

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРКАСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ БОГДАНА ХМЕЛЬНИЦЬКОГО

КАФЕДРА БІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ

В.Л. СОКОЛЕНКО, С.В. СОКОЛЕНКО

ІМУНОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник

ЧЕРКАСИ 2014

УДК 577.27:615(075)

ББК 52.523.25a73

Рецензенти:

завідувач кафедри біології та біохімії

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

доцент кафедри вірусології

Навчально-Наукового Центру «Інститут Біології»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

кандидат біологічних наук, доцент – *Т.А. Компанець*

Соколенко В.Л., Соколенко С.В. Імунологія. Навчально-методичний посібник – Черкаси: Вид. ТОВ «ЛЕМАР-ПРОМ», 2014. – 92 с.

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

УДК 577.27:615(075)

ББК 52.523.25a73

Рекомендовано до друку методичною радою ННІ природничих наук
(протокол №8 від 30.04.2014)

ЗМІСТ

ТЕМА: ІМУНОЛОГІЯ ЯК НАУКА. НЕСПЕЦИФІЧНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ОРГАНІЗМУ	4
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. ТЕМА: ЗАБІР КРОВІ. ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЛЕЙКОЦИТІВ.....	25
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. ТЕМА: ОЦІНКА ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ.....	30
ТЕМА: ГУМОРАЛЬНИЙ СПЕЦИФІЧНИЙ ІМУНІТЕТ.....	44
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. ТЕМА: КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ МЕТОДОМ РАДІАЛЬНОЇ ІМУНОДИФУЗІЇ В ГЕЛІ.....	57
ТЕМА: КЛІТИННИЙ СПЕЦИФІЧНИЙ ІМУНІТЕТ	60
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. ТЕМА: ІМУНОФЕНОТИПУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ.....	69
ТЕМА: РЕГУЛЯЦІЯ ФУНКЦІЙ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ.....	76
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ ЕРИТРОЦИТАРНИХ АНТИГЕНІВ СИСТЕМ АВ0 ТА Rh.....	82
ЛІТЕРАТУРА.....	91

Тема: Імунологія як наука. Неспецифічна резистентність організму**Зміст:**

1. Історія розвитку імунології
2. Види імунітету
3. Поняття про антигени
4. Вроджений імунітет, його фактори
5. Захисні функції шкіри та слизових покривів
6. Професійні фагоцити – мікро- та макрофаги
7. Лізоцим, як провідний гуморальний фактор неспецифічного імунітету
8. Система комплементу
9. Поняття про гостру запальну реакцію. Стадії запалення
10. Гуморальні фактори неспецифічного імунітету
11. Натуральні кілери та еозинофіли

1

Людина живе в потенційно ворожому світі, наповненому великою кількістю агентів, що мають різні розміри, форму, будову і руйнівну здатність. Тому організм виробив ряд захисних механізмів, що забезпечують виникнення імунітету до інфекцій (лат. *Immunitas* – вільний від чого-небудь) і є об'єктом вивчення предмету, що називається «імунологією».

Слово «імунітет» латинського походження. Його вживали ще за часів середньовічної Європи. У VII-VIII століттях деякі феодали мали особливі грамоти, які надавали їм право на імунітет: така людина звільнялась від інших податей, одержувала дозвіл сама чинити суд над своїми підданими, розпоряджатися землями і т.д. Власник імунітету знаходився у виключному становищі і фактично був непідвласним королю.

У початковому значенні слово «імунітет» вживається і сьогодні. Так, існує дипломатичний імунітет, який означає особисту недоторканість, тобто

недоторканність службових та житлових приміщень, непідвладність суду держави, де особа акредитована.

Саме тому термін «імунітет» було обрано для визначення стану несприйнятливості до інфекцій. Тобто, наприклад, коли у регіоні епідемія дифтерії, то всі інфіковані повинні захворіти, але ті, що отримали відповідні щеплення, від цієї загальної «повинності» звільненні, тому що в них є імунітет.

Ще задовго до народження імунології як науки було помічено, що такими хворобами, як віспа, вітрянка, кір та свинка діти хворіють тільки раз у житті. Тобто, організм здатний виробляти захисні механізми проти інфекції, якщо раніше мав контакт з нею. Цей феномен був використаний для попередження інфекції.

