируют при постоянном перемешивании с помощью шейкера;

3) поддержание необходимого уровня осмотичности среды осуществляется использованием солевых растворов в качестве основы питательной среды. Сбалансированные солевые растворы (ССР) позволяют создать оптимальный уровень осмотичности питательной среды. Наиболее широко применяются растворы Эрла, Хенкса, Дюльбекко, а также фосфатно-солевой буфер;

4) поддержание необходимого уровня pH среды имеет чрезвычайно важное значение, так как в процессе метаболизма клеток уровень pH смещается, что способно оказывать повреждающее действие на клетки. Стабилизация pH на оптимальном для клеток уровне 7,3–7,35 достигается добавлением в сбалансированные солевые растворы (ССР) буферных солей – фосфатов, бикарбонатов или более сложных соединений, обладающих высокой буферной емкостью (HEPES). Защиту от защелачивания питательной среды дополнительно осуществляет присутствие 5 % CO₂;

5) обеспечение клеток необходимыми питательными веществами и ростовыми факторами проводится с помощью питательной среды. Питательные среды для культивирования лимфоцитов и других типов клеток являются синтетическими. Они содержат все необходимые клеткам компоненты, включая аминокислоты, фосфолипидные, минеральные компоненты и т. д. Синтетические среды выпускаются фирмами-производителями в сухом виде (требуют растворения в деионизированной или бидистиллированной воде, оптимизации уровня pH и последующей стерилизации методом фильтрации через миллиметровые фильтры или автоклавированием в стандартных условиях) или в жидком, готовом к использованию виде. Выбор оптимальной среды в настоящее время не представляет трудностей, благодаря многолетним усилиям ученых и разработке ими протоколов культивирования клеток. Наиболее широко применяются среды MEM (minimal essential medium), BME (basal medium, Eagle), DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium). Для лимфоцитов человека, как правило, применяют среду серии RPMI (Roswell Park Memorial Institute) – RPMI-1640. Дополнительно в питательную среду, как правило, вносят сыворотку крови (эмбриональную телячью – ЭТС, или донорскую человека, IV (AB) группы крови) для обеспечения нужного уровня белка, ростовых факторов и гормонов. В готовой питательной среде сыворотка крови

обычно составляет 5–10 % от общего объема. Сыворотку крови предварительно нужно инактивировать при +56 °С (для устранения активности комплемента) и простерилизовать методом фильтрования. При необходимости в питательную среду дополнительно вносят необходимые добавки (гормоны, витамины и проч.). Состав полной питательной среды (ППС) на основе RPMI-1640 включает 2 mM l-глутамина, 10 mM HEPES, 40–100 мкг/мл гентамицина (или смесь пенициллина – 100ЕД/мл и стрептомицина – 100 мкг/мл; иногда в среду дополнительно добавляют амфотерицин В или другой антифунгицидный препарат) и 10 % ЭТС);

б) особые требования предъявляются также и к качеству посуды. Для культивирования клеток в целях иммунодиагностики используют 96-луночные, реже – 24-луночные (круглодонные или плоскодонные) полистироловые планшеты, реже – пенициллиновые флаконы из стекла. В процедурах предварительной подготовки клеток к культивированию используют стеклянные или пластиковые конические (центрифужные) пробирки. Желательно, чтобы используемая посуда была одноразовой. К сожалению, из-за экономических соображений это не всегда достижимо, поэтому особой проблемой является адекватная обработка посуды. Вся лабораторная посуда для культурального метода должна быть химически чистой (не содержать остатков моющих средств или реактивов, использованных ранее), рН нейтральной и стерильной.

Процедуры предварительной подготовки клеток к культивированию включают сепарацию клеток из первичного биологического материала, например, лимфоцитов из периферической крови, отмывание суспензии клеток, определение жизнеспособности клеточной суспензии, определение концентрации клеток в камере Горяева, доведение концентрации клеток до необходимого уровня.

В процессе культивирования необходим **контроль состояния культуры клеток**: ее жизнеспособности и оптимальности питательной среды (рис. 7.1). Этот контроль чаще всего проводят с помощью цветной пробы. В состав питательных сред и ССР входит индикатор – феноловый красный, который позволяет в процессе роста культуры контролировать визуально изменение уровня рН. При рН = 7,2–7,4 среда имеет розово-оранжевый цвет, при рН < 7,2 она становится желтой, при рН > 7,4 – малиново-фиолетовой. Причины изменения рН различны. Так, закисление среды отражает 1) высокий пролиферативный потенциал культивируемых клеток, что требует замены питательной среды или пассажа клеток в новую порцию среды, 2) неадекватные буферные свойства питательной среды, что может негативно повлиять на результаты иммунодиагностических процедур, 3) контаминацию культуры микробами (чаще всего, бактериями и плесневыми грибами, менее выраженный внешний эффект – при поражении культуры микоплазмами). Зашелачивание среды обыч-

но происходит при 1) гибели культуры клеток, 2) неадекватных буферных свойствах питательной среды. Дифференцировка перечисленных состояний требует как навыков, так и постановки дополнительных контролей при проведении любого иммунодиагностического метода. Так, обязательны 1) контроль питательной среды и даже ее отдельных ингредиентов и 2) контроль интактных лимфоцитов.



Рис. 7.1. Дифференцировка состояний, приводящих к изменению pH среды

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов

Для оценки пролиферативного ответа лимфоцитов к исследуемому образцу клеток добавляют какой-либо стандартный митоген или антиген и культивируют в течение 24–72 ч. Нормальные лимфоциты должны ответить на это усилением синтеза ДНК, которое регистрируется различ-

ными способами в зависимости от выбранной методики. Кроме усиления синтеза ДНК, происходит изменение мембранного фенотипа лимфоцитов, а также изменяется активность ряда ферментных систем. Соответственно, регистрацию ответной реакции клетки на стимулирующий сигнал можно проводить разными способами. В большинстве случаев исследование проводится по общей схеме (рис. 7.2):

Если первые этапы постановки пролиферативных тестов (внесение в культуру лимфоцитов стимулятора с последующей инкубацией) практически одинаковы, то способы регистрации эффекта различны. Причем каждый из перечисленных способов характеризуется как своими достоинствами, так и недостатками (табл. 7.2).

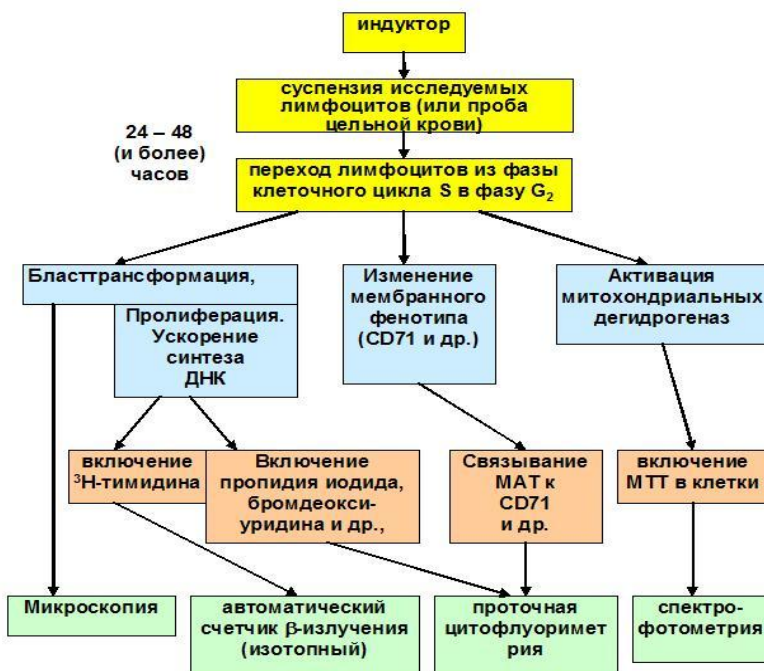


Рис. 7.2. Основные феномены пролиферации лимфоцитов и методы регистрации

Сравнение способов регистрации результатов пролиферативного теста

Способы регистрации результатов пролиферативного теста	Достоинства	Недостатки
Микроскопический	Высокая специфичность, легко определить возможную бактериальную контаминацию	Низкая производительность, длительность учета, высокие трудовые. Высокое значение субъективного фактора
Изотопный	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Требуются условия для работы в лаборатории с радиоактивными изотопами. Есть проблема дифференцировки пролиферации клеток от бактериальной контаминации (при размножении бактерий происходит быстрое включение ^3H -тимидина)
Проточная цитофлюориметрия	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Высокая стоимость реактивов и оборудования
Спектрофотометрия (МТТ-тест)	Высокая специфичность, высокая производительность. Отсутствие субъективности при учете	Требуются большее, чем в других случаях, количество клеток, а значит для исследования следует забирать большее количество материала

Определение пролиферативной активности лимфоцитов с регистрацией результатов изотопным методом

Изотопный метод регистрации пролиферативного теста: при включении клетками меченого предшественника ДНК- ^3H -тимидина количество импульсов, регистрируемое автоматическим счетчиком, прямо пропорционально активности пролиферативного ответа лимфоцитов на стандартный митоген. При этом на лабораторию, использующую изотопы, налагаются определенные требования по 3 классу радиационной безопасности.

