

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ЧЕРКАСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ БОГДАНА ХМЕЛЬНИЦЬКОГО

КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ

В.Л. СОКОЛЕНКО, С.В. СОКОЛЕНКО

ПРИКЛАДНА ІМУНОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник

ЧЕРКАСИ 2012

УДК 612.017.1

ББК 52.7я73-1

Рецензенти:

завідувач кафедри біології та біохімії

Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького,
доктор біологічних наук, професор, чл.-кор. АПН України – Ф.Ф. Боєчко.

Завідувач відділу ендокринології комунального закладу

«Обласна лікарня – центр екстреної медичної допомоги та медицини катастроф»

Черкаської обласної ради, кандидат медичних наук, доцент – І.А. Бондарець

Соколенко В.Л., Соколенко С.В.

**Прикладна імунологія. Навчально-методичний посібник – Черкаси:
Вид. від. ЧНУ ім. Богдана Хмельницького, 2011. – 60 с.**

Навчально-методичний посібник для студентів денної та заочної форми навчання напряму підготовки **6.040102** – «біологія» охоплює основні теми, передбачені навчальною програмою курсу «Прикладна імунологія». Містить теоретичні дані до кожної теми, опис матеріалів і методів досліджень, детально проаналізовані етапи практичного виконання лабораторного експерименту.

УДК 612.017.1

ББК 52.7я73-1

ISBN 978-966-353-255-4

Рекомендовано до друку Вченою радою Черкаського національного університету імені Богдана Хмельницького (протокол №1 від 30.08.2011)

ЗМІСТ

ПРИКЛАДНА ІМУНОЛОГІЯ ЯК НАУКА.....	
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. ТЕМА: ЗАБІР КРОВІ. ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЛЕЙКОЦИТІВ.....	
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. ТЕМА: ОЦІНКА ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ.....	
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. ТЕМА: ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ.....	
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ ЕРИТРОЦИТАРНИХ АНТИГЕНІВ СИСТЕМ АВ0 ТА Rh.....	
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. ТЕМА: КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ МЕТОДОМ РАДІАЛЬНОЇ ІМУНОДИФУЗІЇ В ГЕЛІ.....	
ЛІТЕРАТУРА.....	

ПРИКЛАДНА ІМУНОЛОГІЯ ЯК НАУКА

Прикладна імунологія – розділ імунології, що вивчає процеси в організмі, які можуть зумовлювати зміни показників імунограми за нормальних умов та у динаміці захворювання, обґрунтовує принципи трактування імунограми, знайомить з методами її визначення, розглядає засоби імунопрофілактики та імунотерапії.

Мета даного посібника – засвоєння навичок використання на практиці найбільш доступних методів оцінки показників імунної системи:

До імунологічних методів діагностики відносять.

Загальні імунологічні методи: лейкограма; протеїнограма; С-реактивний протеїн.

Лейкограма – оцінка співвідношення окремих популяцій лейкоцитів крові.

Протеїнограма – співвідношення білкових фракцій крові, зміна яких може свідчити про певні патології. Найбільш показовою є фракція γ -глобулінів, оскільки саме до неї відносяться антитіла.

С-реактивний протеїн – належить до білків гострої фази і характеризує стан гуморальної ланки неспецифічного імунітету.

Спеціальні імунологічні методи: фагоцитарний показник; загальний комплемент; лімфограма; імуноглобуліни; циркулюючі імунні комплекси (ЦІК); імуноморфологічні методи; імуногенетичні методи.

Фагоцитарний показник – оцінка активності професійних фагоцитів, особливо нейтрофілів, та їх здатності поглинати інфекційні фактори.

Загальний комплемент – оцінка співвідношення білків, які утворюють систему комплементу.

Лімфограма – оцінка відносного та загального числа найважливіших лімфоцитів (з фенотипами $CD3^+$ – субпопуляція функціонально зрілих Т-лімфоцитів; $CD4^+$ – субпопуляція хелперних Т-лімфоцитів; $CD8^+$ – субпопуляція ефекторних Т-лімфоцитів; $CD72^+$ – субпопуляція функціонально зрілих В-лімфоцитів; $CD16^+$ – субпопуляція природних кіллерів).

Імуноглобуліни – оцінка вмісту основних класів сироваткових імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA, IgE).

Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК) – нефагоцитовані комплекси антигенів та антитіл.

Імуноморфологічні методи – оцінка морфологічних особливостей клітин імунної системи чи імунних органів.

Імуногенетичні методи – це оцінка генетично детермінованих факторів (лейкоцитарних, еритроцитарних та сироваткових, найважливішою з яких є лейкоцитарна система HLA).

Найбільш доступні і поширені методи імунної діагностики розглядаються у запропонованих лабораторних роботах.

Рівні діагностичного пошуку.

Оскільки визначення різних імунологічних показників суттєво різняться за вартістю й діагностичною цінністю в лабораторній імунології, сформовані три рівні діагностичного пошуку, відповідно до цього, всі показники імунітету розділяють на три групи:

I. Скринінгові дослідження (I рівень):

1. Визначення рівнів Т- і В-лімфоцитів.
2. Визначення рівня природних кілерів.
3. Визначення рівнів сироваткових імуноглобулінів різних класів.
4. Оцінка функціональної активності нейтрофілів (фагоцитарне число, фагоцитарний індекс).
5. Визначення загального титру комплементу.
6. Визначення рівня секреторного IgA.
7. Визначення рівня лізоциму.

II. Розширена імунограма (II рівень):

1. Дослідження окремих субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів.
2. Дослідження окремих функціональних можливостей фагоцитів.
3. Дослідження рівнів окремих компонентів системи комплементу.

III. Оцінка ефекторної ланки імунітету (III рівень):

1. Дослідження рівнів окремих цитокінів.
2. Дослідження експресії окремих активаційних молекул.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1

Тема: ЗАБІР КРОВІ. ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЛЕЙКОЦИТІВ

Мета заняття: опанувати техніку забору капілярної крові та роботи з камерою Горяєва для визначення загального числа лейкоцитів.

Обладнання та реактиви:

1. Стерильна пробірка для підрахунку числа лейкоцитів, заповнена 0,4 мл 3–5%-ного розчину оцтової кислоти.
2. Стерильні піпетки місткістю 0,02 мл.
3. Стерильні піпетки чи бюретки місткістю 5 і 1 мл (для розведення реагентів).
4. Сухі знежирені предметні та шліфувальні скельця.
5. Індивідуальний стерильний скарифікатор.

Все перераховане устаткування та реактиви готують завчасно.

ТЕОРЕТИЧНІ ДАНІ

Лейкоцити

Лейкоцити — це клітини крові, що характеризуються складною структурною організацією, великим набором ферментів і високою спеціалізацією. У нормі і при більшості патологічних процесів в периферичній крові можна виявити п'ять видів лейкоцитів: нейтрофіли, еозинофіли і базофіли, що відносяться до гранулоцитів, а також моноцити і лімфоцити (Рис. 1).

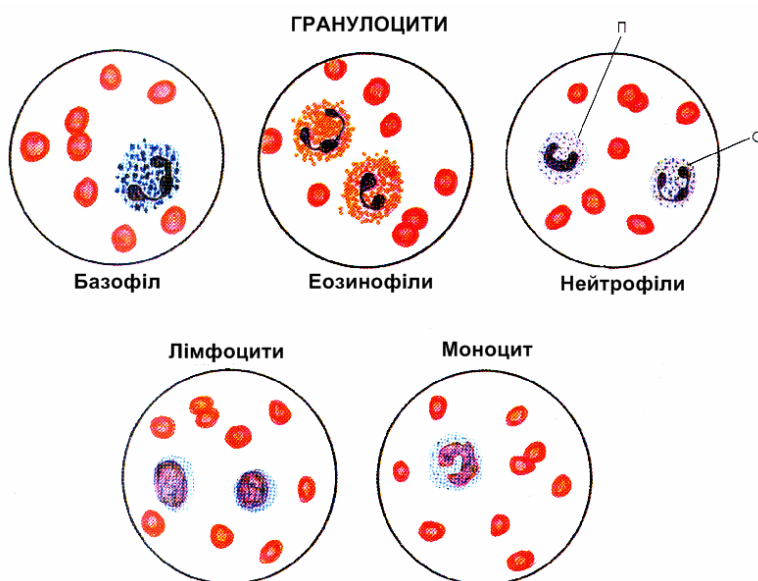


Рис. 1. Види лейкоцитів, що виявляються в периферичній крові в нормі.

В організмі вони виконують чисельні, головним чином, захисні, функції:

1. **Функція фагоцитозу**, властива переважно зрілим нейтрофілам і моноцитам. Нейтрофіли активно рухаються до ділянок запалення і тканинного розпаду, мікробних тіл, вірусів, а також інших дрібних часток, виділяючи при цьому гідролітичні та інші ферменти і деякі речовини пероксидазної природи. При цьому проявляють потужну бактерицидну дію та сприяють руйнуванню мікробів і вірусів.

2. **Моноцити**, що швидко накопичуються у вогнищі запалення і деструкції тканин, здійснюють функції макрофагів, усуваючи шляхом ендоцитозу мертві клітини. Моноцити забезпечують, зокрема, звільнення області запалення від продуктів розпаду клітин, що є важливою передумовою для подальшого розвитку проліферативної фази запалення (фази репарації).

3. **Еозинофіли** забезпечують детоксикуючу дію, адсорбуючи на собі імунні комплекси, фібрин, гістамін і тому подібне. Роль еозинофілів полягає, перш за все, в обмеженні уражень, викликаних імунними комплексами.

4. **Базофіли**, разом з іншими лейкоцитами, активно беруть участь в запальному процесі, виділяючи гепарин, гістамін, серотонін. Дві останні речовини здійснюють вплив на судинну проникність і тонус гладенької мускулатури, що виражено змінюється у вогнищі запалення. Гепарин зв'язує білки, що вийшли з клітин у міжклітинну рідину, і послаблює їх несприятливий вплив на цитоплазматичні мембрани.

5. **Лімфоцити** відграють важливу роль у процесах клітинного (Т-лімфоцити) і гуморального (В-лімфоцити) імунітету, беручи участь у боротьбі з внутрішньоклітинними паразитами і утворенні антитіл.

Камера Горяєва

Рахункова камера є товстою скляною пластиною (предметне скло) з поглибленням в центрі, рівним 0,1 мм (рис. 2). На дні камери нанесено 2 сітки Горяєва, розмежованої поперечною канавкою. Збоку від сіток розташовані скляні прямокутні пластини, до яких притирається шліфоване покривне скло.

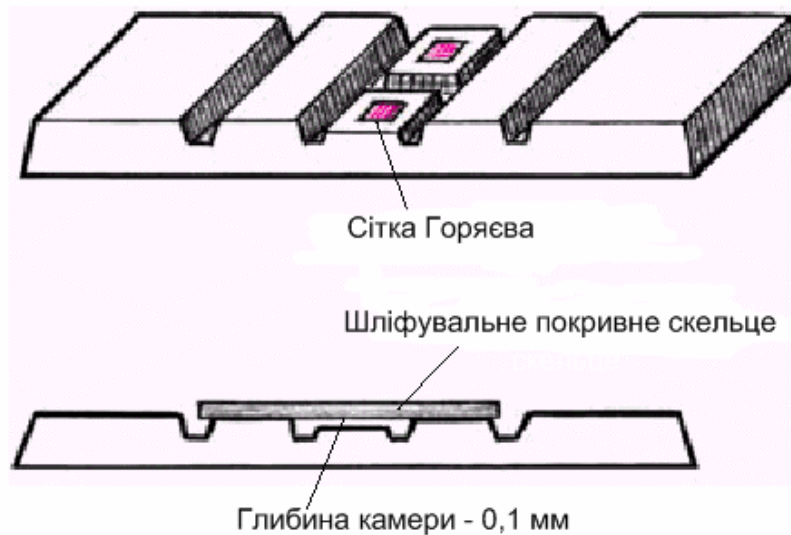


Рис. 2. Камера Горяєва

Сітка Горяєва (рис. 3) складається з 225 великих квадратів, 25 з яких розділені ще на 16 малих квадратів кожен. Сторона великого квадрата становить 0,2 мм, сторона малого квадрата – у 4 рази менша (0,05 мм). Відповідно, площа великого квадрата складає $0,04 \text{ мм}^2$ ($4 \times 10^{-2} \text{ мм}^2$), малого квадрата – $0,0025 \text{ мм}^2$ ($2,5 \times 10^{-3} \text{ мм}^2$).

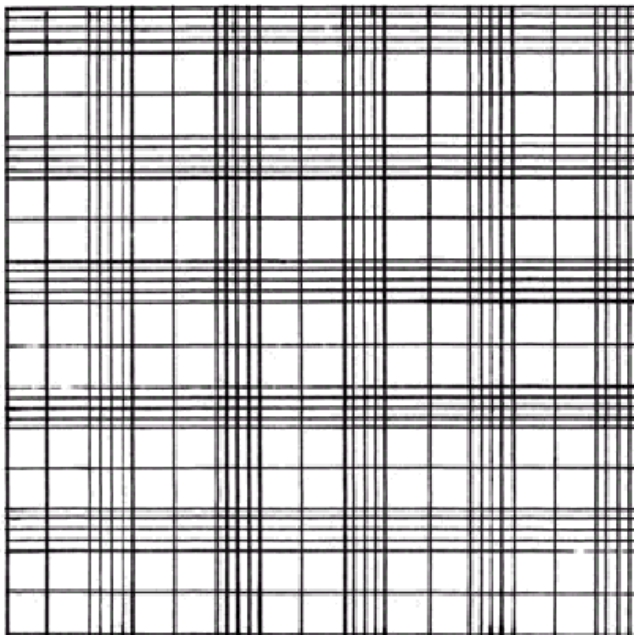


Рис. 3. Сітка Горяєва для підрахунку формених елементів

Якщо враховувати глибину камери, рівну 0,1 мм, то об'єм одного малого квадрата сітки Горяєва складе $2,5 \times 10^{-4} \text{ мкл}$, великого – $4,0 \times 10^{-3} \text{ мкл}$.

ХІД ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Забір крові.

Кров для загального клінічного аналізу беруть, зазвичай, з м'якоті нігтьової фаланги IV пальця руки, отримуючи, так звану, капілярну кров. Дослідження проводять вранці, бажано натщесерце, щоб уникнути травного лейкоцитозу, хоча це правило не є строго обов'язковим.