Як і у відкритті Америки, першість відкриття щеплення ставиться під сумнів. Китайці стверджують, що ще на початку XI століття вони вводили у ніздрі здоровим людям віспові струпи хворих і тим самим досягалося попередження віспи. У цей же час у Персії проводили щеплення проти віспи в лазнях. Служителі лазень втирали тим, хто купався, у розрізи шкіри порошок з віспових струпів. Черкеси та грузини у XVIII сторіччі з метою збереження краси своїх дочок робили їм уколи голками, змоченими рідиною з віспових виразок.

Перша наукова публікація, присвячена розробці методу боротьби з інфекцією, була зроблена у 1788 році Едвардом Дженнером, який довів неможливість зараження людини натуральною віспою після щеплення «коров'ячою віспою».

Та лише майже через століття у 1881 році Луї Пастер розробив загальний принцип попереджувальних щеплень шляхом введення ослаблених мікроорганізмів. Тому саме цей рік називають роком народження імунології як науки.

Істотний вклад у розвиток імунології вніс у кінці 19 ст. російський вчений І.І. Мечников.



Е. Дженнер робить щеплення від віспи



Луї Пастер



І.І. Мечников

Для того, щоб організм мобілізував свій імунітет проти будь-якої бактерій та почав виробляти специфічні антитіла, потрібен час. Ілля Ілліч Мечников довів, що існує перша ланка захисту, котра реагує миттєво на чужорідну субстанцію. Вчений помітив, що навіть одноклітинні організми мають свою систему захисту – це захоплення та перетравлювання у спеціальних вакуолях за допомогою травних ферментів. У 1882 році Мечников встромив кілька шипів троянди під шкіру личинки морської зірки. На другий

день він помітив, що шипи були обліплені клітинами. Ці клітини Мечников назвав фагоцитами-пожирачами клітин.

Для того, щоб довести роль фагоцитів у захисті від бактерій, вчений поставив такий геніальний дослід. Було взято дві групи мишей. Одній групі тварин у кров було введено розчин туші. Під мікроскопом Мечников побачив, що частинки туші захоплювались фагоцитами. Якщо такий фагоцит «наковтався» туші, то на деякий час він виходив із ладу, втрачаючи свою активність. Потім обидві групи мишей Мечников інфікував не смертельною дозою бактерій. Тварини першої групи з блокованими тушою фагоцитами загинули. Друга група мишей залишилася живою.

Поступово дослід з захисту організму від бактерій склалися у єдину теорію. І у 1901 році І.І. Мечников видав свою першу публікацію «Несприятливість до інфекційної хвороби», де викликав фагоцитарну теорію імунітету. За цю працю у 1908 році вченому була присуджена Нобелівська премія.

Протягом всього часу були перешкоди, які імунологи з честю долали. Але є ще такі перепони, які вчені разом з лікарями намагаються подолати вже не одне десятиріччя. Більш того, природа ставить нові імунологічні проблеми.

Особливою гордістю імунологів є практично повна перемога над віспою. Всесвітня організація охорони здоров'я при ООН розробила програму загального щеплення проти віспи усіх жителів Землі. Після її проведення віспи на Землі не стало. Останній офіційний випадок віспи зареєстровано у Сомалі в 1977 році. В Женеві у штаб-квартирі ВОЗ заведено спеціальний «реєстр», до якого надходить інформація про «чутки» захворюваності віспою. Лікаря, який зможе поставити діагноз «віспа» ВООЗом призначена премія, яка дорівнює Нобелівській. У реєстрі є записи про «чутки» захворювання віспою, але жодна з них не підтверджена. У травні 1980 року на Всесвітній асамблеї ВООЗ було проголошено про повну ліквідацію віспи (хоча, в окремих військових лабораторіях вірус ще зберігається). У більшості країн, в тому числі і Україні,

було відмінено щеплення проти віспи. Теперішні малюки не мають на своїх руках відмітин щеплень від віспи, які є у їхніх батьків.

Друга грізна хвороба, після якої ті, хто залишився живим, отримують важкий ступінь інвалідності через невиліковні паралічі – поліомієліт. В 1959-60 рр. у СРСР було проведено щеплення всіх дітей. Вже у 1961 році захворюваність знизилась з 22 тис. до 4 тис., а через 6 років поліомієліт було повністю ліквідовано. У США щеплення проведено на рік пізніше. Було підраховано, що внаслідок захворювання на поліомієліт 154 тис. американців втрата національного доходу за 6 років епідемії склала 6,7 млрд. доларів, а вартість щеплення разом із заробітною платою лікарям, дослідницькими роботами по створенню та виробленню вакцини – 0,65 млрд. доларів.