Общая схема постановки пролиферативного теста с радиоизотопным учетом:

1. Выделить мононуклеары на градиенте плотности фиколла-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$) в асептических условиях, либо использовать цельную кровь.

2. Стерильно отмыть трижды суспензию клеток в фосфатном буфере. При использовании цельной крови эта процедура не проводится.

3. В полной культуральной среде довести количество клеток до концентрации 2×10^6 кл/мл. При использовании цельной крови в образце определяется количество лейкоцитов и процент лимфоцитов, исходя из этих результатов в образце определяется абсолютное количество лимфоцитов и проба крови разводится ППС для достижения нужной концентрации лимфоцитов.

4. В стерильный плоскодонный планшет внести по 100 мкл полной культуральной среды и сред с митогенами (ФГА в конечной концентрации 2,5–20 мкг/мл, РWM – 5–10 мкг/мл, ЛПС – 5–10 мкг/мл) или специфических антигенов (концентрация переменна – 1–100 мкг/мл). Предварительно в лаборатории проводятся исследования по выбору оптимальной дозы митогенов и антигенов, так как биологическая активность этих препаратов может быть различной у разных фирм-производителей, а также в условиях разных протоколов исследований. Все среды вносятся в триплетах, то есть в три лунки планшета.

5. Внести в лунки по 100 мкл суспензии лимфоцитов.

6. Закладывают контроли: контроль ППС – 300 мкл ППС (контроль стерильности среды); контроль митогена – 200 мкл ППС+100 мкл раствора митогена (контроль стерильности митогена); контроль интактных лимфоцитов – 200 мкл ППС+100 мкл клеточной суспензии (контроль спонтанной пролиферации).

7. Ресуспендировать (избегать переноса митогенов из одной группы триплетов в другую, меняя наконечники).

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

9. В каждую лунку внести метил- ^3H -тимидин из расчета 37 кБк на лунку (реактив разводят на ППС) и продолжают культивирование еще 18 часов.

10. 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.

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

$$\text{ИП} = \beta\text{A (митоген)} / \beta\text{C (интактные)},$$

где βA (митоген) – активность изотопа, характеризующая пролиферативную активность мононуклеаров при стимуляции митогенами, βC (интактные) – активность изотопа, характеризующая спонтанную пролиферативную активность лимфоцитов.

Определение пролиферативной активности лимфоцитов с регистрацией результатов в МТТ-тесте

МТТ-тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать желтую соль тетразолия МТТ (бромид 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2-тетразолия) до формазана. Мертвые клетки и среда для культивирования способностью к восстановлению МТТ не обладают. Число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе.

Оценка эффекторных функций лимфоцитов

Для иммунодиагностических методов оценки эффекторных функций лимфоцитов характерны те же проблемы, что и для других направлений. Несмотря на широкий спектр возможностей и методических подходов при иммунологическом исследовании имеются реальные сложности получения адекватного материала для исследования и интерпретации полученных результатов. В целом, в настоящее время чаще всего используются ряд методов (табл. 7.3).

Таблица 7.3

Основные подходы к исследованию эффекторных функций лимфоцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*

Уровень оценки	Эффекторные функции лимфоцитов		
	Цитотоксичность лимфоцитов	Активность ГЗТ	Продукция антител
<i>In vivo</i>	Определение спонтанного уровня цитотоксичности, а также количества и активности киллерных клеток по экспрессии специфичных для них маркеров	Внутрикожные пробы с туберкулином и другими антигенами, могут быть использованы и митогены	Решается в рамках серологического или иммунохимического исследования
<i>In vitro</i>	Определение уровня цитотоксической активности в биологических тестах с клетками-мишенями	?	Решается в рамках культурального метода при стимуляции мононуклеаров периферической крови или иного биологического материала с последующей оценкой продукции антител методом ИФА или серологическим

Исследование цитотоксической активности лимфоцитов

НК-лимфоциты активируются под действием ИЛ-2 и интерферона- γ . ИЛ-2 взаимодействует с рецепторами к нему. При этом происходит пролиферация НК-лимфоцитов, следовательно, происходит увеличение их содержания как в органах, так и периферической крови. Причем, НК-лимфоциты реагируют на минимальные концентрации ИЛ-2 = 0,02 МЕ/мл, а самый ранний ответ наблюдается через 15–30 мин.

Существующие методы оценки активности НК:

1. Определение их содержания в периферической крови с помощью иммунофенотипирования с CD16 и CD56 (лимфоцитотоксический тест, иммунофлуоресценция, проточная цитофлуорометрия). **Нормативные показатели CD16 (НК-клетки):** взрослые = 9–16 % (170–400/мм³); дети до года = 8–17 % (300–700/мм³); дети (1–6 лет) = 8–15 % (200–600/мм³); дети (7–17 лет) = 9–16 % (200–300/мм³).

2. Регистрация пролиферации под действием минимальной концентрации экзогенного ИЛ-2 (0,1 МЕ/мл) в течение первых 12 ч культивирования.

3. Определение активности НК, основанное на оценки их киллинговой активности: методом ИФА определяется γ -инф, который способен увеличивать синтез перфоринов в гранулах НК.

4. Определение цитотоксической активности НК определяют по их способности лизировать клетки-мишени (инфицированные вирусами, опухолевые или аллогенные клетки). Существует 2 разновидности методов, основанных на разрушении (киллинге) специфического клона клеток К-562 (клеток миелоидного лейкоза): радиоизотопный метод и с помощью камер Перфильева.

Оценка цитотоксической активности НК радиоизотопным методом (рис. 7.3)

1. Внесение меченного Cr⁵¹ уридина в культуру К-562 (связывается с РНК).

2. Культура К-562 отмывается от несвязавшегося изотопа. В стерильный планшет к 100 мкл отмывтой взвеси лимфоцитов (2×10^6 /мл) добавляется 100 мкл культуры К-562. Параллельно ставится контроль: 100 мкл 1 % HCl вместе со 100 мкл К-562 (будет вызываться 100 %-ный лизис меченных клеток, так называемый «спонтанный лизис»). Ресуспендируется и инкубируется 4 часа.

3. После окончания инкубации планшет центрифугируем при 1500 об/мин 5 мин. Отбирается супернатант, в котором в дальнейшем определяется γ -излучение.

4. Количество лизированных клеток в присутствии НК определяется как отношение лизиса в присутствии натуральных киллеров к γ -активности спонтанного лизиса, умноженного на 100 %. Например, $1000 \text{ CPM} / 2000 \text{ CPM} \times 100 \% = 50 \%$ **Норма** = 20–55 %.

Оценка цитотоксической активности НК в камерах Перфильева

1. Готовиться 0,7 % агар на полной культуральной среде (RPMI-1640) с добавлением 0,001 мкг трипанового синего, способного окрашивать мертвые клетки. Агар охлаждается до 56 °С.

2. Выделенные и отмытые лимфоциты довести до концентрации 20×10^5 , а клетки культуры К-562 – до 5×10^5 . Оценить жизнеспособность К-562. В 5-ти канальные камеры Перфильева вносятся лимфоциты и К-562 в различных соотношениях (1:10, 1:20, 1:40, 1:80; табл. 7.4).

3. В капилляры внести по 500 мкл 0,7 % агара на полной культуральной среде с трипановым синим. Закрыть капилляры с обеих сторон. Инкубировать 2–4 ч.

4. Учет результатов под световым микроскопом: на 50 клеток К-562 считаются мертвые клетки. Подсчет количества лизированных клеток:

$$\frac{O - K}{50} \times 100\%,$$

где O – количество лизированных клеток в опыте, K – количество лизированных клеток в контроле.