У момент забору крові з пальця пацієнт повинен сидіти або лежати. Шкіру м'якоті нігтьової фаланги IV пальця лівої руки протирають ватною кулькою, змоченою спиртом (рис. 4а) і проколюють індивідуальним стерильним скарифікатором (рис. 4б). Укол слід робити швидким коротким рухом до упору, одночасно фіксуючи пальцями лівої руки кінцеву фалангу IV пальця пацієнта і злегка натискаючи шкіру. Першу краплину крові (рис. 4в) витирають сухою ватною кулькою.

Для підрахунку загального числа лейкоцитів набирають кров в піпетку (до мітки 0,02) і вносять її в пробірку Відаля, заповнену 0,4 мл розчину оцтової кислоти, що гемолізує еритроцити (рис. 5). Таким чином отримують розведення крові в 20 разів.

Підрахунок формених елементів проводять під мікроскопом у камері Горяєва, після чого роблять перерахунок числа клітин на 1 мкл і 1 л крові з урахуванням об'єму квадратів і розведення крові.

Перед заповненням, рахункову камеру і покривне скло ретельно протирають і висушують. Великими пальцями покривне скло щільно притискують до бічних пластин камери і злегка пересувають його вгору і вниз до тих пір, поки не з'являться веселкові смуги («ньютоніві кільця»). Лише у цьому випадку витримується належний об'єм камери.

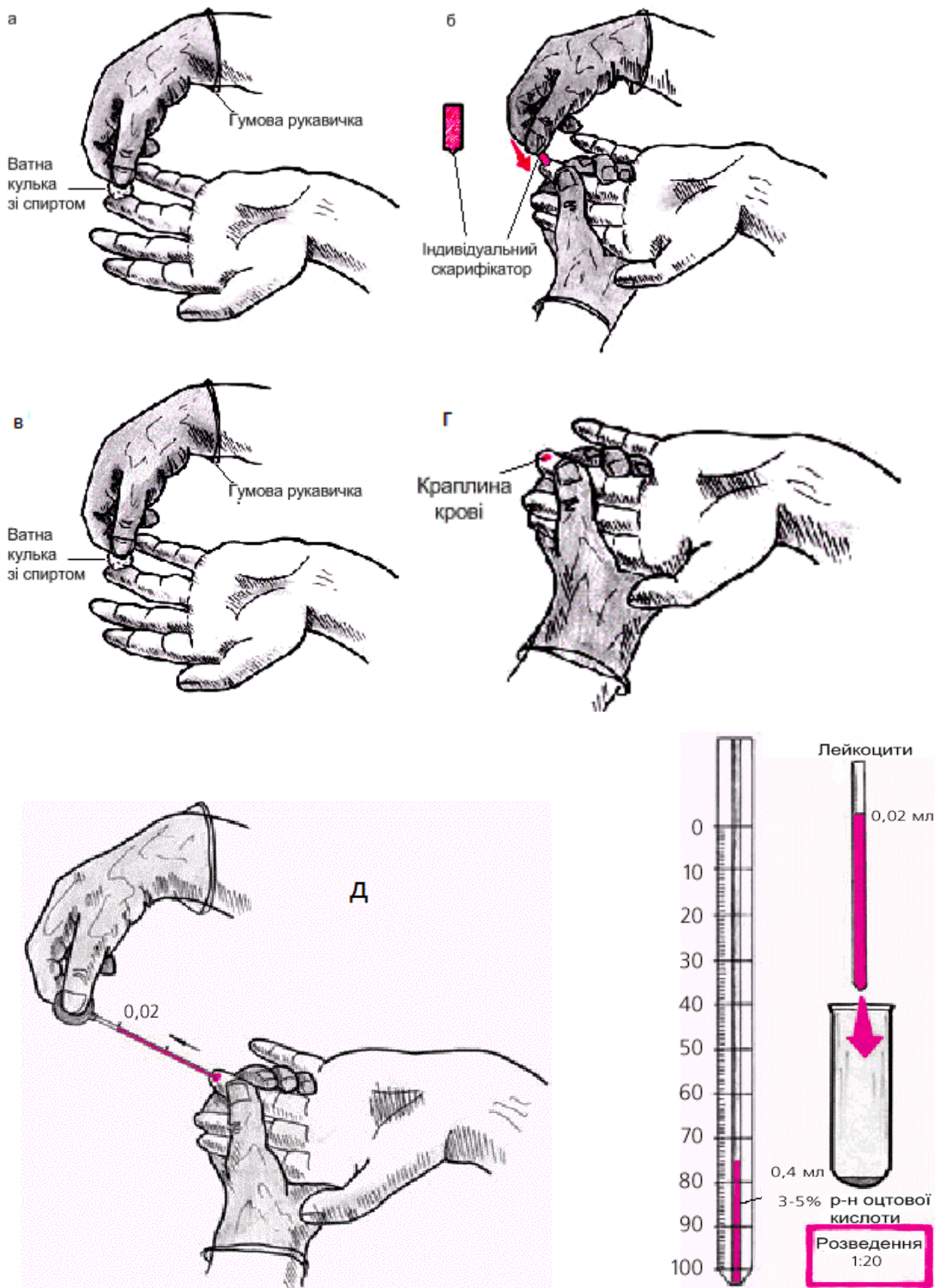


Рис. 4. Техніка забору крові для дослідження (а, б, в, г, д — послідовні етапи)

Підрахунок формених елементів в рахунковій камері.

Краплину крові, розведену в 20 разів розчином оцтової кислоти (див. пункт «Забір крові»), поміщають в підготовлену рахункову камеру Горяєва. Заповнену камеру залишають на 1 хвилину для осідання лейкоцитів, а потім встановлюють на столик мікроскопа (підрахунок лейкоцитів проводять при малому збільшенні мікроскопа (наприклад об'єktiv 8х, окуляр 10х), в дещо затемненому полі зору (при прикритій діафрагмі і опущеному конденсорі) підраховують лейкоцити в 100 великих квадратах сітки Горяєва, не розділених на малі квадрати і смуги. При цьому доцільно дотримуватися певної послідовності підрахунку клітин: пересуватися з одного малого квадрата в інший по горизонталі, наприклад, один ряд справа – наліво, інший ряд – зліва направо і так далі.

Розрахунок загальної кількості лейкоцитів проводять за формулою:

$$X = a \cdot 20 / 100 \cdot b$$

де X – число лейкоцитів в 1 мкл крові;

a – число порахованих лейкоцитів;

b – об'єм одного великого квадрата ($4,0 \cdot 10^{-3}$ мкл);

20 – розведення крові;

100 – число великих квадратів, в яких проводився рахунок.

Ввівши в цю формулу значення об'єму одного великого квадрата, отримаємо:

$$X = a \cdot 20 / 100 \cdot (4 \cdot 10^{-3}) = a \cdot 20 / 400 \cdot 10^{-3} = a \cdot 50 / \text{мкл}.$$

Таким чином, кількість лейкоцитів в 1 мкл дорівнює числу клітин, порахованих в 100 великих квадратах, помноженому на 50:

$$X = a \cdot 50.$$

Приклад: у 100 великих квадратах нараховано 130 лейкоцитів. Тоді кількість лейкоцитів в 1 мкл складе $(130 \cdot 50) = 6500$, або $6,5 \cdot 10^3$ /мкл. Враховуючи, що в 1 л крові міститься 10^6 мкл, число порахованих лейкоцитів можна виразити таким чином: $6,5 \cdot 10^9$ /л.

Інтерпретація результатів

У нормі загальна кількість лейкоцитів (WBC) складає $4,0 \cdot 10^9/\text{л} - 9,6 \cdot 10^9/\text{л}$. Відхилення від даного показника проявляються у вигляді лейкоцитозу чи лейкопенії.

Лейкоцитоз. Підвищення загальної кількості лейкоцитів в крові носить назву лейкоцитозу. Слід пам'ятати про існування декількох основних механізмів лейкоцитозу:

1. Прискорення дозрівання лейкоцитів в органах кровотворення під впливом багаточисельних природних стимуляторів лейкопоезу: фізичних і хімічних чинників запалення, продуктів розпаду тканин, гіпоксемії, імунних комплексів, що утворюються, деяких токсичних речовин (у тому числі молочної кислоти), стимулюванні гіпофізарно-надниркової системи, що контролює процес дозрівання лейкоцитів, та інших. Більшість з цих чинників є природними сигналами до активації захисних функцій лейкоцитів.

2. Проліферація одного з паростків кровотворення у результаті неконтрольованого пухлинного росту в органах кровотворення (лейкоз).

3. Виражена судинна реакція з вивільненням великої кількості лейкоцитів з кров'яних депо.

Лейкоцитоз інколи може зустрічатися у здорових людей, наприклад:

1. Після споживання їжі, особливо багатої білком;
2. Після значної фізичної (м'язової) роботи;
3. На фоні вираженої психоемоційної напруги, стресу;
4. Після перегрівання або переохолодження.

У всіх цих випадках в основі лейкоцитозу лежать виражені судинні реакції (психоемоційна напруга, стрес) або короткочасне посилення метаболізму тканин (м'язова робота, їжа і т. д.), що супроводиться перерозподілом крові і вивільненням лейкоцитів з кров'яних депо.

Для фізіологічного лейкоцитозу у більшості випадків характерне помірне і відносно короткочасне підвищення числа лейкоцитів до $10 \cdot 10^9/\text{л} - 12 \cdot 10^9/\text{л}$, яке через 2–3 години повертається до норми.

Відносно тривале підвищення загального числа лейкоцитів спостерігається у вагітних і пацієнтів, що приймають гормональні препарати (кортикостероїди, АКТГ).

Причинами патологічного лейкоцитозу є:

1. Гострі інфекції (за винятком черевного і висипного тифів, паратифів, грипу, кору і деяких інших вірусних інфекцій).
2. Будь-які гострі і хронічні (у стадії загострення) запальні захворювання, особливо гнійне запалення.
3. Захворювання, що супроводяться розпадом тканин (некрозом) (інфаркт міокарду, інсульт, інфаркт кишечника, нирок, селезінки, обширні опіки і т.д.) і вираженою інтоксикацією (уремія, діабетичний кетоацидоз і ін.).
4. Патологічні стани, для яких характерна виражена гіпоксемія (наприклад значні гострі крововтрати і ін.).
5. Дія токсичних речовин (чадний газ, ртуть, похідні бензолу, свинець та ін.) або деяких фізичних чинників (іонізуюче випромінювання).
6. Злоякісні новоутворення.
7. Гострий і хронічний лейкоз, що супроводиться вираженою проліферацією одного з паростків кровотворення.
8. Поліцитемія.
9. Захворювання, що супроводяться імунними реакціями (колагенози, сироваткова хвороба, гострий гломерулонефрит та ін.).

Важливі особливості лейкоцитозу:

1. Лейкоцитоз у більшості випадків відображає задовільну реактивність системи кістковомозкового кровотворення у відповідь на дію зовнішніх і внутрішніх стимуляторів лейкопоезу, хоча слід враховувати і можливість судинних реакцій, перерозподіл кровотоку, зміни проникності ендотелію, а також проліферацію паростків кровотворення при лейкозі.

2. Найбільш виражений лейкоцитоз зустрічається при:

- 1) хронічному і гострому лейкозі;**
- 2) гнійних захворюваннях внутрішніх органів (абсцес, гангрена і т. п.).**

3. Лейкоцитоз не характерний для черевного тифу, паратифу, деяких стадій висипного тифу, а також для багатьох вірусних інфекцій (грип, кір, паротит, вірусний гепатит і ін.), при яких збільшення кількості лейкоцитів у периферичній крові свідчить про паралельний розвиток бактерійних чи інших ускладнень. Виняток становлять вірусні захворювання дихальних шляхів.

Лейкопенія. Зменшення числа лейкоцитів нижче $4,0 \cdot 10^9/\text{л}$ обумовлене пригніченням лейкопоезу в кровотворних органах. Спостерігається при наступних патологічних станах:

1. Вірусні інфекції (грип, кір, краснуха, вірусний гепатит, СНІД та ін.).
2. Деякі бактерійні (черевний тиф, паратифи, бруцельоз та ін.), рикетсіальні (висипний тиф, рикетсіоз та ін.) і протозойні інфекції (малярія та ін.).
3. Всі види генералізованої інфекції (септицемія, туберкульоз і ін.).
4. Гіпоплазія і аплазія кісткового мозку (наприклад при апластичних і гіпопластичних анеміях, дії на організм іонізуючого опромінення і т. д.).
5. Побічна дія цитостатичних препаратів, антибіотиків, сульфаніламідів, нестероїдних протизапальних препаратів, тиреостатиків і деяких інших медикаментів.
6. Агранулоцитоз, що супроводиться вираженим зменшенням або зникненням з периферичної крові гранулоцитів (нейтрофілів).
7. Деякі аутоімунні захворювання.
8. Гіпотиреоз.
9. Анафілактичний шок.
10. Метастази пухлин в кістковий мозок.

Найбільш виражена, органічна лейкопенія (до $1,0\text{--}1,5 \cdot 10^9/\text{л}$) зустрічається при трьох патологічних станах:

- 1) апластичній анемії;**
- 2) агранулоцитозі;**
- 3) після іонізуючого опромінення.**

У людей похилого віку, виснажених і ослаблених хворих при розвитку інфекційних, запальних і інших захворювань, для яких характерне підвищення

числа лейкоцитів крові, лейкоцитоз може бути відсутнім, що пов'язане із зниженням імунної опірності організму.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2

ТЕМА: ОЦІНКА ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ

Мета: навчитися визначати окремі популяції лейкоцитів на основі забарвленого кров'яного мазка.

Обладнання та реактиви:

1. Предметні скельця.
2. Вузькі шліфовані предметні скельця.
3. Пінцет.
4. Мікроскоп.
5. Індивідуальний стерильний скарифікатор.
6. Фіксатор (хімічно чистий метиловий спирт (метанол) або 96 % етиловий спирт, або денатурований спирт, або суміш Нікіфорова, що складається з рівних кількостей етилового спирту та сірчаного ефіру).
7. Фарба Мая-Грюнвальда і Романовського-Гімзе.
8. Дистильована вода.

ТЕОРЕТИЧНІ ДАНІ

Диференціювання різних типів лейкоцитів і підрахунок лейкоцитарної формули вимагає хорошого знання загальної схеми кровотворення і морфологічних особливостей різних лейкоцитів.