Є імунологічні проблеми, які вирішуються не одне десятиріччя, але повного успіху ще не досягнуто. Такою проблемою постала проблема трансплантації органів.

3 грудня 1967 р. Крістіан Нетлінг Барнард зробив операцію пересадки серцю людині. Пересажене серце працювало на організм реципієнта ще 17 днів. 3 травня 1968 р. вперше пересадку серця зробив Дентон Кулі з Х'юстона. Лише за один рік Кулі зробив 22 таких операції на серці людини. Але, як казав Десім Нора: «Все скінчилось схлипом, а не вибухом». Всі 22 реципієнти жили протягом всього 2-ох років після операції. Через деякий час після операції організм починав боротьбу проти пересаженого серця так само, як з чужорідними бактеріями та вірусами, тобто спостерігалась реалізація реакції «трансплантат проти господаря».

Генеральний секретар Міжнародного товариства хірургів Ш. Ван-Гессертруден був вимушений визнати: «Сьогодні одна з головних проблем хірургії полягає не в тому, щоб майстерно маніпулювати інструментами, а в тому, щоб витримати натиск інфекції та «навчити» чужорідні тканини пересаженого органу приживлятися». Таким чином, основними перепонами на шляху до пересадження органів є несумісність тканин донора і реципієнта та

імунна реакція останнього. Імунолог Мартин Бота вирішив пригнітити імунітет хворого з пересадженим серцем. Після операції хворому Луїсу Вашканську було проведено курс променевої терапії та введення препаратів, що пригнічують імунітет. Така терапія мала попередити відторгнення серця, але хворий прожив лише кілька днів після операції, хоча відторгнення не виникло. Справа в тому, що імунітет, який заважав приживленню серця донора, захищав організм від хвороботворних бактерій. Хворий помер від запалення легень.

Сучасна імунологія шукає механізми подолання СНІДу, реакцій гіперчутливості та розвитку злоякісних пухлин

Проблема несумісності генетично чужорідних тканин при пересадці органів показала, що імунітет захищає організм як від мікроорганізмів, так і від усіх чужорідних клітин та тканин.

У 1965 році Р.В. Петров запропонував таке визначення імунітету: «Імунітет – це спосіб захисту організму від живих тіл та речовин, які несуть на собі ознаки генетично чужорідної інформації». На сьогодні до визначення можна додати: як від тих, що надійшли із середовища, так і від тих, що сформувалися в самому організмі.

2

Є дві класичні класифікації імунітету. За першою імунітет поділяють на **клітинний**, що забезпечується лейкоцитами і **гуморальний** – дію розчинних факторів, що продукуються лейкоцитами.

За другою класифікацією імунітет поділяється на **природжений** та **набутий**.

Природжений (видовий або спадковий, неспецифічний) імунітет – стійкість організму до певних патогенних агентів, яка властива даному виду і передається спадково. Вважають, що цей вид імунітету пов'язаний з особливостями генотипу даного конкретного виду макроорганізму. Наприклад:

10

несприйнятливість людини до чуми ВРХ, курячої холери, а тварин – до скарлатини, кору.