Например, O = 16, K = 2, тогда количество лизированных К-562 = 24 %.

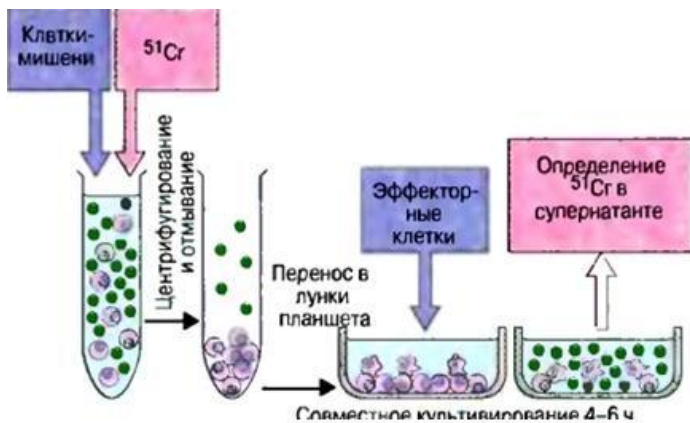


Рис. 7.3 Схема оценки цитотоксической активности НК радиоизотопным методом

Схема опыта по оценке цитотоксической активности натуральных киллеров в камерах Перфильева

Капилляр	Соотношение клеток	Количество К-562	Количество лимфоцитов
№ 1	1:10	10 мкл	25 мкл
№ 2	1:20	10 мкл	50 мкл
№ 3	1:30	10 мкл	100 мкл
№ 4	1:40	10 мкл	200 мкл
№ 5 (контроль, спонтанная гибель)	–	10 мкл	–

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1 Проведите планирование иммунодиагностического исследования пролиферативной активности лимфоцитов 10 образцов крови в МТТ-тесте. Рассчитайте количество необходимых реактивов, напишите план исследования с учетом необходимости подготовки всех ингредиентов. Оцените затраты времени по постановке эксперимента.

2. Поставьте МТТ-тест по предложенному протоколу:

А) Выделить мононуклеары на градиенте плотности фикоколл-верографина (1,077 г/см³) в асептических условиях.

Б) Стерильно отмыть трижды суспензию клеток в фосфатном буфере.

В) В полной культуральной среде довести количество клеток до концентрации 2×10^6 кл/мл.

Г) В стерильный плоскодонный планшет внести по 100 мкл полной культуральной среды и сред с митогенами (ФГА в конечной концентрации 2,5–20 мкг/мл, РWM – 5–10 мкг/мл, ЛПС – 5–10 мкг/мл) или специфических антигенов (концентрация переменна – 1–100 мкг/мл). Все среды вносятся в триплетах, то есть в три лунки планшета

Д) Внести в лунки по 100 мкл суспензии лимфоцитов.

Е) Закладывают контроли: контроль ППС – 300 мкл ППС (контроль стерильности среды); контроль митогена – 200 мкл ППС+100 мкл раствора митогена (контроль стерильности митогена); контроль интактных лимфоцитов – 200 мкл ППС+100 мкл клеточной суспензии (контроль спонтанной пролиферации).

Ж) Ресуспендировать (избегать переноса митогенов из одной группы триплетов в другую, меняя наконечники).

З) Культивировать в течение 48 ч в СО₂-инкубаторе при температуре +37 °С

Внести раствор МТТ (5 мг/мл) за 3–4 часа до окончания культивирования. Ресуспендировать. Поставить снова на инкубацию при тех же условиях.

И) Добавить 20 мкл растворителя (0,05N HCl в изопропанол) и ресуспендировать.

К) Определить оптическую плотность с помощью при длине волны измерения спектрофотометра при длине волны 570 нм с использованием запирающих фильтров 630–700 нм.

На основе полученных данных провести расчет индексов пролиферации (ИП) по формуле:

$$\text{ИП} = \text{OD (митоген)} / \text{OD (интактные)},$$

где OD (опыт) – оптическая плотность, характеризующая пролиферативную активность мононуклеаров при стимуляции митогенами, OD (интактные) – оптическая плотность, характеризующая спонтанную пролиферативную активность лимфоцитов.

Содержание отчета

Схематически изобразите принцип МТТ-теста, приведите расчетные данные по полученным результатам. Сделайте выводы о возможных причинах, приводящих к изменениям функционального состояния лимфоцитов. Проанализируйте возможность допущения ошибок или технических погрешностей при постановке МТТ-теста

Контрольные вопросы

1. Особенности функциональной активности лимфоцитов, принадлежащих различным субпопуляциям.
2. Феномены реализации активационного сигнала на уровне лимфоцита (бласттрансформация и пролиферация, изменение спектра мембранных маркеров, продукция цитокинов, осуществление эффекторных функций и т. д.).
3. Основные методические подходы для исследования синтетических и эффекторных функций лимфоцитов.
4. Особенности и условия проведения культурального метода исследования в иммунологии.

Литература

1. Клиническая иммунопатология: Руководство / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков. М.: Мед. лит., 2009. 464 с.
2. Иммунология. Практикум. Под редакцией Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. М., Изд-во: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 192 с.
3. *Полетаев А.* Клиническая и лабораторная иммунология. М.: Медицинское информационное агенство, 2007. 184 с.
4. Иммунология. Практикум: учебное пособие / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. М., 2012. 176 с.

Лабораторная работа № 8

Оценка цитокинпродуцирующей активности клеток и концентрация цитокинов в биологических средах

Цель работы: закрепление теоретического материала по изучаемой теме, закрепление навыков культуральной работы с иммунокомпетентными клетками.

Оборудование, приборы, принадлежности: схемы продукции цитокинов, таблицы биологических свойств цитокинов.

В настоящее время определение присутствия цитокинов и их концентрации, как и цитокинпродуцирующих клеток в качестве иммунодиагностических параметров, находит все большее применение вследствие увеличения численности лиц с иммунозависимыми и иммунообусловленными заболеваниями, терапия которых включает применение рекомбинантных цитокинов. Без предварительной оценки собственных возможностей организма в биосинтезе этих веществ такая терапия может оказаться либо неуспешной, либо стать причиной развития иммунопатологических реакций. Для детекции цитокинов используют два подхода: 1) определение концентрации цитокина в сыворотке крови или другом биологическом материале, то есть определение уровня цитокина, образовавшегося в условиях *in vivo*, 2) стимуляция клеток обследуемого лица *in vitro* (в рамках культурального метода) индуктором или антигеном для оценки цитокинсинтезирующей способности клеток. У обоих подходов есть как положительные особенности, так и ряд ограничений (табл. 8.1).

Таблица 8.1

Особенности индукции биосинтеза цитокинов в условиях *in vitro* и *in vivo* в зависимости от задач исследования

Параметры сравнения	Условия индукции биосинтеза цитокинов	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
1	2	3
Предмет исследования	определение концентрации цитокина в сыворотке крови или другом биологическом материале	стимуляция клеток обследуемого лица <i>in vitro</i> индуктором или антигеном для оценки цитокинсинтезирующей способности клеток

Параметры сравнения	Условия индукции биосинтеза цитокинов	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
1	2	3
Соответствие результатов исследования особенностям патологического или физиологического процесса	Высокое, так как синтез цитокинов формируется в естественных условиях организма	А) Вариабельное, в периферической крови в момент взятия образца для исследования могут отсутствовать лимфоциты или иные ИКК, определяющие развитие и иммунопатогенез заболевания пациента. Существует проблема несоответствия исследуемого материала диагностической цели. Б) Индукторы синтеза цитокинов в условиях <i>in vitro</i> не соответствуют условиям <i>in vivo</i> , что снижает диагностическое значение исследования
Ограничения	Большинство цитокинов продуцируются <i>in loco</i> и не выходят в циркуляцию. Цитокины отличаются быстрым катаболизмом, даже при активации их синтеза возможны отрицательные результаты исследования	А, Б) Основные ограничения те же, что и предыдущем пункте. В) Необходим культуральный метод, увеличивающий время исследования и экономические затраты
Спектр цитокинов	Интерфероны, провоспалительные цитокины (TNF α , IL-1,6, GM-CSF), реже – другие	Любые
Методы	ИФА (есть стандартные коммерческие тест-системы и протоколы)	ИФА, молекулярно-биологические методы, проточная цитофлюориметрия, иммуногистохимические
Пути преодоления ограничений	Исследование материалов из очага патологического процесса – биоптатов с детекцией цитокинпродуцирующих клеток иммуногистохимическими методами или проточной цитофлюориметрией	?