Виділяють два ряди кровотворення: **мієлоїдний та лімфоїдний**. Мієлоїдний ряд кровотворення представлений клітинами гранулоцитарного, моноцитарного і еритроцитарного паростків кровотворення.

Гранулоцити (рис. 5) – це клітини крові, найбільш характерною морфологічною особливістю яких є добре виражена зернистість цитоплазми (нейтрофільна, еозинофільна або базофільна). Ці клітини мають спільного попередника і єдину еволюцію аж до стадії промієлоциту, після чого відбувається поступове диференціювання гранулоцитів на нейтрофіли, еозинофіли і базофіли, що істотно відрізняються один від одного за своєю структурою і функціями.

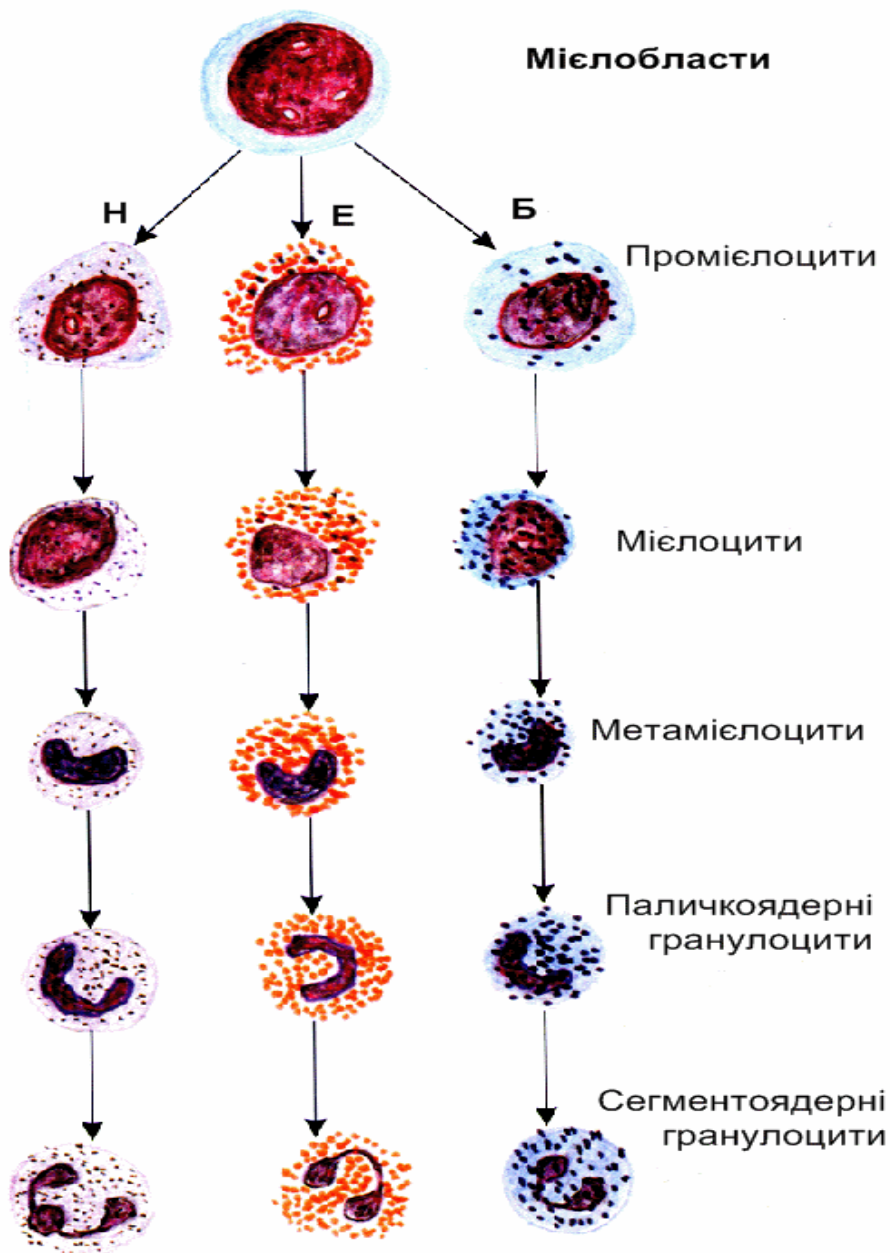


Рис. 5. Морфологія клітин гранулоцитарного паростка кровотворення (Схема). Пояснення у тексті. Н - нейтрофіли, Е - еозинофіли, Б - базофіли

Нейтрофіли мають рясну дрібну пилоподібну зернистість рожево-фіолетового забарвлення.

Зрілі еозинофіли відрізняються великою, що займає всю цитоплазму, зернистістю, яка має яскраво-червоний колір (“кетова ікра”).

Зернистість базофілів велика, неоднорідна, темно-фіолетового або чорного кольору.

Молоді незрілі клітини гранулоцитів (мієлобласт, промієлоцит, нейтрофільний, еозинофільний і базофільний мієлоцити і метамієлоцити) більших

розмірів, мають велике, круглої або злегка увігнутої форми ядро з ніжнішим і дрібнішим малюнком і світлим забарвленням. Їх ядра нерідко містять нуклеоли (ядерця).

Зрілі гранулоцити (паличкоядерні і сегментоядерні) – менших розмірів, їх ядра темнішого кольору, мають вигляд зігнутих паличок або окремих сегментів, сполучених “ниточкою” ядерної речовини. Ядра не містять нуклеол.

Для клітин **моноцитарного** паростка характерний блідо-голубий або сіруватий колір цитоплазми, позбавленої тієї вираженої зернистості, яка властива гранулоцитам (рис. 6). У цитоплазмі можна виявити лише окремі дрібні азурофільні гранули, а також вакуолі. У незрілих клітин моноцитарного ряду (монобласта, промоноцита) ядро велике, займає велику частину клітини. Ядро зрілого моноцита менших розмірів і має вигляд метелика або гриба, хоча нерідко може набувати досить химерних форм.

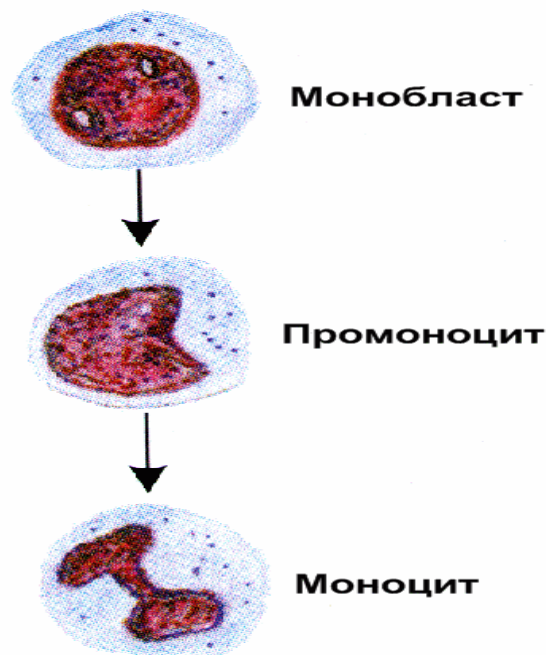
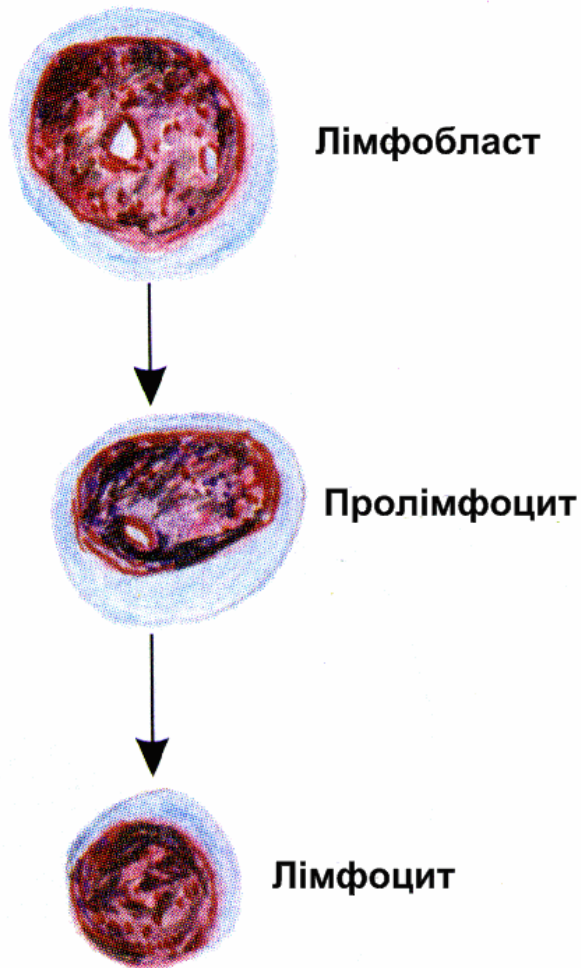


Рис. 6. Морфологія клітин моноцитарного паростка кровотворення (Схема).
Пояснення у тексті.

Для клітин **лімфоїдного** ряду кровотворення (лімфобласта, пролімфоцита та лімфоцита) характерне дуже велике округле, інколи бобовидне ядро щільної

структури, що займає майже всю клітину. Цитоплазма синього або блакитного кольору розташована вузькою смужкою довкола ядра. Вона позбавлена специфічної зернистості, у зв'язку з чим лімфоцити разом з моноцитами отримали назву агранулоцитів (рис. 7).



***Рис. 7. Морфологія клітин лімфоїдного паростка кровотворення (Схема).
Пояснення у тексті***

У нормі в периферичній крові виявляють лише зрілі клітини лейкоцитів:

- 1. Сегменто-ядерні нейтрофіли, еозинофіли і базофіли;**
- 2. Паличкоядерні нейтрофіли (інколи – еозинофіли);**
- 3. Моноцити;**
- 4. Лімфоцити.**

Дегенеративні форми лейкоцитів. Окрім описаних вище клітин, велике діагностичне значення має виявлення в периферичній крові при деяких патологічних станах так званих дегенеративних форм лейкоцитів. Найчастіше зустрічаються наступні їх форми:

1. Нейтрофіли з токсогенною зернистістю і вакуолізацією цитоплазми. Токсична зернистість нейтрофілів виникає в результаті коагуляції білка цитоплазми під впливом інфекційного або токсичного агента. У цих випадках, окрім характерної для нейтрофілів дрібної ніжної зернистості, в цитоплазмі з'являються крупні грубі базофільно забарвлені гранули (рис. 8а) і вакуолі (рис. 8б). Токсична зернистість і вакуолізація цитоплазми нейтрофілів і моноцитів нерідко зустрічаються при важкому перебігу гнійно-запальних і інших захворювань, що супроводжуються вираженою інтоксикацією.

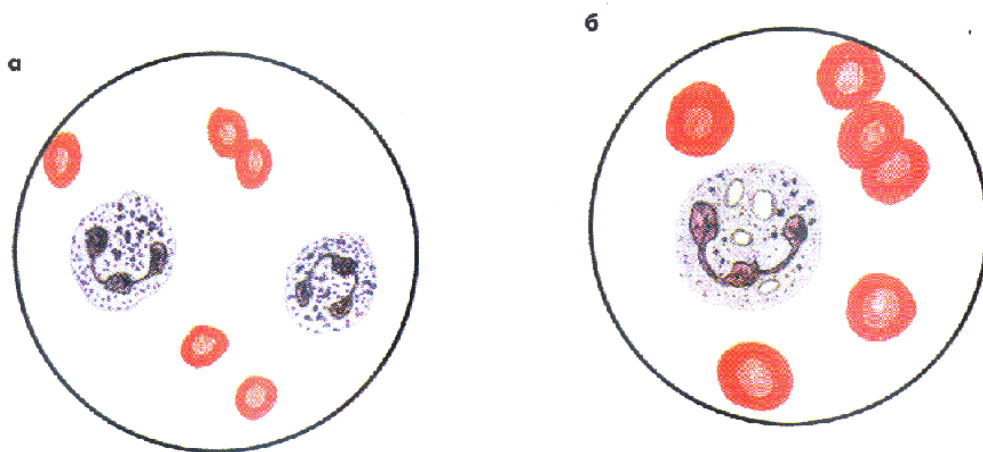


Рис. 8. Дегенеративні форми нейтрофілів: а - токсична зернистість нейтрофілів, б - нейтрофіли з вакуолізацією цитоплазми

2. Гіперсегментовані нейтрофіли, ядро яких складається з 5 і більше сегментів (рис. 9), зустрічаються при В₁₂-фолієводефіцитної анемії, лейкозі, а також при деяких інфекціях і гнійно-запальних захворюваннях, відображаючи так званий ядерний зсув нейтрофілів управо.

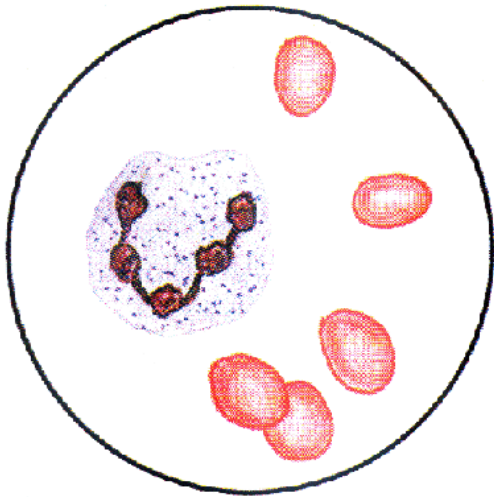


Рис. 9. Гіперсегментований нейтрофіл

3. Дегенеративні зміни лімфоцитів у вигляді пікнотично зміненого ядра, що інколи має дводольну будову, і слабкого розвитку або відсутності цитоплазми.

4. Тіні Боткіна-Гумпрехта – це залишки пошкоджених лімфоцитів у вигляді скупчень світлих хроматинових тяжів. Голі лімфоцитарні ядра, а також тіні Боткіна-Гумпрехта зустрічаються при хронічному лімфолейкозі.

5. Атипові мононуклеари (лімфомоноцити) — це клітини, що поєднують у собі деякі морфологічні ознаки лімфоцитів і моноцитів: вони більші, ніж звичайні лімфоцити, але за розмірами не досягають моноцитів, хоча і містять моноцитарне ядро. За морфологією лімфомоноцити нагадують бластні клітини і часто зустрічаються при інфекційному мононуклеозі.