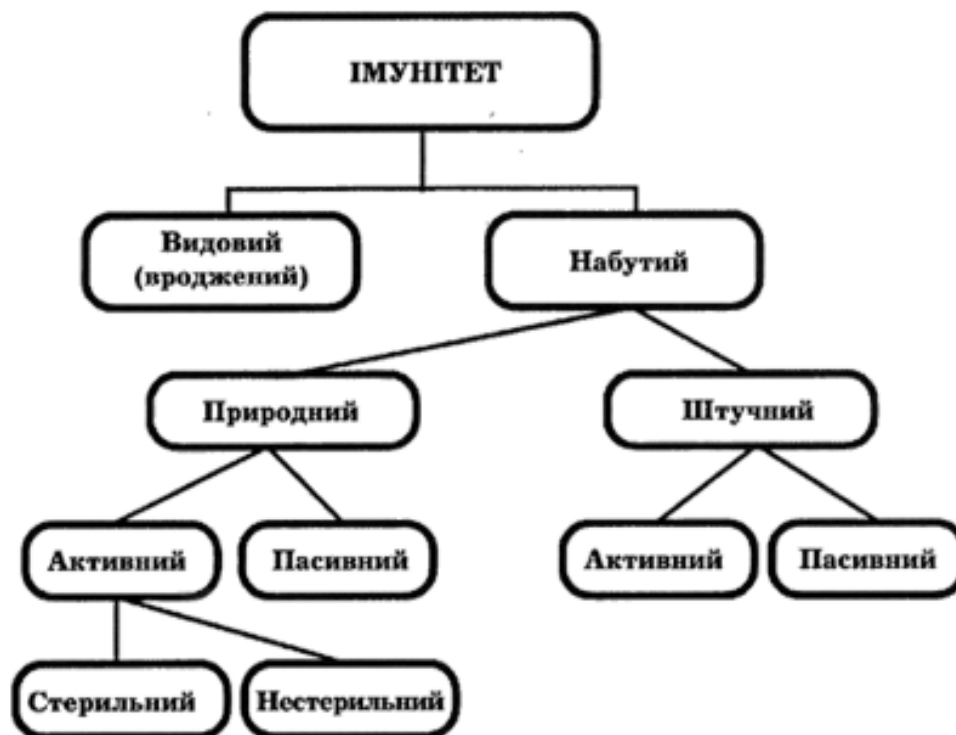
В основі механізмів природженого імунітету до інфекцій лежить відсутність у клітинах макроорганізму рецепторів і субстратів, які необхідні для адсорбції і розмноження збудника інфекції, наявність речовин, що блокують його репродукцію, здатність організму-хазяїна синтезувати різні інгібітори у відповідь на проникнення патогенних мікроорганізмів.

Набутий імунітет – специфічний захист проти генетично чужорідних субстанцій (антигенів), який здійснюється імунною системою організму у вигляді вироблення антитіл або нагромадження сенсibiliзованих лімфоцитів. Набутий імунітет виробляється в результаті перенесеного захворювання або вакцинації здорового організму.

Набутий імунітет поділяють на природний і штучний. Природний у свою чергу – на активний і пасивний. Природний активний імунітет може виникати після перенесення інфекції і тривати місяцями, роками або все життя. Природний пасивний імунітет має новонароджений організм, набуваючи його від матері в період внутрішньоутробного розвитку.

Набутий штучний імунітет виробляється в результаті активної або пасивної імунізації організму. Штучний активний імунітет формується під впливом вакцин і може тривати від кількох місяців до кількох років. Імунітет, зумовлений введенням в організм готових захисних речовин (антитіл) у вигляді сироваток, дістав назву набутого пасивного імунітету.

Набутий імунітет не успадковується. Він формується по відношенню до конкретного виду патогенного мікроба в результаті контакту з ним, тобто є строго специфічним. Цей вид імунітету дуже стійкий; наприклад, після віспи він зберігається все життя, а після кору і висипного тифу – довгі роки.



Одна з головних класифікацій імунітету

3

Антигени (від грец. анти – проти і генезис – походження, народження) – речовини, які несуть ознаки генетично чужорідної інформації та спричинюють при введенні їх у організм розвиток специфічних імунологічних реакцій. Вперше назву «антиген» в 1899 році цим речовинам дав Deutsch.

Антигени мають такі властивості:

- чужорідність; без чужорідності не існує антигену до даного організму;
- антигенність – здатність викликати утворення антитіл (імунову відповідь);
- імуногенність – здатність створювати імунітет;
- специфічність – здатність реагувати лише з окремими антитілами або клітинами; антигени, які реагують на різні антитіла, відрізняються між собою.

Утворення в організмі антигенів здійснюються двома шляхами: проникнення стороннього агенту або утворення у організмі за рахунок видозміни нормальних клітин та тканин (**аутоантигенів**)

Антигенами можуть бути клітини та тканини тваринного або рослинного походження, мікроорганізми, віруси, власні перероджені клітини.

До хімічного складу антигенів входять лише органічні речовини: білки, ліпіди, вуглеводи як окремо, так і в різних комбінаціях.

Антигени здатні викликати різні імунологічні реакції, такі, як утворення циркулюючих антитіл, клітинного імунітету (специфічну активність лімфоцитів), індукування імунологічної пам'яті та ін.

4

За виключенням не до кінця зрозумілих конституційних факторів, які роблять один вид сприйнятливим, а другий несприйнятливим до певних інфекцій, існує ряд неспецифічних антимікробних систем, які є **вродженими** у тому розумінні, що їх активність не залежить від попереднього контакту з антигеном. Такий вроджений захисний механізм ще називають **неспецифічною резистентністю**.