Исследование продукции цитокинов в условиях *in vitro* осуществляются в соответствии со следующей принципиальной схемой (рис. 8.1):

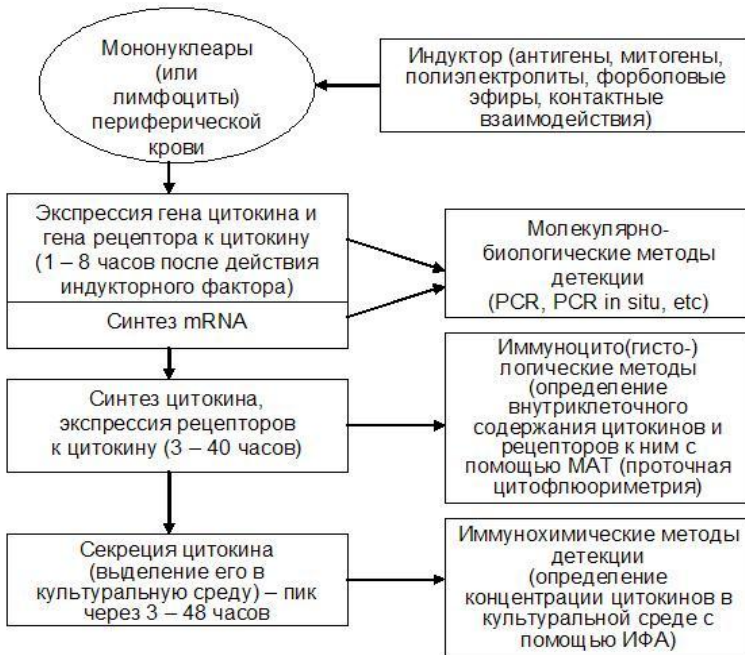


Рис. 8.1. Принципиальная схема исследования продукции цитокинов в условиях *in vitro*

Методические указания к выполнению лабораторной работы

1. Разработайте протокол исследования индукции синтеза и собственно продукции различных цитокинов в условиях *in vitro*. Определите необходимое оборудование и реактивы для проведения подобного эксперимента, оцените наиболее приемлемые виды биологических материалов.

2. Решите предложенные задачи по интерпретации иммунодиагностического исследования концентрации цитокинов в разных биологических средах.

Содержание отчета

Изложите последовательно все требуемые материалы для разработки протокола исследования. Приведите расчетные данные по определению необходимых реактивов, исследуемого биологического материала. Оцените возможность технических погрешностей и ошибок при проведении планируемого исследования.

Дайте письменное заключение по предложенным задачам.

Контрольные вопросы

1. Особенности биосинтеза цитокинов.
2. Индукторы цитокинпродуцирующей активности лимфоцитов.
3. Принципы функционирования цитокинов.
4. Роль цитокинов в регуляции воспалительных реакций, иммунного ответа, кроветворения.
5. Цитокиноterapia: достижения, трудности и перспективы развития. Показания и противопоказания для проведения цитокинотерапии.
6. Основные направления исследования цитокинов.

Литература

1. *Готов А. В., Потуданская М. Г.* Основы иммунологии, иммуногенетики и иммуобиотехнологии: учеб. пособие. Ч. 1. Общая иммунология. Омск, 2009. С. 119.
2. *Journal of Immunological Methods*. ISSN: 0022-1759. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.journals.elsevier.com/journal-of-immunological-methods>.
3. *Current Protocols in Immunology*. ISBN: 9780471142737. [Электронный ресурс]. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142735/homepage/Archive.html>
4. *Immunology / Male D.* [et al.] [Electronic resource]. – 7th ed. – Elsevier, 2006. URL: <http://rapidlibrary.biz/i/immunology+7th+ed.html>. – Date of access: 31.03.2017.
5. *Murphy K. P.* *Janeway's immunobiology*. 8th ed. New-York: Garland Science. 2012.

Практическая работа 1

Принципы анализа и интерпретации результатов исследования иммунного статуса человека

Цель работы: освоение принципов анализа и интерпретации иммунограмм.

Оборудование, приборы, принадлежности: таблицы нормативных показателей иммунного статуса, таблицы CD-маркеров иммунокомпетентных клеток, схемы путей рециркуляции лимфоцитов в организме, иммунограммы.

Оценка иммунного статуса в настоящее время является распространенной процедурой в комплексе клинико-лабораторных исследований. Однако, несмотря на широкий спектр используемых тестов и методов, интерпретация и анализ иммунограммы остается сложной задачей. В ряде ситуаций определение иммунного статуса может быть мало эффективным с точки зрения постановки диагноза, либо совсем неэффективным.

Причины недостаточного диагностического значения иммунограммы можно условно разделить на *субъективные* и *объективные*. К субъективным причинам следует отнести необходимость тесного контакта врача клинической практики и сотрудника иммунодиагностической лаборатории, которая во многом определяется коммуникативностью, психологической совместимостью и умением обеих сторон к продуктивному диалогу. Такая совместимость также связана с общностью или различиями теоретической подготовки специалистов. К объективным причинам относятся особенности генерации, распространения и циркуляции лимфоцитов, особенности биосинтеза иммуноактивных молекул, особенности патогенеза патологических процессов. Существенный вклад в недостаточную эффективность диагностического значения иммунограммы вносит и использование периферической крови в качестве основного материала для исследования (табл. 1п.1).

Таблица 1п.1

Положительные и отрицательные особенности периферической крови в качестве биологического материала для исследования иммунного статуса

Положительные особенности	Отрицательные особенности
1. Доступность для взятия	1. В периферической крови циркулирует не более 0,5–1 % от всего количества в организме лимфоцитов

2. Невысокая инвазивность методов забора	2. В периферической крови отсутствуют антигенспецифичные клоны лимфоцитов, активированные ИКК, продуценты АТ и цитокинов
2. Невысокая инвазивность методов забора	2. В периферической крови отсутствуют антигенспецифичные клоны лимфоцитов, активированные ИКК, продуценты АТ и цитокинов

Таким образом, определение количественных и функциональных характеристик ИКК периферической крови в большей степени отражает процессы воспаления (в рамках процессов кроветворения) тех популяций ИКК, потребление которых происходит наиболее активно и диктуется суммарным спектром персистирующих в организме в конкретный промежуток времени антигенов. Поэтому уровень диагностической информативности иммунограммы различен (табл. 1п.2).

Таблица 1п.2

Диагностическое значение параметров иммунного статуса различно в зависимости от особенностей патологических процессов

Уровни диагностического значения параметров иммунного статуса	Типы патологических процессов
1. <u>Высокий</u> (диагноз заболевания может быть поставлен практически только с помощью иммунодиагностических методов)	Врожденные иммунодефициты. Некоторые формы гемобластозов, парапротеинемии и проч.
2. <u>Средний</u> (постановка диагноза заболевания требует привлечения дополнительных методов, иммунодиагностические тесты играют вспомогательную роль)	Приобретенные иммунодефициты. Аутоиммунные заболевания. Инфекции с признаками системности или генерализации в острой фазе или в фазе обострения, в субкомпенсированной и декомпенсированной форме
3. <u>Низкий</u> (параметры иммунного статуса практически не информативны)	Локальные патологические процессы, включая онкологические, инфекционно-воспалительные, аутоиммунные заболевания в стадии ремиссии и/или в компенсированной форме

Определение иммунного статуса предполагает решение трех основных задач: диагностической, патогенетической и мониторинговой (табл. 1п.3).

Значение оценки иммунного статуса при ряде заболеваний и состояний

Задачи	Заболевания/ состояния*
1	2
диагностическая – позволяет поставить диагноз определенного заболевания	первичные иммунодефициты, лимфопролиферативные процессы, гемобластозы, трансплантации органов, клеток и тканей (определение совместимости пары донор-реципиент)
патогенетическая – позволяет установить вовлеченность иммунной системы в патогенез заболевания, а также позволяет установить механизм иммунного ответа или тип реагирования иммунной системы на патологический процесс	инфекционные процессы, аллергические процессы, аутоиммунные процессы, острые состояния – ДВС-синдром, ожоги, оперативные вмешательства, любые заболевания, протекающие с инфекционно-воспалительным, лимфопролиферативным, аллергическим или аутоагрессивным синдромами
мониторинговая – позволяет оценить тяжесть течения болезни, риск развития некоторых осложнений, эффективность терапии, включая иммунокорректирующую терапию	ВИЧ-инфекция, состояния после обширных оперативных вмешательств, аутоиммунные процессы, аллергические заболевания, состояния после трансплантации органов, клеток и тканей системные, генерализованные и локальные инфекционно-воспалительные заболевания, состояния, сопровождающиеся повреждениями тканей (инфаркт миокарда, острый панкреатит, острый гепатит, ожоговая болезнь и др.), онкологические заболевания

* – перечень наиболее эффективных тестов может быть различен при исследовании иммунного статуса при разных формах патологических процессов.