ХІД РОБОТИ

Лейкоцитарна формула – це відсоткове співвідношення різних видів лейкоцитів в периферичній крові.

Підрахунок лейкоцитарної формули проводять при імерсійній мікроскопії забарвлених мазків. Зазвичай використовується забарвлення по Романовському-Гімзе або комбіноване забарвлення – Мая-Грюнвальда-Романовського по Паппенгейму. Забарвлення по Романовському-Гімзе (суміш фарби азур II, водорозчинного еозину, метиленового спирту і еозину) дозволяє добре

диференціювати ядро і цитоплазму. При комбінованому забарвленні по Паппенгейму послідовно застосовують фарбу Мая-Грюнвальда (розчин еозинметилового синього в метиловому спирті) і Романовського-Гімзе. Цей спосіб вважається найкращим і використовується для забарвлення мазків периферичної крові і кістковомозкових пунктатів.

Виготовлення мазка крові

Мазки крові роблять на предметних скельцях за допомогою більш вузького шліфованого предметного скельця.

Взявши предметне скло за довгі краї, торкаються його поверхнею (відступивши 0,5-1 см від вузького краю) до краплі крові (але не до шкіри). Предметне скло кладуть на стіл або тримають в лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до предметного скла з кров'ю ліворуч від краплі під кутом 45° і просувають його вправо до зіткнення з кров'ю. Чекають, доки кров розпливеться по всьому ребру шліфованого скла, і потім легким швидким рухом ведуть його справа наліво до тих пір, доки не буде вичерпано краплину. Краплина крові повинна бути невеликою і увесь мазок повинен поміститися на склі, не доходячи 1-1,5 см до його краю (рис. 10). Не можна припиняти рух скла та віднімати скло раніше, ніж краплина буде вичерпана. Не можна також сильно натискати на скло, тому що багато клітин можуть виявитися пошкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір, і закінчується «щіточкою».

Густо-рожеві і червонуваті мазки непридатні для підрахунку, бо вони занадто товсті і клітинні елементи при цьому диференціювати неможливо. Після приготування мазки швидко сушать на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висиханні може змінюватися морфологія клітин.

Фіксація мазків.

Обробка мазків фіксуючими рідинами додає форменим елементам стійкість до води, що міститься у фарбах, яка без фіксації мазків гемолізує еритроцити і змінює будову лейкоцитів. Крім того, фіксація, викликаючи коагуляцію білка, прикріплює препарат до скла.

Реактивами для фіксації є хімічно чистий метиловий спирт (метанол) або 96 % етиловий спирт, або денатурований спирт, або суміш Нікіфорова, що складається з рівних кількостей етилового спирту та сірчаного ефіру. Найкращим фіксатором є метиловий спирт.



Рис. 10. Виготовлення мазка крові

Висушені на повітрі мазки крові, складені попарно (мазками назовні), опускають пінцетом в спеціальний посуд для фіксації або у звичайні скляні стакани, наповнені фіксуючою рідиною. В останньому випадку необхідно проконтролювати забезпечення вільного дотику мазка з фіксатором. В метиловому спирті мазки витримують не менше 5 хв, а в етиловому спирті,

денатурованому і суміші Нікіфорова – не менше 30 хв. Після закінчення терміну фіксації препарати виймають пінцетом, сушать на повітрі або обполіскують в банці з дистильованою водою і виладають мазками догори на скляний місток для фарбування.

Забарвлення за Романовським-Гімзе

В основі методу – забарвлення різних елементів клітин у різні кольори і відтінки сумішшю основних (азур II) і кислих (водорозчинний жовтий еозин) барвників.

У продажу є готовий розчин барвника Романовського, а також суха фарба Романівського (Гімзе), з якого готують розчин наступним чином: 3,8 г сухої фарби Романовського розчиняють в 250 мл чистого метилового або етилового спирту. Розчин залишають на 3-5 діб, часто струшуючи для кращого розчинення фарби. Потім додають 250 мл чистого гліцерину і знову залишають на 3–5 діб, періодично перемішуючи. Приготований таким чином барвник добре зберігається тривалий час в темних банках в шафі, де немає кислот чи лугів.

Заново отриманий або приготований розчин барвника Романовського перед вживанням відтитровують, тобто, фарбують кілька фіксованих мазків крові протягом 25–40 хв різним розведенням фарби (1–2 краплі фарби на 1 мл дистильованої води). За добре забарвленим препаратом встановлюють потрібну кількість краплин барвника на 1 мл води і час фарбування.

Фіксовані мазки укладають на місток, що складається з двох скляних паличок, покладених на два протилежних краї кювети. Потім мазки заливають розведеним барвником, який наливають на мазок по можливості більш високим шаром. Фарбування триває в залежності від температури повітря в приміщенні від 25 до 45 хв. Якщо температура в приміщенні низька або потрібно швидше забарвити мазки, то розведений барвник можна підігріти до 60-70° (до кипіння доводити не можна).

Після закінчення часу фарбування надлишок барвника змивають (але не зливають) сильним струменем води і ставлять мазки вертикально в дерев'яний

штатив для просушування. Розведеною фарбою можна користуватися тільки протягом одного дня.

Забарвлення за Романовським у модифікації Філіпсона.

Особливістю є застосування барвників-фіксаторів, якими мазки крові в перший період одночасно фіксуються і частково забарвлюються, а в другий період, після розбавлення барвників-фіксаторів дистильованою водою, дофарбовуються остаточно.

Перед роботою одну частину готового барвника Романовського і 3 частини етилового спирту (ректифікату) ретельно змішують. Барвник відразу ж придатний до вживання, але можна готувати його і заздалегідь.

Приготований барвник наливають на нефіксованої мазок, покриваючи його повністю і через 1 – 1 хв 30 сек, не зливаючи барвника, додають до нього по краплях приблизно стільки ж дистильованої води, стежачи за тим, щоб вода при з'єднанні з барвником не зливалася з мазка. Через 20–30 хв барвник змивають водою і мазок висушують.

Мікроскопія мазків

Мікроскопію мазків проводять за наступною методикою (мал. 11а). Мазок пересувають від верхнього краю до нижнього, потім відсовують на 2–3 поля зору уздовж довгого краю і йдуть у зворотньому напрямку до верхнього краю і так далі. Можна використовувати й інші способи, зображені на рис. 11б,в. Проте, у всіх випадках ідентифікують і підраховують не менше 100 лейкоцитів. Якщо при цьому виявляються які-небудь відхилення від норми (поява дегенеративних форм клітин, що не виявляються у здорової людини, зміна нормального співвідношення різних типів лейкоцитів), обов'язково переглядають ще 100 лейкоцитів по описаній методиці. Отримані результати реєструють за допомогою клавійного лічильника або іншим способом.

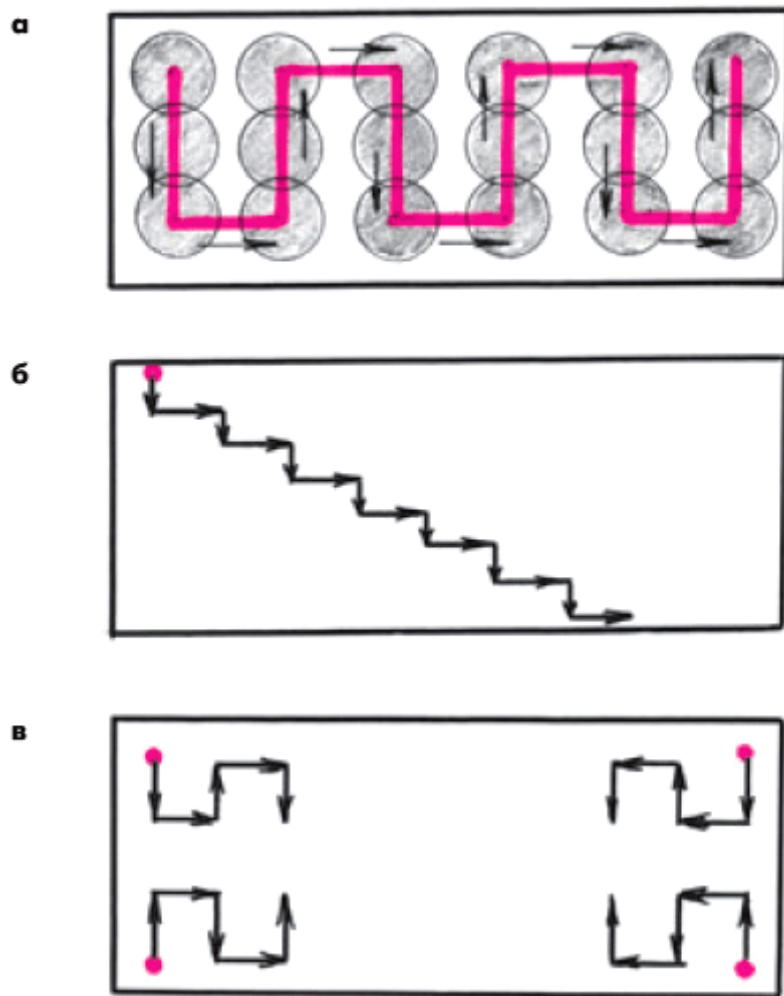


Рис. 11. Способи мікроскопії (а, б, в) мазків крові

Інтерпретація результатів

У таблиці 1 наведено абсолютну кількість і відсоткове співвідношення різних лейкоцитів у периферичній крові здорової людини (лейкоцитарна формула). Відсотки розраховуються як число знайдених клітин кожної попіляції на 100 знайдених при мікроскопії лейкоцитів. Для визначення загальної (абсолютної) кількості клітин їх відсоток перемножують на загальне число лейкоцитів і ділять на 100.

Показники лейкоцитарної формули (норма)

Показники	Абсолютні та відносні показники норми
Лейк., $\times 10^9/\text{л}$	4,0-9,6
Лімфоцити, %	20-40
Лімфоцити, $\times 10^9/\text{л}$	1,5-4,0
Нейтрофіли, %	54-62
Нейтрофіли, $\times 10^9/\text{л}$	2,0-7,0
Моноцити, %	4-10
Моноцити, $\times 10^9/\text{л}$	0,2-0,8
Еозинофіли, %	1-3
Еозинофіли, $\times 10^9/\text{л}$	0-0,45
Базофіли, %	0-1
Базофіли, $\times 10^9/\text{л}$	0-0,02

При різних патологічних станах може відбуватися:

1. Зміна лейкоцитарної формули (збільшення або зменшення кількості одного з видів лейкоцитів);
2. Поява різних дегенеративних змін у ядрі і цитоплазмі зрілих клітин лейкоцитів (нейтрофілів, лімфоцитів і моноцитів);
3. Поява у периферичній крові молодих незрілих лейкоцитів.

Для правильної інтерпретації змін лейкоцитарної формули в патології необхідно оцінити не лише відсоткові співвідношення різних видів лейкоцитів, але і їх абсолютний вміст в 1 л крові. Це пов'язано з тим, що зміна відсоткового вмісту окремих видів лейкоцитів не завжди відповідає їх дійсному збільшенню або зменшенню. Наприклад, при лейкопенії, зумовленій зменшенням кількості нейтрофілів, у крові може виявлятися відносне збільшення відсотку лімфоцитів і моноцитів, тоді як їх абсолютна кількість буде у нормі.

Якщо поряд з відсотковим збільшенням або зменшенням окремих видів лейкоцитів спостерігається відповідна зміна їх абсолютного вмісту в 1 л крові, говорять про їх абсолютну зміну. Збільшення або зменшення відсотку клітин при їх нормальному абсолютному вмісті у крові відповідає поняттю відносної зміни.

Далі характеризується діагностичне значення деяких змін лейкоцитарної формули, що часто зустрічаються.

Нейтрофіліоз – збільшення кількості нейтрофілів більше $6,0 \times 10^9/\text{л}$ – є відображенням своєрідного захисту організму у відповідь на дію багаточисельних екзогенних і ендогенних чинників. Основними причинами нейтрофіліозу, що в більшості випадків поєднується з лейкоцитозом, є:

1. Гострі інфекції (бактерійні, паразитарні, грибкові, рикетсіози та ін.).
2. Гострі запальні і гнійні процеси (сепсис, пневмонія, плеврит, артрит, міозит, перитоніт, апендицит, холецистит, панкреатит та багато інших).
3. Захворювання, що супроводяться некрозом, розпадом і пошкодженням тканин (інфаркт міокарду, інсульт, обширні опіки, трофічні виразки, гангрена, панкреонекроз та ін.).
4. Інтоксикації (уремія, діабетичний кетоацидоз, печінкова кома).
5. Дія медикаментів (кортикостероїди, гістамін, гепарин, отруєння свинцем, бензолом і т. п.).
6. Гостра кровотеча.
7. Гемолітичний криз.
8. Злоякісні новоутворення (особливо часто – пухлини шлунку, бронхів, підшлункової залози, нервової системи, лімфоми і ін.).
9. Хвороби крові (гострий і хронічний мієлолейкоз).

Слід пам'ятати також про можливість появи фізіологічного нейтрофіліозу (після їжі, значної м'язової роботи, психоемоційної напруги, під час вагітності).

При оцінці діагностичної і прогностичної значущості нейтрофільного зрушення важливо визначити відсоткове співвідношення незрілих і зрілих форм нейтрофілів. Для цього розраховують ядерний індекс зрушення нейтрофілів —

відношення вмісту мієлоцитів, метамієлоцитів і паличкоядерних нейтрофілів до сегменто-ядерних.

$$\text{Ядерний індекс зсуву} = \frac{\text{мієлоцити} + \text{метамієлоцити} + \text{паличкоядерні}}{\text{сегменто-ядерні}}$$

У нормі ядерний індекс зсуву дорівнює 0,05–0,1.

Можливі наступні зміни ядерного індексу

1. Зсув формули крові вліво – це підвищення у периферичній крові числа паличкоядерних нейтрофілів і (рідше) поява у невеликій кількості незрілих гранулоцитів (метамієлоцитів, мієлоцитів і навіть одиничних мієлобластів), що свідчить про значне подразнення кісткового мозку і прискорення лейкопоезу. Ядерний індекс зсуву нейтрофілів при цьому перевищує 0,1.