При формуванні імунної відповіді відбувається синтез специфічних антитіл. Наприклад, при зустрічі організму з *Corynebacterium diphtheria* утворюються антитіла до дифтерії, при потрапленні в організм стрептококів – антитіла до стрептококу. Для цього необхідно 4-15 діб. Проте існує ще передня ланка захисту організму від чужорідних речовин та клітин. Якби антигени не потрапили в організм, відповідь реалізується через неспецифічні фактори захисту. Ці фактори діють вже через кілька хвилин. До них відносять:

1. Захисну функцію шкіри та слизових покривів, тобто дію нормальної мікрофлори організму.
2. Реакції запалення (судинно-клітинні реакції).
3. Фагоцитоз.
4. Утворення захисних речовин.

Найпростіший шлях уникнути інфікування – запобігти проникненню збудника в організм.

Захисні функції шкіри та слизових покривів пов'язані з антагоністичною діяльністю нормальної мікрофлори шкіри, до якої відносять білі стафілококи, мікрококи, зелені стрептококи, кисло-стійкі бактерії та ін.

Активність нормальної мікрофлори підвищують:

- Піт, який є поживним середовищем для бактерій;
- Кисла реакція шкіри, за рахунок виділення шкірного сала та поту (рН=3-6), що запобігає розмноженню патогенних мікроорганізмів;
- Постійне злущування ороговілого епітелію, що сприяє самоочищенню шкіри від патогенних мікроорганізмів;
- Температура та вологість, причому з їх підвищенням збільшується бактерицидність (здатність знищувати бактерії).

Слизові перепони менш стійкі порівняно з шкірою.

Крізь слизові перепони можуть проникати сальмонели, збудник туберкульозу, віруси грипу, кору, пневмококи. Ці мікроорганізми виділяють токсичні речовини, що порушують цілісність слизової оболонки. Дії токсинів сприяють переохолодження організму та подразнення шкідливими газами.

Епітелій слизових покривів чинить бактерицидність завдяки наступним факторам:

- Змиваючій дії секретів;
- Обгортанню бактерій слизом;
- Злущуванню бактерій разом із епітелієм;
- Вимиванню чужорідних агентів із сечею;
- Викиданню під час кашлю, чихання, блювоти.

Росту бактерій запобігають також кислотність шлункового соку (рН=3) та кислотність вагіни дорослої жінки (рН=4-4,5).

Запалення – складана захисна реакція організму на дію шкідливих агентів, що виробилась протягом тривалої еволюції та є комплексом тканинно-судинних змін. Це один з процесів, що лежить в основі багатьох захворювань, різних за своєю природою. Біологічне значення запалення, як імунного процесу: дати можливість лейкоцитам вийти з судин і мігрувати до місця потенційного проникнення інфекційних агентів.

Причини виникнення запалення можуть бути як зовнішніми (бактерії, їхні токсини, механічні травми, дія хімічних речовин тощо), так і внутрішніми (гематоми, відкладення солей, омертвіння тканин тощо). Також розрізняють гостре, підгостре та хронічне запалення. Гостре запалення зовнішніх покривів тіла виявляється почервонінням, набряком, підвищенням температури у місці запалення та порушенням функцій уражених тканин.

При хронічному запаленні, а також запаленні внутрішніх органів спостерігаються не всі ці ознаки. Запалення складається з судинної реакції, альтерації та проліферації. Судинна реакція полягає у короткочасному звуженні артеріол та капілярів, а потім їхньому посиленому розширенні та наповненні (судинна гіперемія). Такі судинні зміни обумовлюються накопиченням у місці запалення речовин, що впливають на тонус судинної стінки (ацетилхолін, гістамін, серотонін). Внаслідок підвищення проникності стінки судин, у тканини, що їх оточують виходить плазма та лейкоцити (ексудація). На характер ексудативного процесу впливає характер збудника. Ексудат може бути серозним (сироватка крові), фібринозним (підвищений вміст білка), гнійним, лейкоцитарним (підвищена кількість лейкоцитів), геморагічним (підвищена кількість еритроцитів). У залежності від ексудату розрізняють різні види запалення (серозне, гнійне тощо). Накопичення ексудату обумовлює набряк, внаслідок якого виникає стискування нервових закінчень та біль. У процесі судинних змін лейкоцити виходять з судинного русла та здійснюють фагоцитоз. Порушення кровообігу у місці запалення призводить до утворення

тромбів судин, та стисканню маленьких судин набряком, внаслідок чого затримується розповсюдження шкідливих агентів в організмі.