Выбор тестов иммунограммы осуществляется исходя из целей диагностики. Перечень тестов, позволяющих реализовать диагностическую и патогенетическую задачи, как правило, более широк, тогда как для мониторинга состояния иммунной системы можно оставить 2–5 наиболее патогенетически значимых параметра иммунного статуса. Кроме этого, формирование тестов иммунограммы может быть различным в разных лабораториях, что связано с их техническим оснащением, обеспечением реактивами, уровнем подготовки специалистов.

При анализе иммунограммы необходимо выполнить ряд последовательных шагов, представленных в виде *алгоритма анализа и интерпретации иммунограммы*.

Алгоритм анализа и интерпретации иммунограммы

1. Анализ иммунограммы выполняется по следующим шагам:

а) сравнение показателей иммунного статуса обследуемого пациента с показателями контрольной группы (референс-контроль),

б) определение возможных лабораторных артефактов. Например, должны обращать на себя внимание чрезмерно низкие или чрезмерно высокие показатели ряда параметров, выходящие за рамки обычных колебаний значений, так как они могут отражать использование дефектных реактивов или нарушений при проведении методики исследования.

2. Интерпретация иммунограммы выполняется по следующим шагам:

а) установите наиболее явные изменения в иммунном статусе (по отклонению от контрольных значений) и их логическую связанность с изменениями других показателей;

б) далее отвечайте на вопросы:

– При каких процессах индуцируются подобные изменения?

– Какие факторы контролируют изменения данных параметров иммунного статуса?

– При каких иммунологических процессах происходит активация данных регуляторных факторов?

– Могут ли данные иммунологические процессы иметь место в развитии заболевания у обследуемого пациента?

– Являются ли эти процессы вариантом физиологического ответа иммунной системы или отражают развитие иммунопатологических процессов?

– Какова диагностическая и прогностическая значимость наблюдаемых изменений?

– Какая дополнительная информация необходима для уточнения иммунологического диагноза?

3. Заключение по иммунограмме содержит ряд логически связанных между собой блоков:

а) перечисляются значимые изменения параметров иммунного статуса,

б) указываются иммунологические феномены, при которых могут наблюдаться эти изменения,

в) дается заключение о состоянии иммунной системы у данного пациента или об особенностях реагирования,

г) перечисляются возможные варианты прогноза состояния иммунной системы и организма в целом данного пациента,

- д) даются рекомендации по мониторингу состояния иммунной системы,
 е) перечисляются.

Показания для назначения иммунограммы

Исследование иммунного статуса **обязательно**:

- 1) при подозрении на наличие иммунодефицитного или иного иммунопатологического состояния,
- 2) перед назначением иммунокорректирующих препаратов для оптимального выбора препарата и последующего мониторинга эффективности терапии;
- 3) в случаях длительного течения инфекционно-воспалительного процесса, трудно поддающегося стандартной терапии.

Исследование иммунного статуса **желательно**:

- 1) для любого человека с целью определения особенностей его иммунной системы.

Особое значение придется исследованию иммунного статуса детей, так как в детском возрасте формируются основные индивидуальные особенности функционирования иммунной системы, зависящие, с одной стороны, от генетических факторов, а с другой – от эффективности иммунного ответа на проникающие в организм антигены.

Мониторинг иммунограммы проводится с различными интервалами в зависимости от иммунопатогенеза заболевания и продолжительности жизни иммунокомпетентных клеток и отдельных молекул (табл. 1п.5).

Таблица 1п.5

Периодичность мониторинга в зависимости от задач исследования при определении иммунного статуса

Группы факторов	Факторы	Периодичность мониторинга
Провоспалительные факторы	нейтрофилы	1 раз в 3–5 дней
	СК	1 раз в 3–5 дней
	СРБ	1 раз 7–14 дней
Популяционный состав лимфоцитов	Статусные показатели	<ul style="list-style-type: none"> • не чаще 1 раза в 2–3 недели при остром процессе, • не чаще 1 раза в 3–6 месяцев при хроническом процессе, • не чаще 1 раза через 2–3 недели после окончания курса терапии (стандартной или иммунокорректирующей), затем – через 2 мес.
	показатели активности	1 раз в 7–14 дней при остром процессе

Гуморальные факторы антиген специфического иммунитета	общий уровень Ig, антигенспецифич.	период $t_{1/2}$	диагностически значимый интервал времени
	антитела	Ig G – 21 сут	3–4 мес.
		Ig A – 6 сут	2–3 недели
		Ig M – 5 сут	2–3 недели
		Ig E – 2–3 сут	1–2 недели

При анализе результатов иммунограммы следует учитывать и возможность технических погрешностей, артефактов (табл. 1п.6).

Таблица 1п.6

Возможные артефакты при проведении лабораторных тестов иммунограммы

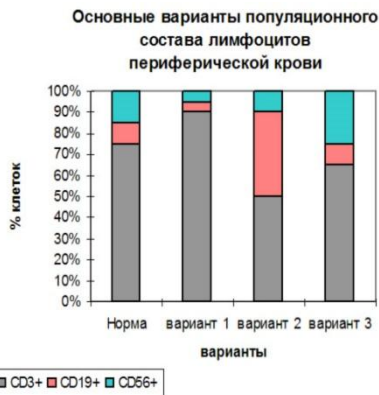
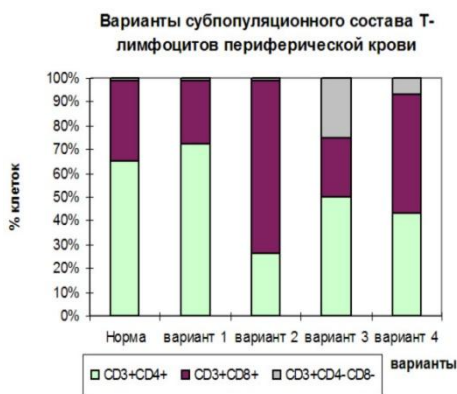
Обнаруженный феномен	Тактика анализа ситуации
1	2
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини: IgG < 5,0 г/л, IgM < 0,5 г/л, IgA < 0,9 г/г</p>	<p>1) в первую очередь оцените возможность артефактов: – просмотрите результаты всех анализов, выполненных одновременно с данным образцом, – проверьте, какие реактивы использовались при проведении исследования (недавно полученные из нового источника, напротив, с истекшим сроком годности и проч.), – проверьте, не произошло ли случайное неправильное разведение образца? Если нет, то</p> <p>2) обратите внимание на возраст пациента, для ребенка 1 года жизни эта находка может указывать на соответствующий первичный иммунодефицит. У взрослого человека – указывать на причину, связанную с потерей белков в целом (гастроэнтеропатии, нефротический синдром, ожоги, проведение плазмафереза и др.). В этом случае определяется общее снижение белковой фракции крови, а не изолированное снижение Ig (следует запросить результаты биохимического анализа крови). Кроме этого, гипоимуноглобулинемия развивается при иммуносупрессивной терапии, присутствии антител к иммуноглобулинам и др. состояниях (запросите более подробную информацию об этом). Если нет, то</p>