2. Зсув формули крові управо – це збільшення в периферичній крові числа зрілих сегменто-ядерних нейтрофілів, поява гіперсегментованих і зменшення або зникнення паличкоядерних нейтрофілів. Ядерний індекс зсуву при цьому менший від 0,05.

У більшості випадків гострих інфекцій, гнійно-запальних та інших захворювань, що супроводяться нейтрофіліозом, зсув формули крові вліво обмежується лише підвищенням числа паличкоядерних нейтрофілів (гіпорегенеративний ядерний зсув), що у поєднанні з помірним лейкоцитозом, як правило, свідчить про відносно легкі інфекції або обмежений гнійно-запальний процес і хорошу опірність організму.

При важкому перебігу захворювання і збереженій опірності організму спостерігається зсув формули крові до метамієлоцитів, мієлоцитів і (рідше) до мієлобластів (гіперрегенеративний ядерний зсув вліво), що у поєднанні з високим лейкоцитозом і нейтрофіліозом позначається як лейкемоїдна реакція мієлоїдного типу (див. нижче), оскільки нагадує картину крові при мієлолейкозі. Ці зміни

зазвичай супроводяться гіпо- і анеозинофілією, відносною лімфоцитопенією і моноцитопенією (див. нижче).

Нейтрофільоз з дегенеративним ядерним зсувом вліво, який виявляється збільшенням незрілих форм нейтрофілів і появою в периферичній крові дегенеративно змінених сегменто-ядерних нейтрофілів (токсогенна зернистість, пікноз ядер, вакуолізація цитоплазми) також спостерігається при важкому перебігу гнійно-запальних захворювань і ендогенних інтоксикаціях і вказує на пригнічення функціональної активності кісткового мозку.

Нейтрофільоз з вираженим зсувом формули крові вліво у поєднанні з невеликим лейкоцитозом або лейкопенією, як правило, свідчить про важкий перебіг патологічного процесу і погану опірність організму. Нерідко така картина крові спостерігається в осіб літнього чи старечого віку та у ослаблених і виснажених хворих.

Нейтрофільоз з ядерним зсувом управо (збільшення сегментоядерних і гіперсегментованих нейтрофілів, зменшення або зникнення паличкоядерних нейтрофілів), як правило, говорить про хорошу, адекватну захисну реакцію кісткомозкового кровотворення на інфекцію або запальний процес і про сприятливий перебіг захворювання.

Тяжкий перебіг багатьох інфекційних, генералізованих гнійно-запальних, дегенеративних та інших захворювань при збереженій опірності організму часто супроводиться вираженим нейтрофільозом, лейкоцитозом і гіперрегенеративним зсувом формули крові вліво.

Поява у периферичній крові дегенеративних форм нейтрофілів (токсогенної зернистості, пікнозу ядер та інших змін), а також виражений нейтрофільоз і ядерний зсув уліво в поєднанні з невеликим лейкоцитозом або лейкопенією в більшості випадків вказують на пригнічення функціональної активності кісткового мозку, зниження опірності організму і є вельми несприятливими ознаками.

Нейтропенія – зниження числа нейтрофілів нижче $1,5 \times 10^9/\text{л}$ – свідчить про функціональне або органічне пригнічення кісткомозкового кровотворення або про інтенсивне руйнування нейтрофілів під впливом антитіл до лейкоцитів,

циркулюючих імунних комплексів або токсичних факторів (аутоімунні захворювання, пухлини, дія деяких медикаментів, та ін.). Слід також мати на увазі можливість тимчасового перерозподілу нейтрофілів усередині судинного русла, що може спостерігатися, наприклад, при шоці. Нейтропенія, зазвичай, поєднується із зменшенням загального числа лейкоцитів – лейкопенією.

Найбільш частими причинами нейтропенії є:

1. Інфекції: вірусні (грип, кір, краснуха, вітряна віспа, інфекційний гепатит, СНІД), бактерійні (черевний тиф, паратиф, бруцельоз), рикетсіоз (висипний тиф), протозойні (малярія, токсоплазмоз).
3. Побічна дія деяких медикаментів (цитостатичні засоби, сульфаніламід, анальгетики, протисудомні, антитиреоїдні препарати і ін.).
4. Іонізуюче опромінення, променева терапія.
5. Анемія.
7. Агранулоцитоз.
8. Анафілактичний шок.

Нейтропенія, особливо та, що поєднується з нейтрофільним зсувом вліво, і яка розвивається на фоні гнійно-запальних процесів, для яких типовий нейтрофіліоз, свідчить про значне зниження опірності організму і несприятливий прогноз захворювання. Така реакція кістковомозкового кровотворення найбільш характерна для виснажених, ослаблених хворих і осіб літнього і старечого віку.

Еозинофілія – збільшення кількості еозинофілів у периферичній крові більше $0,4 \times 10^9/\text{л}$ – найчастіше є наслідком патологічних процесів, в основі яких лежить утворення комплексів антиген – антитіло або захворювань, що супроводяться аутоімунними процесами або кістковомозковою проліферацією еозинофільного паростка кровотворення:

1. Алергічні захворювання (бронхіальна астма, кропив'янка, сінна лихоманка, сироваткова хвороба).
2. Паразитарні інвазії (ехінококоз, аскаридоз, лямбліоз, малярія та ін.).
3. Хвороби сполучної тканини і системні васкуліти (ревматоїдний артрит, склеродермія, системна червона вовчанка та ін.).

4. Неспецифічний виразковий коліт.
5. Захворювання шкіри (дерматит, екзема, шкірний лишай та ін.).
6. Хвороби крові (лімфогранульоматоз, еритема, хронічний мієлолейкоз).
7. Еозинофільний інфільтрат легень.

Еозинопенія, тобто зниження кількості еозинофілів, що виявляється у хворих з гнійно-запальними захворюваннями, у поєднанні з нейтропенією, лейкопенією і зсувом формули крові вліво, як правило, відображає зниження опірності організму і є вельми несприятливою прогностичною ознакою.

Базофілія – збільшення числа базофілів у крові – у клінічній практиці зустрічається досить рідко. Серед захворювань, що найчастіше супроводжуються базофілією, можна виділити наступні:

1. Мієлопроліферативні захворювання (зокрема, хронічний мієлолейкоз).
2. Гіпотиреоз (мікседема).
3. Лімфогранульоматоз.
4. Хронічні гемолітичні анемії.

Відсутність базофілів у периферичній крові (**базопенія**) діагностичного значення не має. Вона виявляється інколи при гіпертиреозі, гострих інфекціях, після прийому кортикостероїдів.

Лімфоцитоз – збільшення кількості лімфоцитів в периферичній крові.

У клінічній практиці частіше зустрічається відносний лімфоцитоз, тобто збільшення відсотка лімфоцитів при нормальній (або навіть дещо зниженій) абсолютній їх кількості. Відносний лімфоцитоз виявляється при всіх захворюваннях, що супроводяться абсолютною нейтропенією і лейкопенією, у тому числі при вірусних інфекціях (грип), гнійно-запальних захворюваннях, що перебігають на фоні зниження опірності організму і нейтропенії, а також при черевному тифі, бруцельозі, лейшманіозі, агранулоцитозі та ін.

Абсолютне збільшення числа лімфоцитів в крові більше $3,5 \times 10^9/\text{л}$ (абсолютний лімфоцитоз) характерний для ряду захворювань:

1. Гострі інфекції (у тому числі так звані дитячі інфекції: кашлюк, кір, краснуха, вітряна віспа, скарлатина, інфекційний мононуклеоз, свинка, гострий

інфекційний лімфоцитоз, гострий вірусний гепатит, цитомегаловірусна інфекція та ін.).

2. Туберкульоз.
3. Гіпертиреоз.
4. Гострий та хронічний лімфолейкоз.
5. Лімфосаркома.

Лімфоцитоз при гнійно-запальних захворюваннях не можна розглядати як надійну лабораторну ознаку компенсаторної реакції імунної системи і настання одужання.

Лімфоцитопенія – зменшення кількості лімфоцитів в периферичній крові.

Відносна лімфоцитопенія спостерігається при таких захворюваннях і на такій стадії розвитку патологічного процесу, для яких характерне абсолютне збільшення числа нейтрофілів (нейтрофіліоз). Тому у більшості випадків така відносна лімфоцитопенія самотійного діагностичного і прогностичного значення не має.

Абсолютна лімфоцитопенія із зниженням числа лімфоцитів нижче $1,2 \times 10^9/\text{л}$ може вказувати на дефіцит Т-системи імунітету (імунодефіцит) і вимагає ретельнішого імунологічного дослідження крові, у тому числі оцінки показників гуморального, клітинного імунітету і фагоцитарної активності лейкоцитів.

Крім того, абсолютна лімфоцитопенія досить характерна для таких захворювань:

1. Туберкульоз.
2. Лімфоми (лімфогранульоматоз і ін.), лімфосаркома.
3. Гостра і хронічна променева хвороба.
4. Мієломна хвороба.

Моноцитоз також буває відносним і абсолютним.

Відносний моноцитоз нерідко зустрічається при захворюваннях, що перебігають з абсолютною нейтропенією і лейкопенією, і його самотійне діагностичне значення у цих випадках невелике.

Абсолютний моноцитоз, що виявляється при деяких інфекціях і гнійно-запальних процесах, слід оцінювати, враховуючи, перш за все, що основними функціями моноцитарно-макрофагального ряду є:

1. Захист від деяких класів мікроорганізмів.
2. Взаємодія з антигенами і лімфоцитами на окремих стадіях імунної реакції.
3. Усунення уражених або старих клітин.

Абсолютний моноцитоз зустрічається при таких захворюваннях:

1. Деякі інфекції (інфекційний мононуклеоз, вірусні, грибкові, протозойні інфекції).
2. Гнійно-запальні захворювання з тривалим перебігом.
3. Гранульоматозні захворювання (активний туберкульоз, бруцельоз, неспецифічний виразковий коліт і ін.).
4. Хвороби крові: гострий моноцитарний лейкоз, хронічний мієлолейкоз, мієломна хвороба, лімфогранульоматоз, інші лімфоми.

У перших трьох випадках (інфекції, гнійно-запальні захворювання, гранульоматози) абсолютний моноцитоз може свідчити про розвиток виражених імунних процесів в організмі.

Моноцитопенія — зниження або навіть повна відсутність моноцитів у периферичній крові — нерідко розвивається при важкому перебігу інфекційних і гнійно-запальних захворювань (сепсис, гіпертоксичні форми інфекційних процесів і ін.).

Лейкемоїдні реакції — це патологічні реакції кровотворної системи, які супроводжуються появою в периферичній крові молодих незрілих лейкоцитів, що свідчить про значне подразнення кісткового мозку і прискорення лейкопоезу. У цих випадках картина крові зовні нагадує зміни, що виявляються при лейкозі. Лейкемоїдні реакції частіше поєднуються з вираженим лейкоцитозом, хоча у окремих випадках можуть розвиватися і на фоні нормальної кількості лейкоцитів або навіть лейкопенії.

Розрізняють лейкемоїдні реакції: 1) мієлоїдного типу, 2) лімфатичного, або моноцитарно-лімфатичного типу, 3) еозинофільного типу.

Лейкемоїдні реакції мієлоїдного типу супроводжуються зсувом формули крові до метамієлоцитів, мієлоцитів і (рідко) мієлобластів і спостерігаються при важкому перебігу інфекційних, гнійно-запальних, септичних, дегенеративних і інших захворювань та інтоксикацій, для яких характерними є гіперрегенеративний ядерний зсув нейтрофілів вліво (див. вище). Особливо тяжкою і прогностично несприятливою ознакою при цих захворюваннях є поєднання лейкемоїдної реакції з нормальною або зниженою кількістю лейкоцитів і нейтрофілів (лейкопенією і нейтропенією).

Слід також пам'ятати про можливість появи лейкемоїдної реакції мієлоїдного типу при метастазах злоякісних пухлин в кістковий мозок.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3

ТЕМА: ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ.

Мета: навчитися визначати окремі субпопуляції лімфоцитів шляхом аналізу експресії специфічних поверхневих антигенів.

Обладнання та реактиви:

1. Центрифуга.
2. Холодильник побутовий.
3. Мікроскоп „Біолам”.
4. Люмінесцентна насадка до мікроскопу ЛН-130 МС.
5. Піпетки з гумовою грушею на 1, 2 та 5 мл.
6. Мікропіпетки зі змінними об'ємами.
7. Торсійні терези.
8. Мірні центрифужні пробірки на 10 мл.
9. Предметні та покривні скельця.
10. Реактиви: F(ab)₂-фрагменти овечих антитіл до Ig миші, мічені FITC (робоче розведення 1:100).
11. Моноклональні антитіла LT1, LT3, LT4, LT8, LNK16, 3F3.
12. Фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, pH=7,4), KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, NaCl.
13. Цитрат натрію.
14. Фікол-400.
15. Верографін (76%).
16. Етиловий спирт.
17. Імерсійне масло (кедрова олія).
18. Формалін (40%).

ТЕОРЕТИЧНІ ДАНІ

Найбільш важливі кластери диференціювання.

Експресія певних рецепторів та корецепторів на мембранах лімфоцитів визначає їх функціональне призначення.

Основними кластерами диференціювання функціонально зрілих Т-лімфоцитів є **CD3** (визначається моноклональним антитілом LT3), **CD5**

(визначається моноклональним антитілом LT1), **CD4** (визначається моноклональним антитілом LT4) та **CD8** (визначається моноклональним антитілом LT8); NK-клітин – **CD16** (визначається моноклональним антитілом LNK16); В-лімфоцитів – **CD72** (визначається моноклональним антитілом 3F3).

Т-лімфоцити проходять дозрівання у тимусі, розпізнають антиген, проводять цитотоксичне знищення інфікованих клітин та регулюють імунну відповідь.

Функціонально зрілі Т-лімфоцити з фенотипом **CD3+** мають білкові рецептори, утворені поєднанням гетеродимеру α/β (TCR, ТАГРР – Т-клітинний антигенрозпізнаючий рецептор) з диференціювальною молекулою CD3, утвореною ланцюгами $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ та η .

Функціональна роль молекули CD3 полягає в тому, що вона бере участь у передачі сигналу від ТАГРР всередину клітини, стимулюючи процес її активації та проліферації.