Альтерація – пошкодження тканин при запаленні обумовлюється зміною їхньої функції та структури, внаслідок чого розвиваються різноманітні процеси від дистрофії до некрозу. В такій тканині відбувається прискорений обмін речовин, зокрема надлишкове споживання глюкози при недостатчі кисню, що призводить до ацидозу. Порушення обміну речовин викликають підвищення осмотичного та онкотичного тиску.

На фоні ексудації та альтерації починається проліферація – розмноження клітин, найбільш виражене в кінцевих стадія процесу запалення. Потім починається регенерація тканин.

7

Якщо мікроорганізми проникли через шкірні покриви в організм, то в дію вступають два способи захисту:

1. Фагоцитоз, або «поїдання» клітинами.

2. Руйнування розчинними хімічними факторами за типом бактерицидних ферментів.

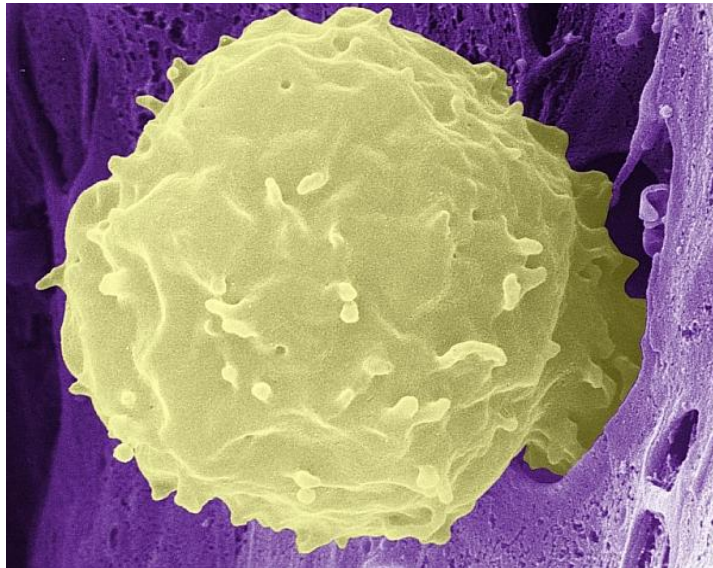
Фагоцитоз може здійснюватися гранулоцитами, моноцитами, тромбоцитами (за останніми дослідженнями, також лімфоцитами).

Роль професійних фагоцитів здійснюється двома типами клітин, які Мечников визначив як **мікро-** та **макрофаги**. До мікрофагів належить поліморфноядерні нейтрофіли. Назва зумовлена тим, що, в залежності від віку, ядро нейтрофілів набуває різної форми (молоді форми паличко ядерні, зрілі – сегментоядерні). Ці клітини мають спільного гемопоетичного стовбурового попередника і домінують серед інших лейкоцитів, досягаючи вмісту 65-70%.

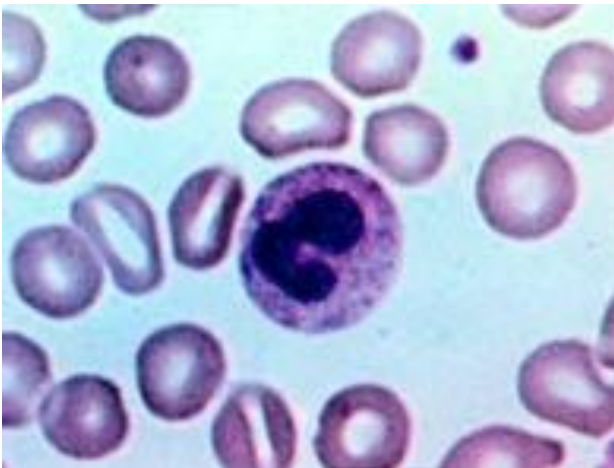
Нейтрофіл – це неподільна короткоживуча клітина з сегментованим ядром та набором гранул, які не забарвлюються такими барвниками, якими визначаються еозинофіли та базофіли. Відомо три типи гранул, характерних