Обнаруженный феномен	Тактика анализа ситуации
1	2
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини: IgG < 5,0 г/л, IgM < 0,5 г/л, IgA < 0,9 г/г</p>	<p>3) ищите артефакт. В любом случае этот образец подлежит повторному исследованию, желательно с реактивами разных серий. Иммуноглобулины относятся к достаточно стабильным молекулам. При замораживании и размораживании образцов колебания уровня иммуноглобулинов незначительны. При хранении при +4 °С стабильность образца снижается (она связана с периодом полужизни молекул, для IgG – около 3 нед., для IgM – 5-6 сут., IgA – 7 сут.)</p>
<p>Определен уровень Ig в сыворотке крови в реакции простой радиальной иммунодиффузии по Манчини: IgG > 20,0 г/л, IgM > 5,5 г/л, IgA > 3,0 г/г</p>	<p>см. п. 1, кроме этого, проверьте, не стояла ли проба длительное время открытой. Испарение жидкой фракции сыворотки крови или крови в целом может привести к искусственному изменению уровня Ig, 2) запросите дополнительную информацию о пациенте. Если он страдает заболеванием, связанным с потерей жидкой фракции крови (ожоговая болезнь, экссудацией в «третье пространство»), то гипериммуноглобулинемия будет сочетаться с общим увеличением уровня белка в периферической крови, а также с общим увеличением всех классов Ig. Гипериммуноглобулинемия может отражать развитие опухолевых процессов В-лимфоцитов. Если нет, то п. 3</p>
<p>При мониторинговом контроле с интервалом 3–4 дня обнаружено 2–3-х-кратное снижение уровня IgG</p>	<p>1) помните о продолжительности периода полужизни Ig. При указанных условиях исследование артефактно, если только пациент не подвергался процедуре плазмафереза. Повторите исследование, оба образца сыворотки крови исследуйте одновременно (метод «парных» проб). Ошибка могла произойти из-за смены серий реактивов</p>

Обнаруженный феномен	Тактика анализа ситуации
1	2
<p>Результаты НСТ-теста не соответствуют заболеванию: НСТ-тест характерный для острого воспалительного заболевания при его отсутствии (аналогично для фагоцитарной активности нейтрофилов)</p>	<p>1) проверьте чистоту посуды. Примеси и остатки бактериальных продуктов могли выступать в роли стимуляторов метаболической активности нейтрофилов. Контролируйте посуду для взятия крови и постановки этих тестов!</p>
<p>Результаты НСТ-теста крайне низкие</p>	<p>1) такое возможно только при хроническом гранулематозе, а также после применения мощной антибактериальной терапии. Уточните, по какому поводу проводится исследование? Если нет, то 2) проверьте качество реактивов – они всегда должны быть свежеприготовленными. Хранение готовых субстратов не допускается!!</p>
<p>При иммунофенотипировании получены крайне низкие уровни экспрессии ряда маркеров</p>	<p>1) проблема МАТ – проверьте качество, 2) оцените, могут ли данные маркеры присутствовать на клетках периферической крови? Ряд адгезивных молекул, например, обнаруживается лишь на тканевых формах лимфоцитов или в пристеночном сосудистом пуле. Посоветуйтесь с коллегами.</p>
<p>Обнаружены монотонно высокие уровни функциональной активности СК и отдельных компонентов</p>	<p>1) не гемолизирована ли сыворотка крови? 2) тщательно ли отделена сыворотка крови от сгустка? 3) обратите внимание на результаты контролей. Годны ли эритроциты барана для приготовления гемсистемы? Повторите исследование</p>
<p>Обнаружены нулевые уровни активности компонентов СК</p>	<p>1) проверьте какой образец Вы исследовали? Не плазму ли? 2) качество посуды!!! Примеси ПАВ значительно изменяют активность комплемента. Повторите исследование</p>

Методические указания к выполнению практической работы

1. Опишите особенности потребления и восполнения популяций лимфоцитов согласно представленным ниже графикам. В каких ситуациях это возможно?



2. Обсудите предложенные для анализа и интерпретации иммунограммы.

Содержание отчета

Представьте в письменном виде выполненные задания.

Литература

1. Хаитов Р. М. Иммунология : учебник. 3-е изд. перераб. и доп. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. 496 с.
2. Ярилин А. А. Иммунология : учебник. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.
3. Immunobiology: the immune system in health and disease / C. A. Janeway, Jr., P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik. 5th ed., 2001. 732 p.
4. Ляликов С. А., Тихон Н. М. Клиническая иммунология и аллергология : учеб. пособие. Минск : Вышэйш. шк., 2015. 366 с.
5. Хаитов Р. М. Иммунология: учебник. 2-е изд. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011. 528 с.
6. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Мешкова Р. Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с.

Основные алгоритмы приобретения реактивов и лабораторного оборудования

При приобретении товаров необходимо руководствоваться следующим:

1. Проанализировать имеющиеся коммерческие предложения фирм-распространителей реактивов и лабораторного оборудования с помощью каталогов. Каталог реактивов и лабораторного оборудования представляет собой банк данных об имеющихся в наличии или доступных со склада товаров, разделенный на тематические разделы. Каждому наименованию товара присвоен свой каталожный номер, позволяющий продавцу идентифицировать именно тот товар, который вам нужен. Каталоги могут быть представлены в печатном или электронном виде. Работа с электронным каталогом производится через Интернет после предварительной регистрации на сайте поставщика или фирмы-производителя. На рис. П.1 и П.2. представлены поисковые системы электронного каталога фирмы «Sigma Aldrich». В случае отсутствия необходимого наименования дополнительную информацию о нем можно получить по телефонам фирм.

2. После того как выбор необходимого наименования сделан, необходимо составить *заявку* с указанием каталожного номера продукта. Его наименования, желаемое количество единиц продукции и ваших контактных координат. Составленная таким образом заявка должна быть выслана/отправлена по факсу на адрес фирмы.

3. По получению заявки фирма высылает на адрес организации коммерческое предложение, протокол согласования цены и 2 экземпляра договора, в котором оговариваются конкретные условия поставки товара: сроки производства оплаты и сроки и условия доставки.

4. В случае если на территории республики данный вид продукции реализуется несколькими фирмами, должен быть проведен *тендер*.

Тендер – соревнование представленных претендентами письменных предложений продавца о заключении договора, содержащих все основные условия предстоящей сделки:

- наименование товара,
- количество,
- качество,
- цену,
- условия поставки,
- срок поставки,
- условия платежа,

– характер тары и упаковки, с точки зрения их соответствия критериям, содержащимся в тендерной документации.

По результатам анализа представленных предложений составляется **конкурентный лист**, в котором перечислены все поступившие предложения (обычно не менее трех). Проведение тендера не требуется в случае, если товар реализуется только одной фирмой, либо цена на данный вид товара регламентирована и одинакова у всех продавцов.

5. Договор с выбранной фирмой должен быть подписан руководителем организации не позднее сроков действия коммерческого предложения (от 3 до 10 дней) на основании заявления на оплату, составленного от имени руководителя вашей лаборатории. Один экземпляр договора передается в бухгалтерию организации, второй отсылается фирме-поставщику вместе с подписанным протоколом согласования цены.

6. В зависимости от составленного договора возможны 2 варианта оплаты: предварительная или после поставки товара.

7. В зависимости от составленного договора возможны 2 варианта получения товара: доставка поставщиком или самовывоз со склада.

8. Получить товар может любое лицо, являющееся сотрудником данной организации и получившее доверенность, при предъявлении этой доверенности и документа, удостоверяющего личность.

9. При выдаче товара на него оформляется счет-фактура, заверенная печатью продавца и подписанная принимающей стороной.

Счет-фактура – документ, являющийся основанием для принятия предъявленных сумм НДС к вычету или возмещению. В нем должны быть указаны:

- порядковый номер и дата выписки счета-фактуры;
- наименование, адрес и идентификационные номера налогоплательщика и покупателя;
- наименование и адрес грузоотправителя и грузополучателя;
- номер платежно-расчетного документа в случае получения авансовых или иных платежей в счет предстоящих поставок товаров;
- наименование поставляемых товаров и единица измерения;
- количество поставляемых по счету-фактуре товаров,
- цена за единицу измерения без учета налога, с учетом суммы налога;
- стоимость товаров за все количество поставляемых товаров без налога;
- налоговая ставка;
- сумма налога, предъявляемая покупателю товаров, определяемая исходя из применяемых налоговых ставок;
- стоимость всего количества поставляемых товаров с учетом суммы налога;
- страна происхождения товара;

– номер грузовой таможенной декларации.

Счет-фактура подписывается руководителем и главным бухгалтером организации либо иными лицами, уполномоченными на то приказом по организации или интернетсетью от имени организации. При выставлении счета-фактуры индивидуальным предпринимателем счет-фактура подписывается индивидуальным предпринимателем с указанием реквизитов свидетельства о государственной регистрации этого индивидуального предпринимателя.

10. На полученный товар оформляется приемный акт, заверяется руководителем организации и главным бухгалтером. Лицо, получившее товар в соответствии с приемным актом, несет материальную ответственность за его хранение и применение.