Комплекс TCR-CD3 є найбільш специфічним маркером зрілих Т-лімфоцитів. Проте, існують менш специфічні адгезивні молекули, властиві Т-лімфоцитам, зокрема, CD5, що розпізнає маркер В-лімфоцитів CD72. Маркери **CD3** та **CD5** відносяться до **пан-Т-клітинних** (присутні на всіх Т-лімфоцитах), але у процесі диференціювання клітин маркер CD5 з'являється раніше, ніж маркер CD3.

Корецепторами для Т-лімфоцитів є трансмембранні білкові молекули CD4 та CD8, розташовані поряд з Т-клітинним рецептором. Вони належать до молекул адгезії, беруть участь в розпізнаванні аутологічних молекул головного комплексу гістосумісності і є маркерами основних субпопуляцій.

Хелперні Т-лімфоцити (Тх) з фенотипом **CD4+** є головними регуляторними клітинами, що продукують різні типи цитокінів і, в залежності від цього, поділяються на Т-хелпери 1 (Тх1) та Т-хелпери 2 (Тх2). Тх1 стимулюють клітинну цитотоксичну відповідь, Тх2 – гуморальну відповідь.

Цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ) з фенотипом **CD8+** викликають загибель інфікованих клітин та діють безпосередньо на інфекційні агенти. Серед ЦТЛ, як і серед хелперних Т-лімфоцитів, існують субпопуляції, що відрізняються

за спектром лімфокінів, необхідних для їх розвитку і діяльності. Частина з них може виконувати регуляторні функції. Зокрема, їм властиві імуносупресорні функції, тобто, здатність обмежувати імунну відповідь, запобігати аутоагресії, визначати шляхи розвитку імунних процесів у бік гуморальної чи клітинної відповіді. Раніше вважали, що Т-супресорами є виключно Т-лімфоцити з фенотипом CD8+. Зараз відомо, що супресорні функції можуть також виконувати обидві субпопуляції Т-хелперів CD4+, що секретують різні цитокіни. В будь-якому випадку, при розвитку дисбалансу між кількістю та активністю CD4+ та CD8+-клітин, механізми імунної відповіді будуть порушені. Тому ці субпопуляції Т-лімфоцитів відносяться до імунорегуляторних клітин, співвідношення яких визначає силу імунної відповіді і називається **імунорегуляторним індексом (CD4+/CD8+)**. Є дані, що це співвідношення генетично детерміноване.

На даний час рівень імунорегуляторного індексу оцінюють, узгоджуючи з фазою імунної відповіді. У період розпалу і стихання клінічних проявів імунорегуляторний індекс сягає високих значень за рахунок великого відсоткового вмісту Т-хелперів (CD4+ Т-клітин). У період реконвалесценції значення показника зменшується у зв'язку зі зростанням рівня CD8+ Т-клітин (кілерів). Порушення такої закономірності свідчить про неадекватність імунної реакції та про можливість хронізації інфекції через неповну ерадикацію збудника.

На даний час імунологічні лабораторії використовують дві принципово різні методики визначення вмісту різних субпопуляцій Т-лімфоцитів. Перша з них заснована на взаємодії специфічних моноклональних антитіл з відповідними CD-маркерами лімфоцитів, друга – на взаємодії лімфоцитів з еритроцитами вівці, внаслідок чого утворюються характерні структури, що отримали назву «розеток». Вважали, що із запровадженням діагностиків із моноклональних антитіл розеткоутворююча методика відійде в минуле. Однак згодом з'ясувалося, що обидві методики є не конкуруючими, а взаємодоповнюючими.

Визначення рівня субпопуляцій лімфоцитів методом моноклональних антитіл (за CD-маркерами) надає лише кількісну інформацію, однак важливою є не тільки наявність тих чи інших клітин, але і якість виконання ними своїх функцій. При цьому в розеткоутворюючі реакції залучаються переважно

активовані Т-лімфоцити, тобто дана методика надає певну інформацію і про функціональний бік імунокомпетентних клітин. Зазначена особливість може пояснювати розходження у показниках субпопуляцій лімфоцитів, визначених за методикою моноклональних антитіл до CD і шляхом розеткоутворення.

Нормальні (природні) кілери (НК, NK) з фенотипом **CD16+** морфологічно є типовими лімфоцитами, мають цитолітичний апарат, продукують цитокіни, але не експресують генів антиген-специфічних рецепторів, тобто, не впізнають антигени подібно до Т-лімфоцитів. НК реалізують свої ефektorні функції при першому контакті з мішенню і не потребують стадії проліферації. Є великими гранулярними лімфоцитами, гранули яких містять білок перфорин, що сприяє утворенню пор у мембрані клітин-мішеней, серинові естерази, що зумовлюють індукцію апоптозу в клітині-мішені та хондроїтинсульфат А, що захищає НК-клітини від аутолізу. Молекула CD16 є низькоафінним рецептором, здатним зв'язувати агреговані IgG1 та IgG3. Тобто, вона маркує субфракцію клітин, що здійснюють лізис клітин, опсонізованих антитілами. Іншими маркерами природних кілерів є антигени **CD56** та **CD57**, що беруть участь у процесах розпізнавання та цитолізу.

В-лімфоцити дозрівають у кістковому мозку і виконують функцію продукування антитіл чи специфічного представлення антигену Т-лімфоцитам. В-лімфоцити є клітинним субстратом гуморальної імунної відповіді. Рецептори В-лімфоцитів (BCR) є мембранними формами імуноглобуліну.

Ко-рецептори В-лімфоцитів – молекули **CD21** та **ТАРА-1**. Для визначення В-лімфоцитів в експериментальній роботі використовуються рецептори, властиві всім функціонально зрілим В-клітинам, але не іншим типам клітин. До таких маркерних молекул відноситься, зокрема, **CD72**, що є рецептором для IgM та лігандом для маркерної молекули Т-клітин CD5. Ці мембранні молекули забезпечують ефективний контакт з Т-хелперами. Іншими маркерними молекулами В-клітин є **CD19**, **CD20**.

ХІД РОБОТИ:

Кров забирається стерильно з ліктьової вени вранці, до вживання їжі. 6 мл крові з антикоагулянтом (цитрат натрію, 9,8%, 0,5 мл), розбавляється фосфатним

буфером у співвідношенні 1:1. Склад фосфатного буферу: KH_2PO_4 (1,15 г), Na_2HPO_4 (0,2 г), KCl (0,2 г), NaCl (8 г) на 1 л дистильованої води.

Лімфоцити виділяються з цитратної крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті фікол-верографін (густина 1,077 г/мл). На свіжоприготований одноступеневий фікол-верографіновий градієнт (2 мл) у центрифужній пробірці нашаровується за допомогою піпетки з грушею кров, розбавлена ФСБ (фосфатним буфером). Методика виготовлення градієнту: 147 мг фіколу-400 розчиняється у теплій дистильованій воді. Змішується з 0,3 мл 76% розчину верографіну. Об'єм доводиться до 2 мл. Температура зберігання розчину $+8^\circ\text{C}$.

Пробірки з нашарованою на градієнт кров'ю центрифугуються протягом 20 – 25 хв. при 1500 об/хв. Піпеткою з грушею відбирається середній опалесцюючий шар, що містить лімфоцити, в окремі пробірки. Проводиться відмивка відібраних клітин від залишків градієнту фосфатним буфером за допомогою центрифугування протягом 10 хв. Відмивка повторюється два рази.

Концентрація моноклеарних клітин за допомогою розведення ФСБ доводиться до рівня $1 - 5 \times 10^9$ кл./мл. Контроль концентрації проводиться в камері Горяєва (в одному великому квадраті повинно міститись 20 лімфоїдних клітин).

1 – 0,1 млн. лімфоцитів в об'ємі 50 мкл вноситься в центрифужні пробірки, до клітин додається 5 мкл відповідних моноклональних антитіл і суміш інкубується 30–40 хв. при $+4^\circ\text{C}$. Потім клітини двічі відмиваються центрифугуванням протягом 5 хв. при 1500 об/хв з 150 мкл ФСБ.

Вилучається супернатант і до осаду відмитих клітин додається 50 мкл F(ab)_2 -фрагментів антитіл до Ig миші, помічених FITC і розведених 1:100. Для розведення використовується ФСБ. Клітини суспензуються і інкубуються 30 хв. при $+4^\circ\text{C}$.

Після 2-разової відмивки і остаточного видалення супернатанту клітини вносяться на предметні скельця і поміщаються в пари формаліну для фіксації на 10 – 15 хв.

Зафіксовані препарати підсушуються при кімнатній температурі. Готові препарати зберігаються у холодильній камері.

Забарвлення клітин аналізується за допомогою мікроскопу з люмінесцентною насадкою ЛН-130МС (окуляр $\times 7$, об'єктив $\times 90$). Підрахунок проводиться шляхом перерахунку під імерсією флуоресцюючих клітин на 100 клітин, проглянутих у препараті.

Інтерпретація результатів

У таблиці 2 наведено абсолютну кількість і відсоткове співвідношення різних лімфоцитів у периферичній крові здорової людини.

Таблиця 2

Показники норми основних субпопуляцій Т-лімфоцитів периферичної крові

Показники	Норма
CD3+, %	53-80
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	0,58-3,25
CD5+, %	64-74
CD5+, $\times 10^9/\text{л}$	0,70-3,00
CD4+, %	31-49
CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	0,32-2,00
CD8+, %	19-37
CD8+, $\times 10^9/\text{л}$	0,21-1,50
CD4+/CD8+	1,2-2,5
CD16+, %	5-25
CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	0,05-1,00
CD72+, %	5-12
CD72+, $\times 10^9/\text{л}$	0,05-0,49

ОСНОВНІ ПРАВИЛА ІНТЕРПРЕТАЦІЇ ІМУНОГРАМИ

Всі основні принципи аналізу імунограми були сформульовані на основі великого практичного досвіду використання аналізу крові в широкій клінічній практиці у вигляді таких правил:

1. Повноцінний клінічний аналіз імунограми може бути проведений лише в комплексі з оцінкою клінічної картини захворювання в певного пацієнта і даних його анамнезу. Робити клінічний висновок на підставі лише імунограми не можна, тому що одні й ті ж зміни показників імунограми можуть спостерігатися при принципово різних патологічних процесах.

2. Комплексний аналіз імунограми більш інформативний, ніж оцінка кожного показника окремо. Однакові зміни певного показника при різних фазах гострого запального процесу можуть трактуватися як сприятливі, так і несприятливі.

3. Реальну інформацію про зміни імунограми несуть лише значні порушення показників в імунограмі (40–50 % від норми і більше). У зв'язку з лабільністю показників імунограми їх незначні коливання можливі і у цілком здорових осіб.

4. Клінічні дані відіграють вирішальну роль, а імунограма має допоміжне діагностичне і прогностичне значення. Відсутність зсувів в імунограмі за наявності клінічної картини патології вимагає глибшого вивчення функцій компонентів окремих ланок імунної системи.

5. Аналіз імунограми в динаміці (особливо в зіставленні з клінічною динамікою) більш інформативний з точки зору як діагностики, так і прогнозу перебігу захворювання та сприяє уникненню помилкового трактування.

6. Діагностичне і прогностичне значення мають індивідуальні показники норми пацієнта (з урахуванням віку та наявності супутніх і хронічних захворювань, дії шкідливих факторів, медикаментозної терапії).

7. Першочергове значення при оцінці імунограми має співвідношення показників імунограми, а не їх абсолютні значення.

8. При оцінці показників імунограми слід враховувати можливість їх коливань у зв'язку з прийняттям їжі, фізичними навантаженнями, відчуттям страху, часом доби.

9. Невідповідність зрушень показників імунограми і клінічної картини захворювання (синдром дисоціації) свідчить про несприятливий розвиток процесу.

10. Чим вища антигенність чужорідного фактора й більша зона його проникнення, тим яскравішим буде запальний процес. Отже, тим значніші мають бути і зрушення в імунограмі, що буде свідчити на користь адекватності реакції імунної системи. Відсутність указаних змін лейкограми та імунограми – несприятливий симптом, що свідчить про неадекватність роботи імунної системи. Своєчасне розпізнавання ознак такої невідповідності є головним завданням клініциста-імунолога.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4

ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ ЕРИТРОЦИТАРНИХ АНТИГЕНІВ СИСТЕМ АВ0 ТА Rh

Мета: навчитися визначати групи крові систем АВ0 та Rh шляхом оцінки специфічних антигенних детермінант.

Обладнання та реактиви:

1. Стандартні ізогемаглютинуючі сироватки груп 0 (I), А (II), В (III) і АВ (IV);
2. Універсальна для всіх груп крові системи АВО сироватка для визначення Rh-фактора.
3. Білі порцелянові або емальовані тарілки або будь-які інші білі платівки, марковані О (I), А (II), В (III) і АВ (IV).
4. Ізотонічний розчин хлориду натрію.
5. Голки, піпетки, скляні палички (предметні скельця), пробірки.

ТЕОРЕТИЧНІ ДАНІ

Еритроцитарні антигенні детермінанти

Еритроцити здатні адсорбувати на своїй поверхні певний антигенний матеріал, що є однією з обов'язкових ланок у розвитку імунної реакції. Це має захисне значення, оскільки запобігає одномоментному надходженню в органи імуногенезу всієї маси антигену, що потрапила в кров. Крім того, еритроцити передають антигенну інформацію макрофагам, лімфоцитам і ретикулярним клітинам.

Таким чином, еритроцити виконують роль своєрідної буферної системи, що відіграє істотну роль в ініціації імунної відповіді і регулює її інтенсивність.

Антигенів, локалізованих на інтегральних білках та полісахаридах еритроцитарної мембрани, на даний час нараховується більше 250. Існують антигени системи Lewis (Левіс), MNSs, Hanter (Хантер), Henshou (Хеншо), Kell-Kellano (Келл-Келлано), Lutheran (Лютеран), Duffy (Даффі), Kidd (Кідд), Rhesus (Резус). Ряд антигенів груп крові наявні лише на еритроцитах (Резус, Келл), інші експресуються і на некровотворних тканинах (АВ0, Левіс, Індіан). Білкові

молекули, що несуть антигени груп крові, функціонують як трансмембранні транспортери, рецептори, молекули клітинної адгезії.

Уявлення про групу крові системи АВ0 базується на наявності в еритроцитах групо-специфічних антигенів (0, А, В), а у сироватці – антитіл α та β . Система АВ0 була першою відкритою системою груп крові. Доведено багатоалельність компонентів системи АВ0. На даний час відомо близько 70 алелей.