16

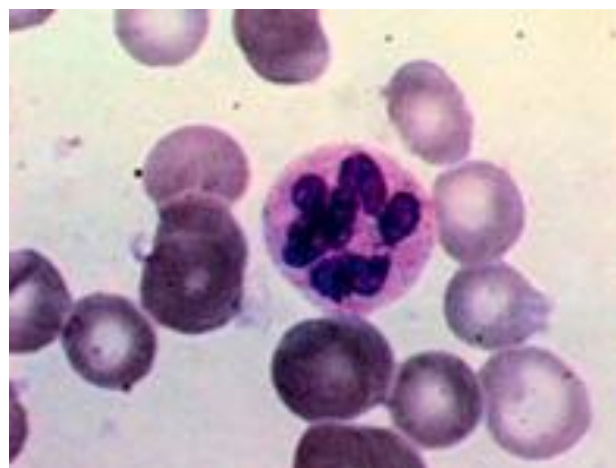
для нейтрофілів: первинні (що містять мієлопероксидазу, невелику кількість лізоциму та набір катіонних білків), вторинні («специфічні гранули», що містять лактоферин, лізоцим та білок, що зв'язує вітамін В₁₂), третинні гранули (схожі на звичайні лізосоми, містять кислі гідролази).



Загальний вигляд нейтрофіла



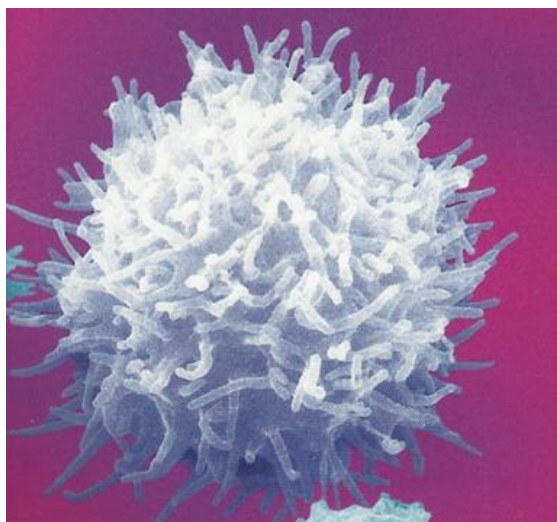
Паличкоядерний нейтрофіл



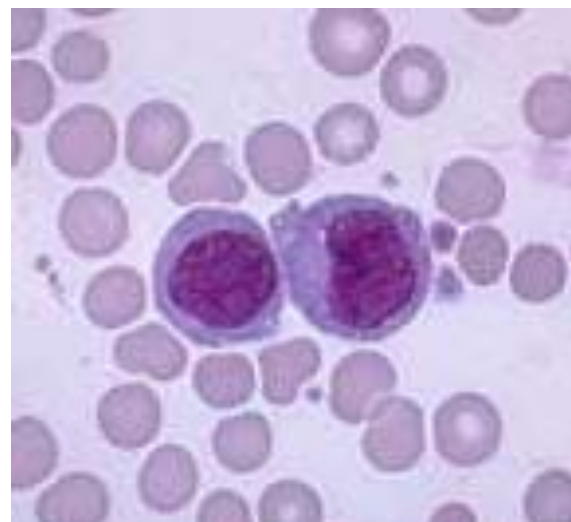
Сегментоядерний нейтрофіл

Нейтрофіли містять великі запаси глікогену, який може бути використаний в гліколізі і дозволяє цим клітинам існувати в анаеробних умовах.

Макрофаги – утворюються з промоноцитів кісткового мозку, які після диференціювання затримуються в тканинах у вигляді зрілих моноцитів. Так формується система мононуклеарних фагоцитів.



Загальний вигляд моноцита



Моноцити на мазку крові

Взагалі, моноцити – самі крупні клітини крові. Вони мають округлу форму з добре вираженою цитоплазмою, володіють амебоїдними рухами і самою високою фагоцитарною активністю. Вміст 6-8% від усіх лейкоцитів периферичної крові. Моноцити присутні всюди: в сполучних тканинах і навколо базальних мембран дрібних кровоносних судин. Особливо великий їх вміст в легенях (клітини Купфера). Крім того, макрофаги вистилають синусоїди селезінки і медулярні синуси лімфатичних вузлів, де їх завдання – відфільтрування чужорідних матеріалів. Зустрічаються макрофаги і в ниркових клубочках, гліальних клітинах мозку та остеобластах кісткових тканин.

Головна відмінність макрофагів від мікрофагів – це довгоживучі клітини з добре розвиненими мітохондріями і ендоплазматичними ретикулумами.