11. По завершению операции все документы: договор, счет-фактура и приемный акт, поступают на хранение в бухгалтерию организации.

12. После использования реактивы и неподлежащие ремонту оборудование должно быть списано в соответствии с установленной процедурой.

The screenshot displays the Sigma-Aldrich website search interface. At the top, the search bar contains 'Product Name: HEPES'. Below the search bar, there is a 'Technical Service' banner with the text 'Need help selecting the right product? Live Chat with a Scientist'. The main content area is titled 'Refine Your Search' and shows 'Products (132)'. A sidebar on the left lists search criteria: Product Category, Special Grade, Brand, Purity, Formula Weight, pH Value, pK Value, and Physical Form. The main list of products includes items like 'HEPES (9)', 'HEPES hemisodium salt (3)', 'HEPES potassium salt (2)', 'HEPES sodium salt (6)', 'HEPES sodium salt hydrate (1)', 'HEPES sodium salt solution (1)', 'HEPES solution (2)', 'HEPES Sodium salt buffer solution (1)', '0.1 M HEPES pH 7.0 – 10% PEG 600 solution (1)', and '0.1 M HEPES pH 7.0 – 10% PEG 6000 solution (1)'. The page number is [1] and results per page are 10. Annotations include 'Страница поиска' pointing to the search bar, 'Дополнительные критерии поиска' pointing to the filter sidebar, and 'Результаты поиска' pointing to the product list.

Рис. П.1. Поиск необходимых реактивов через интернет-каталог

Products (9) Related Information (723) Take a Tour

Your Feedback Sorting Options: Relevancy

HEPES (9)

Empirical Formula (Hill Notation): $C_9H_{18}N_2O_4S$, Formula Weight: 238.30, CAS Number: 7365-45-9

H3375 $\geq 99.5\%$ (titration) (Sigma)

Product Number	Your Price EUR	Available to Ship	Quantity	Actions
H3375-25G	26.70	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	
H3375-100G	66.00	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	
H3375-250G	137.00	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	
H3375-500G	289.00	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	
H3375-1KG	451.00	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	
H3375-5KG	2175.00	17.06.2007 details...	<input type="text"/>	

Каталожный номер

Номер в специальной системе Chemical Abstracts Service

Дополнительная информация

Расфасовка

Цена

Добавить в избранное

Доступность

Рис. П.2. Основные характеристики товаров в электронных каталогах

Правила работы в лабораториях

Аппараты, приборы и оборудование

1. При пользовании спиртовой горелкой (спиртовкой) нельзя наливать спирт в нее, не потушив спиртовку, так как при наливании спирта выделяемые пары его могут воспламениться. Спиртовка должна иметь металлическую трубку и шайбу для фитиля. При их отсутствии может быть воспламенение паров спирта внутри резервуара и взрыв спиртовки.

2. Помещения лаборатории должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией с механическим побуждением. Вентиляционные устройства должны размещаться так, чтобы шум от них не мешал работе персонала. Вентиляция во всех помещениях лаборатории должна включаться до начала работы.

3. В помещениях для проведения исследований мочи и кала, биохимических, серологических и гормональных исследований следует устанавливать вытяжные шкафы с механическим побуждением. Скорость движения воздуха в полностью открытых створках вытяжного шкафа должна быть 0,3 м/с, при работе с ртутью – 0,4 м/с, с сероводородом – 0,7 м/с.

Створки (дверцы) вытяжного шкафа во время работы следует держать максимально закрытыми (опущенными с небольшим зазором внизу для тяги). Открывать их можно только на время обслуживания приборов и установок. Приподнятые створки должны прочно укрепляться приспособлениями, исключающими неожиданное падение этих створок.

4. Помещения лаборатории должны освещаться непосредственно прямым естественным светом. Отношение площади окон к площади пола должно быть 1:4 или 1:5.

5. Металлические корпуса всех электроприборов и электродвигателей (автоклавы, центрифуги, муфельные печи, сушильные шкафы и т. д.) должны быть обязательно заземлены.

При эксплуатации центрифуг необходимо соблюдать следующие требования:

а) при загрузке центрифуги стаканами или пробирками соблюдать правила строгого попарного уравнивания;

б) перед включением центрифуги в электрическую сеть необходимо проверить, хорошо ли привинчена крышка к корпусу;

в) включать центрифугу в электрическую сеть следует плавно при помощи реостата, после отключения надо дать возможность ротору остановиться, тормозить ротор рукой запрещается;

г) после работы центрифугу нужно осмотреть и протереть.

6. При эксплуатации термостата необходимо соблюдать следующие требования:

- а) запрещается в термостат ставить легковоспламеняющиеся вещества;
- б) предохранительные колпаки от регулирующих устройств нельзя снимать без электромонтера;
- в) чистку термостата производить только после отключения его от сети.

7. При эксплуатации рефрижераторов (холодильников) нельзя допускать перестановку и перемещение их без участия специалиста.

8. Электроплиты, муфельные печи и другие нагревательные приборы должны устанавливаться на асбестовом или другом теплоизолирующем материале. Не следует допускать попадание на них кислот, щелочей, растворов солей и т. д.

9. При прекращении подачи электрического тока необходимо выключить все электроприборы.

10. Лабораторные столы для микроскопических или каких-либо других точных исследований должны располагаться у окон. Для предотвращения переутомления и порчи зрения при микроскопировании и пользовании другими оптическими приборами необходимо обеспечить правильное освещение поля зрения, предусмотренное для данного микроскопа или прибора, не закрывать неработающий глаз, работать попеременно то одним, то другим глазом и делать перерывы в работе при утомлении зрения.

11. Верхняя доска лабораторного стола должна изготавливаться из водонепроницаемого, кислото-щелочеустойчивого и несгораемого материала.

12. Перед каждым аналитическими весами необходимо иметь светильники.

13. Баллоны со сжатыми газами должны иметь предохранительные колпачки. Баллоны нельзя помещать в места, освещаемые прямыми солнечными лучами, они не должны находиться вблизи нагревательных приборов, отопительных приборов и соприкасаться с электрическими проводами.

14. Расстояние от радиаторов и других отопительных приборов до баллонов должно быть не менее 1 м, а от печей и других источников тепла с открытым огнем – не менее 5 м. При наличии у отопительных приборов экранов, предохраняющих баллоны от местного перегрева, расстояние между экраном и баллоном должно быть не менее 100 мм. Баллоны должны быть тщательно закреплены в вертикальном положении.

15. Работающие в лаборатории обязаны перед началом работы надеть установленную действующими нормами спецодежду и иметь индивидуальные средства защиты, предусмотренные инструкцией. Для ра-

ботников лаборатории должны быть индивидуальные шкафы для спецодежды персонала.

16. В помещении лаборатории запрещается:

а) оставлять без присмотра зажженные горелки и другие нагревательные приборы, держать вблизи горячих горелок вату, марлю, спирт и другие воспламеняющиеся вещества;

б) убирать случайно пролитые огнеопасные жидкости при зажженных горелках и включенных электронагревательных приборах;

в) зажигать огонь и включать ток, если в лаборатории пахнет газом. Предварительно необходимо определить и ликвидировать утечку газа и проветрить помещение. Место утечки газа определяется с помощью мыльной воды;

г) наливать в горящую спиртовку горючее, пользоваться спиртовкой, не имеющей металлической трубки и шайбы для сжатия;

д) употреблять бензин для разжигания примусов;

е) проводить работы, связанные с перегонкой, экстрагированием, растиранием вредных веществ и т. д., при неисправной вентиляции;

ж) при работе в вытяжном шкафу держать голову под тягой;

з) пробовать на вкус и вдыхать неизвестные вещества;

и) наклонять голову над сосудом, в котором кипит или в который налита какая-либо жидкость;

к) хранить запасы ядовитых, сильнодействующих, взрывоопасных веществ и растворов на рабочих столах и стеллажах;

л) хранить и применять реактивы без этикеток;

м) хранить в рабочих помещениях какие-либо вещества неизвестного происхождения;

н) хранить и принимать пищу, а также курить;

о) хранить личную одежду в помещениях лаборатории, а также уносить спецодежду домой;

п) работать без установленной специальной и санитарной одежды и предохранительных приспособлений;

р) выполнять работы, не связанные с заданием и не предусмотренные рабочими инструкциями;

с) сушить что-либо на отопительных приборах;

т) загромождать и захламлять проходы и коридоры, а также подходы к средствам пожаротушения.