Антигени груп крові системи АВ0 схожі між собою і містять спільний компонент – речовину Н. Ця речовина виявлена в еритроцитах людей, що мають групу крові 0, але вона не є продуктом гену 0. Кількість речовини Н обернено пропорційна кількості речовини А та В. Речовина Н, як антиген, неоднорідна і є базисною для синтезу всіх факторів груп крові системи АВ0. Секреція факторів А, В та Н незалежна від генів системи АВ0 і кодується генами, що розташовані на 19 хромосомі.

Існує дві точки зору на сутність антигену 0, відмінного від речовини Н. Згідно першої, речовина 0 синтезується геном Р. Проте, наявність речовини 0 твердо не встановлена, специфічні антитіла до нього не виявлені. Згідно іншої точки зору, речовина 0 є ознакою відсутності антигенів А та В в еритроцитах осіб з групою крові 0(I). Деякі автори ідентифікують 0-речовину як Н. Тому антигенну систему, відкриту Ландштайнером, часто називають АВ0 (Н)-системою.

Фенотипово розрізняють 4 групи крові. Генетично існує 6 комбінацій антигенів: 00, А0, АА, В0, ВВ, АВ. Це відбувається внаслідок того, що три алельні гени групових субстанцій Н, А, В, розміщені по одному на одній хромосомі, при утворенні зигот можуть сформувати гомо- і гетерозиготні варіанти. Такі варіанти відносять до однієї групи крові, оскільки вони не володіють різноякісними властивостями. Лейкоцити і тромбоцити містять ті ж групові антигени АВ0, що й еритроцити, але, їх вміст дещо менший.

Групові речовини різних систем крові за своєю хімічною природою – полісахариди, які не є первинною продукцією генів. Гени полісахаридних антигенів кодують специфічні глікозилтрансферази – ферменти, що приєднують різні цукри до полісахаридних ланцюгів-попередників і формують таким чином

антигенну групу. Гени білкових антигенів груп крові кодують поліпептиди, що вмонтовуються в мембрану еритроцита і самі є носіями антигенних детермінант. Причому, на одній білковій молекулі може розміщуватися кілька антигенних детермінант, проти яких детерміновані різні антитіла. Поліморфізм груп крові визначається числом та поширеністю в популяції алелей даного гену.

Глікозилтрансферази, що беруть участь в синтезі антигенів груп крові АВ0, кодуються алельними генами, розміщеними у локусі q34 на хромосомі 9.

Антигени АВ0 у великій кількості експресуються на еритроцитах. Поширеність еритроцитів в організмі забезпечує біологічну роль цих антигенів у збереженні гомеостазу та реалізації швидкої реакції на введення в організм несумісної крові. Відносна урівноваженість частоти зустрічаності різних груп системи АВ0 в популяції протягом багатьох поколінь свідчить, що кожна з груп є важливим фактором стійкості до певних патологічних станів.

Територія України розділена на 5 геногеографічних зон, проте, істотних відмінностей у представництві АВ0-антигенів по цих зонах не відмічається. У всіх зонах найбільш поширеним є фенотип А (частота 37, 62-39, 99%), Фенотип 0 виявлений у 32,42-33,79% обстежених, фенотип В – у 17,85-22,3%, фенотип АВ – у 7,52-8%. Останній володіє найбільшою стабільністю представництва у всіх геногеографічних зонах України.

Система групи крові Rh-Hr – це одна з найбільш поліморфних та імуногенних систем крові людини, що складається як мінімум з 45 незалежних антигенів.

Антигени системи Rhesus відкриті в 1940 р. К. Ландштайнером та А. Вінером. Залежно від наявності антигену D люди поділяються на резус-позитивних (D+) та резус-негативних (D-). У здорових людей природні антитіла до відсутнього резус-фактору в крові не циркулюють. У осіб з резус-негативною кров'ю при введенні антигенів утворюються специфічні антитіла. У резус-позитивних осіб антиген D експресується на мембранах еритроцитів.

Антигени Rh з'являються на ранніх стадіях диференціювання еритропоетинів. Білки Rh, що несуть антигени системи резус, здатні експресуватися на мембрані еритроцитів лише у присутності допоміжного

глікопротеїну Rh50 і формують з ним внутрішні комплекси. Практично нічого не відомо про фізіологічну роль білків родини резус. RhD, RhCE, і RhAG, взаємодіючи з іншими мембранними протеїнами, формують комплекси, функції яких точно не визначені, проте, існують гіпотези про їх транспортні можливості. Не виключена важлива роль різних протеїнів Rh у підтриманні умов гомеостазу на клітинному і навіть організменному рівнях. При деяких пухлинних захворюваннях антиген D втрачається, що призводить до зміни резус-фенотипу.

Наявність основних антигенів системи резус на еритроцитах зумовлюється трьома зчепленими локусами генів (1p34.1-1p36), розміщених на першій аутосомній хромосомі. Ген, що кодує глікозильований гомолог Rh50, розміщений на короткій ділянці шостої хромосоми.

Антиген D виявляється у 86,05% населення України.

ХІД РОБОТИ

Методика визначення груп крові системи АВО.

Стандартні ізогемаглютинуючі сироватки груп 0 (I), А (II), В (III) і АВ (IV) повинні мати титр (вказується на етикетці) не нижче 1: 32 (для сироватки В (III) – не нижче 1:16/32). Під титром сироватки розуміється те максимальне її розведення, при якому може наступати реакція аглютинації. Сироватка повинна бути прозорою, без ознак гниття. Для зручності стандартні ізогемаглютинуючі сироватки різних груп підфарбовують у певний колір: 0 (I) – безбарвна (сіра), А (II) – синя, В (III) – червона, АВ (IV) – яскраво-жовта.

Стандартні гемаглютинуючі сироватки наносять на білу пластинку по одній великій краплі (0,1 мл) у попередньо підписані позначення. Щоб запобігти помилці під час кожного визначення групи крові використовують по 2 зразки сироваток кожної групи (різні серії), котрі утворюють 2 ряди крапель в наступному порядку по горизонталі: 0(I), А(II), В(III).

Досліджувану кров наносять по одній маленькій краплі (приблизно в 10-20 раз менше краплі сироватки, 0,01 мл), поряд з краплею сироватки. Кров ретельно змішують з сироваткою скляною паличкою або кутом предметного скла, котрі промивають і насухо витирають перед розмішуванням кожної краплі.

Спостереження за проходженням реакції проводять при легкому покачуванні пластинки протягом 5 хвилин. Результат реакції в кожній краплі може бути позитивним (+) або негативним (-).

Позитивний результат (+) виражається в аглютинації (склеюванні) еритроцитів; аглютинанти видно неозброєним оком спочатку у вигляді дрібних червоних зерен, що поступово склеюються в великі. При цьому сироватка поступово знебарвлюється.

При негативній реакції (-) крапля залишається забарвленою рівномірно.

Аглютинація настає зазвичай протягом перших 10-30 секунд, але спостереження проводять не менше 5 хвилин, внаслідок можливості пізнього настання аглютинації.

В міру настання аглютинації, але не раніше 3 хвилин, в ці краплі додають по одній краплі (0,1 мл) фізіологічного розчину NaCl для руйнування іноді хибної аглютинації.

В тих випадках, коли позитивний результат одержується зі стандартними сироватками всіх груп (у всіх краплях), для виключення неспецифічної аглютинації проводиться додаткове дослідження еритроцитів крові зі стандартною сироваткою групи АВ (IV), яка не містить групових аглютинінів. Лише відсутність аглютинації з сироваткою групи АВ (IV) дозволяє врахувати позитивний результат реакції з сироватками 0(I), А(II), В(III) як істинний.

Визначення резус-фактора експрес-методом

Реакція проводиться у пробірках без підігріву. Береться спеціальна, універсальна для всіх груп крові системи АВ0 сироватка.

У пробірку поміщається 1 краплина сироватки, додається 1 краплина досліджуваних еритроцитів і після 3-хвилинного погойдування заливається ізотонічним розчином хлориду натрію, пробірка тричі повертається і результат оцінюється у відбитому світлі. Наявність аглютинації свідчить про наявність Rh-антигену.

Оцінка результатів визначення групи крові АВО

Результат реакції зі стандартними сироватками групи:			Досліджувана кров належить до групи:
0(I)	A(II)	B(III)	
- - - - - -	O (I)		
+ + - + + +	A (II)		
+ + + - + -	B (III)		
+ + + + + +	AB (IV)		
Контроль з сироваткою групи AB(IV) -			

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сучасні імуногенетичні дослідження свідчать про необхідність і перспективність проведення комплексного імуногенетичного обстеження індивіду за основними генетичними системами з урахуванням можливості взаємодії між ними. Такий підхід дає можливість оцінити асоційованість між фенотипом генетичних маркерів крові та здатністю організму реалізувати адаптаційні реакції різного діапазону прояву – від слабкого до сильного, з урахуванням ряду додаткових факторів: віку, екологічних умов, статі, генетичної структури популяції, географічної зони проживання, пори року і т.д. Важливим є з'ясування аспектів можливих взаємовідносин імуногенетичних алелей як всередині окремої системи, так і між різними генетичними системами крові.

Існують лабораторні дані щодо зв'язку деяких показників імунореактивності організму з генетичними маркерами крові, що визначають її групи системи АВ0. У обстежених здорових людей віком 18-25 років, що мають четверту групу крові, знижена, порівняно з першою групою, імунологічна реактивність по Т-системі імунітету, інактивовані фактори неспецифічної резистентності. Аналогічне порівняння четвертої групи з другою демонструє дефіцит кількості Т- і В-лімфоцитів, з третьою – дисбаланс по В-системі (зниження одних і стимуляція інших показників). Генетичні фактори імунорегуляції відіграють важливу роль у регуляції специфічної гуморальної відповіді. Є теорії, що наявність того чи іншого антигенного маркера групи крові генетично зумовлює функціональну неповноцінність системи синтезу деяких імуноглобулінів. В дослідженнях показано, що для донорів з групою крові 0(I) характерний найвищий вміст IgA і найнижчий IgM, для групи A(II) – максимальний рівень IgG і мінімальний IgA, для групи B(III) – найвищий IgM і найнижчий IgG, для групи AB(IV) спостерігається проміжне положення, показники мають схожість по кількості IgA та IgG з донорами групи B, по вмісту IgM – з донорами групи A. Показано, що група крові AB(IV) зустрічається в 2,5 рази частіше серед осіб з гіпогамаглобулінемією. Серед цієї ж групи підвищена частота осіб з порушеною роботою тимусу. Існують публікації про відсутність зв'язку вмісту в крові

імуноглобулінів різних класів з груповою належністю по системі АВ0 при наявності зв'язку з іншими групами крові, зокрема, MN, Резус. Зокрема, у резус-негативних здорових людей концентрація IgA вища, ніж у резус-позитивних.

Виявлено коливання таких показників, як вміст паличкоядерних та сегментоядерних лейкоцитів (при 0(I) групі нижчий, ніж при A(II)), моноцитів (у 0(I) групі нижчий, ніж у B(III)). У хворих осіб з фенотипом A(II) частіше спостерігається збільшення рівня сегментоядерних лейкоцитів, ніж у обстежених з фенотипом B(III), і рідше підвищення моноцитів.

Резус-позитивні люди частіше, ніж резус-негативні, мають в крові антитіла до збудників тифу, дизентерії Зонне, штаму 086 кишкової палички. Перевагою резус-негативних осіб є високий титр антитіл до бактерій Флекснера та штаму 055 кишкової палички.

У деяких публікаціях найбільш висока імунореактивність описана для осіб з групами крові A(II) та B(III). У інших – осіб з B(III) групою відносять до групи ризику порушень імунореактивності. Вираженою імунологічною активністю володіють антигени системи «Резус» (зокрема, антиген D), що відображається на характері імунологічного процесу при відсутності резус-фактора.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5

ТЕМА: КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ МЕТОДОМ РАДІАЛЬНОЇ ІМУНОДИФУЗІЇ В ГЕЛІ.

Мета: навчитися визначати концентрацію основних сироваткових імуноглобулінів.

Обладнання та реактиви:

1. Чашки Петрі;
2. Агароза;
3. Веронал-медіналовий буфер рН
4. Моноспецифічні сироватки проти IgG(H), IgM(H), IgA(H), («ИмБио», Нижній Новгород).

ТЕОРЕТИЧНІ ДАНІ

Класи імуноглобулінів

Імуноглобуліни – це білки плазми, що продукуються В-лімфоцитами і здійснюють специфічний гуморальний захист шляхом розпізнання і зв'язування антигенів та гаптенів, мають важливий опсонізуючий ефект і виступають основним активатором системи комплементу. Завдяки імуноглобулінам реалізується основний етап захисту організму від мікроорганізмів, чужорідних білків, гаптенів та аутоантигенів, тому їх дефіцит призводить до тяжких наслідків і швидкої загибелі організму. Імуноглобуліни є антитілами, що забезпечують високоспеціалізований імунологічний захист в організмі.

Основною функцією антитіл є зв'язування антигенів, але антитіла можуть діяти самостійно, нейтралізуючи бактеріальні токсини або віруси і попереджаючи проникнення вірусів у клітини. Крім того, антитіла мають і інші властивості, такі як посилення бактеріального фагоцитозу лейкоцитами та знищення клітин, зруйнованих вірусами. Спостерігалось достовірне зменшення смертності серед тварин, які отримували імуноглобулін через 8 годин після зараження вірусом лихоманки Ебола, що є переконливим доказом забезпечення антитілами клітинної цитотоксичності. При цьому антитіла, споріднені з вірусінфікованими клітинами, здійснюють противірусний імунний захист разом з цитотоксичними лейкоцитами.

Антитіла є γ -глобулінами, що входять до складу нормальної протеїнограми і є однією з найбільш істотних складових частин плазми крові (близько 9,5 – 17,1 % від загального рівня білка). Іншими білковими фракціями крові є альбуміни та фібриноген. Рівень загального білку в середньому становить близько 69 г/л. При порушенні в кількісному співвідношенні між окремими білковими фракціями крові виникає диспротеїнемія. Кількість гама-глобулінів у плазмі крові значною мірою визначається функціональним станом імунної системи. Під впливом різних факторів на імунореактивну тканину можуть виникнути значні зміни у рівні γ -глобулінів крові. Зміни у кількісному співвідношенні між окремими підкласами γ -глобулінів належать до дисгамаглобулінемій (дисімуноглобулінемій).