Хранение, учет и применение ядовитых, сильнодействующих, едких, взрывоопасных и огнеопасных средств и растворов, а также работа с инфицированным материалом

Ядовитые средства должны храниться в отдельной комнате в металлических шкафах или сейфах под замком и пломбой. Комната должна быть оборудована водопроводом, канализацией, вентиляцией и вытяж-

ным шкафом. В аудиториях, где производятся занятия с учащимися, хранение ядовитых средств после окончания учебных занятий не разрешается.

Концентрированные растворы кислот должны храниться в специальных бутылках с притертой пробкой, поверх которой необходимо надевать стеклянный притертый колпачок.

Щелочи должны храниться в широкогорлых банках оранжевого стекла, закрытых корковыми пробками, и заливаться слоем парафина.

Посуда для хранения ядовитых веществ, щелочей и кислот должна иметь четкие надписи (чернилами по стеклу).

Горючие и взрывоопасные вещества должны содержаться в толстостенных емкостях (банках) в железных ящиках, выложенных асбестом. Эти реактивы должны быть хорошо закупорены.

При закупоривании реактивов пробками следует учитывать свойства реактивов. Резиновые пробки сильно набухают под действием спирта, бензола, ацетона, эфира. Под действием галогенов (брома, йода) резиновые пробки становятся хрупкими, теряют эластичность. Такие реактивы лучше закупоривать стеклянными притертыми пробками. Щелочь нельзя закупоривать притертыми пробками, так как внутренняя поверхность горла сосуда смачивается щелочью, а затем под влиянием углекислого газа между пробкой и горлом образуются карбонаты, которые плотно заклинивают пробку.

Если реактив чувствителен к действию света, его хранят в банках из оранжевого стекла. Банку из светлого стекла можно завернуть в темную бумагу и поставить в шкаф, непроницаемый для света.

Категорически запрещается совместное хранение легковоспламеняющихся огне- и взрывоопасных веществ с кислотами и щелочами.

Работу с ядовитыми веществами можно поручать только работникам, прошедшим специальный инструктаж. Расфасовка, измельчение, взвешивание и отмеривание ядовитых и сильнодействующих средств должно проводиться в вытяжных шкафах с использованием специально выделенных для этой цели приборов и посуды. Нагревание ядовитых веществ должно производиться только в круглодонных колбах. Нагревать колбы на открытом огне запрещается. Работу с ядовитыми веществами следует проводить в резиновых перчатках, защитных очках, при необходимости в противогазе. Наполнение сосудов ядовитыми веществами, концентрированными кислотами и щелочами следует проводить сифоном или специальной пипеткой с резиновой грушей. После окончания работы следует тщательно вымыть руки, а в соответствующих случаях – вычистить зубы и прополоскать рот.

Биксы, банки, бутылки с летучими веществами должны открываться только в момент непосредственного пользования ими. Открывание сосудов с концентрированными кислотами и щелочами и приготовление рас-

творов из них разрешается только в вытяжном шкафу с включенной принудительной вентиляцией. Щелочи следует брать из банки шпателями. При приготовлении растворов щелочей определенную навеску щелочи опускают в большой сосуд с широким горлом, заливают необходимым количеством воды и тщательно перемешивают. Большие куски едкой щелочи разбивают в специально отведенном месте. При разбивании щелочь накрывают холстом или другими материалами. При разбавлении крепких кислот, во избежание разбрызгивания их, следует кислоту добавлять в воду, а не наоборот. При работе с кислотами и щелочами запрещается насаживать жидкость в пипетку ртом. Для набора жидкости в пипетку следует использовать резиновые груши с трубками. При кипячении растворов и до полного их остывания нельзя закрывать посуду (пробирки, колбы) пробкой. Нагревая жидкость в пробирке, необходимо держать пробирку отверстием в сторону от сотрудников и от себя.

При *проливании* неядовитых реактивов достаточно вытереть поверхность стола тряпкой, держа ее резиновыми перчатками, после чего хорошо прополоскать тряпку, вымыть водой стол и перчатки. Если пролита щелочь, то ее надо засыпать песком или опилками, затем удалить песок или опилки и залить это место сильно разбавленной соляной кислотой или же уксусной. После этого удалить кислоту тряпкой, вымыть водой стол и перчатки. Если пролита кислота, то ее надо засыпать песком (опилками засыпать нельзя), затем удалить пропитанный песок лопаткой и засыпать содой, затем соду также удалить и промыть это место большим количеством воды. Растворы для нейтрализации концентрированных кислот и щелочей должны находиться на стеллаже (полке) в течение всего рабочего времени. Отработанные горючие жидкости собирают в специальную герметично закрывающуюся тару и передают для регенерации или уничтожения. Спуск их в канализацию воспрещается. Исползованные кислоты и щелочи следует собирать порознь в специально предназначенную посуду. Небольшое количество едких веществ можно выливать в раковину лишь после сильного разведения их водой. Для слива отходов летучих веществ, распространяющих резкий, неприятный запах, необходимо предусмотреть раковину в вытяжном шкафу с подведенным к ней водопроводным краном.

При проведении бактериологических исследований с инфекционным материалом должны соблюдаться следующие правила:

1) при распаковке инфекционного материала, присланного в лабораторию для исследования, банки и пробирки, содержащие материалы, обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы, ковчезы или в штативы;

2) перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды, проходимость игл и поршней у шприцев;

3) запрещается прикасаться к исследуемому материалу и к конденсату воды в засеянных чашках руками. Работу с инфекционным материалом следует проводить с помощью инструментов (пинцетов, игл, петлей, корнцангов и т. д.);

4) посев в пробирки и чашки Петри проводить около горячей горелки с обжиганием петли, шпателя и краев пробирки;

5) переливание инфекционных жидкостей из сосуда в сосуд через край не допускается;

6) при посеве инфекционного материала на пробирках, чашках, колбах, флаконах и прочей посуде делают надписи с указанием названия материала, номера анализа и даты посева;

7) в комнате, предназначенной для обработки и посева инфекционного материала, запрещается проводить другие виды работ;

8) в процессе работы и после окончания работы используемые предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на одни сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят;

9) посуду с использованными питательными средами, калом и мочой и др. материалами, взятыми от инфекционных больных, собирают в баки и обеззараживают автоклавированием, обрабатывают дезинфицирующим раствором или кипячением;

10) запрещается оставлять на столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфекционным материалом;

11) поверхность рабочих столов обрабатывают дезинфицирующим раствором, руки обмывают дезинфицирующим раствором, а затем моют в теплой воде с мылом как после окончания работы, так и при перерыве в работе, при выходе из помещения;

12) при уборке помещения в конце рабочего дня полы моют с применением дезинфицирующего раствора, стены, двери, полки, подоконники, окна, шкафы и т.д. протирают дезинфицирующим раствором; дезинфекционные работы персонал должен проводить в резиновых перчатках.

Содержание

Введение.....	3
Список использованных сокращений.....	4
Лабораторная работа № 1 Организация исследования клеток и молекул иммунной системы. Виды биологических материалов, используемых для иммунологических исследований	5
Лабораторная работа № 2 Исследование системы комплемента.....	21
Лабораторная работа № 3 Методы исследования уровня иммуноглобулинов в биологическом материале.....	26
Лабораторная работа № 4 Количественное исследование субпопуляций лимфоцитов	37
Лабораторная работа № 5 Исследование функциональной активности нейтрофилов	46
Лабораторная работа № 6 Типирование молекул главного комплекса гистосовместимости	54
Лабораторная работа № 7 Исследование цитотоксической и пролиферативной активности лимфоцитов.....	63
Лабораторная работа № 8 Оценка цитокинпродуцирующей активности клеток и концентрация цитокинов в биологических средах.....	76
Практическая работа 1 Принципы анализа и интерпретации результатов исследования иммунного статуса человека	80
Приложение 1 Основные алгоритмы приобретения реактивов и лабораторного оборудования	89
Приложение 2 Правила работы в лабораториях	93

Учебное издание

Романовская Татьяна Ренольдовна
Зафранская Марина Михайловна
Нижегородова Дарья Борисовна и др.

МЕТОДЫ
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Лабораторный практикум

Редактор *Л. М. Корневская*
Компьютерная верстка *Д. В. Головач*
Технический редактор *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 22.12.2017. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 6,25. Уч.-изд. л. 4,23.
Тираж 100 экз. Заказ № 62.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.