Серед сироваткових імуноглобулінів основними є IgG, IgA та IgM.

IgG – головний клас сироваткових антитіл при вторинній імунній відповіді. Володіє здатністю проникати через плацентарний бар'єр, тому у перші тижні життя новонароджених є головним засобом їх захисту від інфекцій. Має велике значення для опсонізації бактеріальних токсинів та мікроорганізмів. Концентрація IgG найвища серед імуноглобулінів у сироватці крові і коливається в межах 7-18 г/л. Володіючи високою специфічністю, IgG бере активну участь в імунній відповіді і, одночасно, регулює її, впливаючи на активність інших механізмів імунної відповіді – клітинного та гуморального, визначаючи, в кінцевому результаті, повноцінність імунної відповіді.

IgA – присутній у сироватці крові у мономерній формі, димерна форма міститься переважно в секреті слизових оболонок і захищає їх від проникнення інфекції. Концентрація сироваткового IgA складає 0,8-3,7 г/л, він здатний знешкоджувати мікроби та токсини, що циркулюють в крові, проте, його дія слабша, ніж секреторного IgA.

IgM є першим бар'єром на шляху інфекції і еволюційно з'явився раніше, ніж інші класи імуноглобулінів. На мембрані В-лімфоциту існує у вигляді мономеру і є типовим антиген-специфічним рецептором цих клітин. Після активації В-лімфоцити секретують спочатку пентамерний IgM, а потім переключаються на IgG або інші класи імуноглобулінів. В міру збільшення синтезу IgG та зростання його титру різко гальмується синтез мало специфічних

IgM, який регулюється лише рівнем відповідного йому по специфічності IgG. Завдяки олігомерності викликає аглютинацію мікробних клітин. Вміст у периферичній крові 0,4 – 2,2 г/л. Синтез IgM, оскільки у ньому не беруть участі Т-лімфоцити, резистентний до дії імунодепресантів та опромінення.

ХІД РОБОТИ

В основі цього методу лежить метод Манчіні, який засновано на вимірюванні діаметру кілець преципітації, що утворюються при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в шарі агару, в якому завчасно диспергована моноспецифічна антисироватка. У стандартних умовах дослідіу діаметр кільця преципітації прямопропорційний концентрації досліджуваного імуноглобуліну. Вміст імуноглобулінів визначають відносно стандартної сироватки крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів.

Скляні пластини розміром 9x12 см покривають рівномірним шаром суміші «агар + моноспецифічна антисироватка». Для цього на пластині розміщують П-подібну рамку товщиною 1мм, зверху розміщують іншу скляну пластину, змочену гідрофобною рідиною; і простір між пластинами заливають сумішшю агару та антисироватки в кількості 9 мл. Для отримання суміші 3 % агар або агарозу на 0,1 М веронал-медіналовому буфері рН мішують при 56°C в співвідношенні 1:1 з антисироваткою, в якій концентрація антитіл вдвоє перевищує робочий титр.

В шарі агару з антисироваткою пробійником вирізають лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від іншої. На пластині роблять декілька рядів лунок. В лунки першого ряду вносять за допомогою мікрошприца по 2 мкл стандартної сироватки нерозведеної та в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8. Лунки інших рядів заповнюють досліджуваними препаратами. Пластини інкубують у вологій камері протягом 24 год при +4°C, а пластини з анти-імуноглобуліном М сироваткою – 48 год. По закінченні інкубації вимірюють діаметри кілець преципітації.

На вологих не зафарбованих пластинах вимірювання проводять, використовуючи лупу з двократним збільшенням або за допомогою штангенциркуля і вимірювача. На зафарбованих пластинах діаметри вимірюють

за допомогою лінійки Behringwerke. Рівень імуноглобулінів вимірюють за калібрувальною кривою, що виражає залежність між рівнем імуноглобулінів та діаметром кільця преципітації.

На напівлогарифмічному папері по осі абсцис відкладають діаметри кільця стандартної сироватки, а по осі ординат – відому кількість імуноглобуліну в мг/мл або МЕ/мл, що міститься в стандартній сироватці кожного розведення. Утворені точки з'єднують прямою. Таким чином будують графіки для кожного імуноглобуліна окремо.

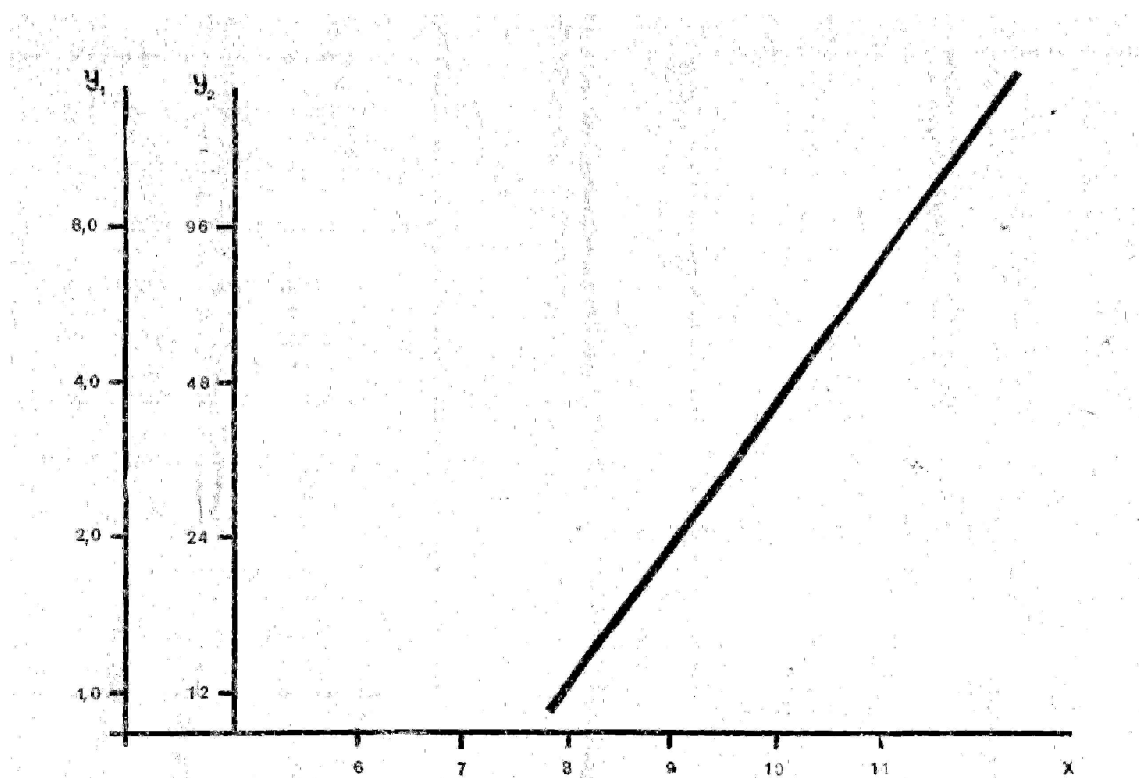


Рис. 12. Розрахунок кількості IgG у дослідній сироватці за калібрувальною кривою. Калібрувальна крива відображає залежність діаметра кільця від концентрації імуноглобуліну:

y1 – кількість IgG у мг/мл.

y2 – кількість IgG у МЕ/мл.

x – діаметр кільця преципітації у мм.

Для вимірювання рівня імуноглобулінів в досліджуваній сироватці: на осі абсцис відкладають діаметр кільця преципітації досліджуваної сироватки. Роблять перпендикуляр до перехрестя з кривою, і точку перехрестя проєктують на вісь ординат.

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У таблиці 3 наведено рівень основних класів імуноглобулінів у периферичній крові здорової людини.

Таблиця 3

Показники норми основних сироваткових імуноглобулінів

Показники	Норма
IgG, г/л	6,10-18,20
IgM, г/л	0,40-3,10
IgA, г/л	0,40-4,10

IgM – це антитіла гострого періоду імунної відповіді, що синтезуються плазматичними клітинами при першому контакті з певним патогеном. У середньому високі концентрації специфічних IgM реєструються з 6–7-го дня після інфікування, пізніше рівень IgM знижується на фоні підвищення вмісту IgG, тобто відбувається переключення з синтезу IgM на IgG. Діагностичне значення високих рівнів специфічних IgM полягає в можливості встановлення факту гострої інфекції, при якій мало місце первинне інфікування певним збудником. Однак слід враховувати, що у хворих на імунодефіцитні захворювання порушується формування імунної пам'яті, у зв'язку з чим можливі випадки, коли при повторному інфікуванні тим самим збудником знову має місце фаза переважної продукції IgM. Зазначена особливість може бути лабораторним критерієм постановки діагнозу імунодефіцитних захворювань.

IgG – це антитіла пізньої фази імунної відповіді, що починають синтезуватись після періоду переважання IgM. У властивостях IgG враховані умови періодів регресу клінічних проявів і реконвалесценції запального процесу, протягом яких кількість патогену зменшується і першочерговим для виліковування є якість розпізнавання антигену. У зв'язку з цим IgG є більш специфічним антитілом, аніж IgM. З іншого боку, у властивостях IgG враховані недоліки IgM, що через великі розміри мають досить обмежену здатність проникати до тканин. Для успішної ерадикації патогену необхідне забезпечення надійного контролю периферичних тканин з боку імуноглобулінів на випадок

наявності патогену. IgG, що мають лише 2 центри зв'язування антигену й меншу молекулярну масу, мають кращу здатність проникати до периферичних тканин.

Високі рівні специфічних IgG реєструються в періоди регресу клінічних проявів і реконвалесценції при гострому запальному процесі. Специфічні IgG можуть продукуватися й циркулювати в сироватці крові протягом тривалого терміну після виліковування, оскільки саме цей клас антитіл продукують клітини імунної пам'яті. Вибір IgG для забезпечення імунної пам'яті є не випадковим, оскільки це водночас і найбільш економні, і найбільш специфічні антитіла. Після перенесеної інфекції або має забезпечуватися стабільна концентрація специфічних IgG, або повинно мати місце поступове зниження їх титрів. Зростання титрів специфічних IgG через тривалий термін після перенесеного гострого запального процесу свідчить не про підтримання імунної пам'яті, а про неповне виліковування і хронізацію інфекції, оскільки IgG є антитілами вторинної імунної відповіді, що реалізується при контакті зі вже знайомим антигеном. Отже, при повторній гострій інфекції або загостренні хронічної інфекції фаза переважання IgM відсутня й одразу ж синтезується IgG. Порушення такої закономірності може бути критерієм імунодефіцитних захворювань. Дефіцит IgG найбільш часто проявляється у вигляді хронічних гнійних бронхітів, синуситів і отитів, що виявляються резистентними до лікування антибіотиками, а також у вигляді гнійничкових захворювань шкіри (пустульоз, фурункульоз, карбункули, абсцеси тощо) з хронічним або рецидивним перебігом.

IgA – це імуноглобуліни слизових оболонок і шкіри. Розрізняють сироваткову і секреторну форми (sIgA). Дефіцит sIgA може бути пов'язаний як зі зниженням концентрації сироваткової форми, яка є попередницею секреторної, так і з порушенням діяльності епітелію, де для IgA синтезується секреторний компонент, що захищає молекулу імуноглобуліну від розщеплення травними ферментами. Отже, для адекватної оцінки обміну IgA необхідно проводити паралельне дослідження рівнів його сироваткових і секреторних форм.

sIgA є важливим для підтримання імунної пам'яті слизових оболонок і для забезпечення феномену «імунної солідарності». При дефіциті sIgA відмічається висока схильність до інфекцій (особливо вірусної природи), входні ворота яких

формуються на слизових оболонках. Часто дефіцит зазначеного імуноглобуліну є причиною хронічного вірусного лімфаденіту та тимомегалії. Крім того, дефіцит sIgA може лежати в основі поєднаних запальних процесів на слизових різних органів (наприклад, хронічного гаймориту й гастродуоденіту), що є результатом порушення підтримання імунної солідарності слизових.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вершигора А.Е. Общая иммунология / А.Е. Вершигора - К.: Вища школа, 1990. - 735 с.
2. Гематологія / [Н.М. Третяк, Н.В. Горяїнова, С.Ю. Калініна та ін.] – К.: Зовнішня торгівля, 2005. – 234 с.
3. Дизик Г.М. Антигени еритроцитів і захворювання / Г.М. Дизик // Генетичні системи крові людини та хвороби. / Г.Н. Дранник, Г.М. Дизик. – К.: Здоров'я, 1990. – С. 18–85.
4. Диспротеинемии / [И. Вапцаров, М. Иомтов, С. Саввов и др.]; пер. с болгарского. – М.: Медицина, 1978. – 336 с.
5. Донсков С.И. Группы крови в биологии человека – факты и предположения / С.И. Донсков // Вестник службы крови России. – 2001. – №1. – С.21–33.
6. Дранник Г.Н. Генетические системы крови человека и болезни. / Г.Н. Дранник. – К.: Здоровье, 1990. – 200 с.
7. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология: учебное пособие. / Г.Н. Дранник. – Одесса: Астропринт, 1999. – 604 с.
8. Иммунология в клинической практике / Под ред. К.А. Лебедева. — М.: ЦПИ «ИЭМК», 1996. — 354 с.
9. Иммунология. В 3-х томах / Под ред. У. Пола - М.: Мир, 1987-1989.
10. Казмірчук В.Є. Клінічна імунологія та алергологія / В.Є. Казмірчук, Л.В. Ковальчук — Вінниця: Нова книга, 2006. — 526 с.
11. Клиническая гематология / [А.Ф. Романова, Я.И. Выговская, В.Е. Логинский и др.] – К.: Медицина, 2006. – 454 с.
12. Клиническая иммунология / Под ред. А.В. Караулова. – М.: Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
13. Новиков Д.К. Противобактериальный иммунитет / Д.К. Новиков // Иммунопатология аллергология инфектология – 2002. - №2. – С. 7-18.
14. Новиков Д.К. Противовирусный иммунитет / Д.К. Новиков // Иммунопатология аллергология инфектология – 2002. - №1. – С. 5-15.

15. Скок М.В. Основи імунології. Курс лекцій / М.В. Скок. – К. : Фітосоціоцентр, 2002.
16. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов // Рос. Физиол. Журнал им И.М. Сеченова. – 2000. – Т. 86, № 3. – С. 252–267.
17. Ярилин А.А. Основы иммунологии: учебник / А.А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.