Головна функціональна відмінність: мікрофаги забезпечують захист від «вільних бактерій», макрофаги – від бактерій, вірусів і найпростіших, які здатні існувати також всередині клітини господаря.

В загальному, роль макрофага: **процесинг** (захоплення і перетравлення) мікроорганізмів і **презентація** імуногенного фрагменту у вигляді пептиду на своїй поверхні разом з молекулами гістосумісності.

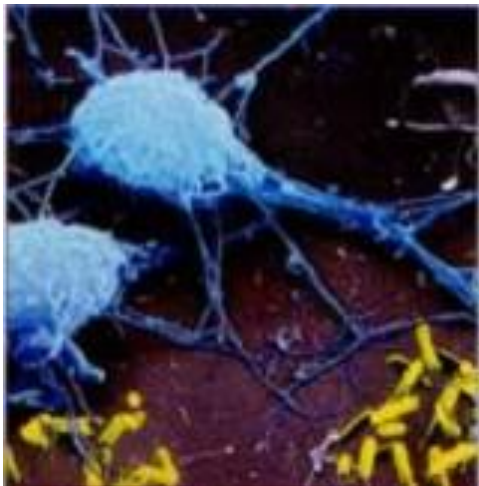
8

Щоб здійснився фагоцитоз, повинна відбуватися **адгезія** (прилипання) мікроорганізму до поверхні фагоцита. Це відбувається за рахунок примітивного механізму впізнавання, що базується на взаємодії вуглеводних залишків. Відбувається активація актин-міозинової скоротливої системи, утворюються псевдоподії, травні вакуолі, злиття гранул з фагосоною і виливання вмісту гранул у фагосому. Далі процес знищення чужорідних клітин іде за двома механізмами:

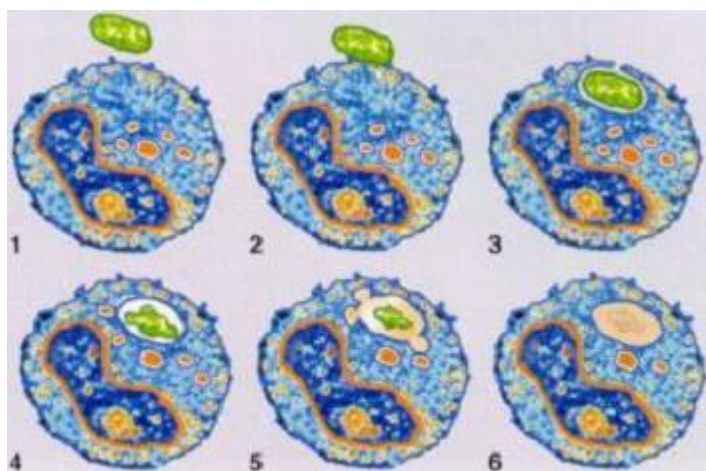
1. **Кисневозалежний** механізм має місце безпосередньо після поглинання бактерій фагоцитом. У ньому відбувається процес, що має назву метаболічного вибуху. У результаті бурхливого споживання кисню, проходить швидке окиснення глюкози, що супроводжується утворенням перекису водню, гідроксильних радикалів, супероксидних аніонів. Всі вони є потужними бактерицидними агентами. Крім того, сполучення перекису, мієлопероксидази та галоген-іонів створює систему галогенування, здатну знищити не лише бактерій, а й вірусів.

2. **Кисневозалежний** механізм. Протягом цієї фази бактерії, що були поглинуті фагоцитами, гинуть в анаеробних умовах. Процес відбувається при зменшенні рН фагоциту до 4. Таке кисневе середовище є оптимумом дії ряду лізосомальних ферментів: лізоцим, пероксидаза, естерази, карбогідрази та інші. Ці ферменти викликають деструкцію бактерій. Оскільки фагоцитоз відбувається у вакуолях, то органели нейтрофілу не перетравлюються під дією власних ферментів. Крім ферментів, кисневонезалежну бактерицидність обумовлюють гранулярні катіонні білки та **лактоферин**. Катіонні білки руйнують мембрану бактерії за рахунок протейназного ефекту та безпосередньо

приєднуючись до поверхні мікроорганізму. Низьке рН, лізоцим та лактоферин володіють не тільки бактерицидною, а й бактеріостатичною дією.



Макрофаг фагоцитуює кишкові палички



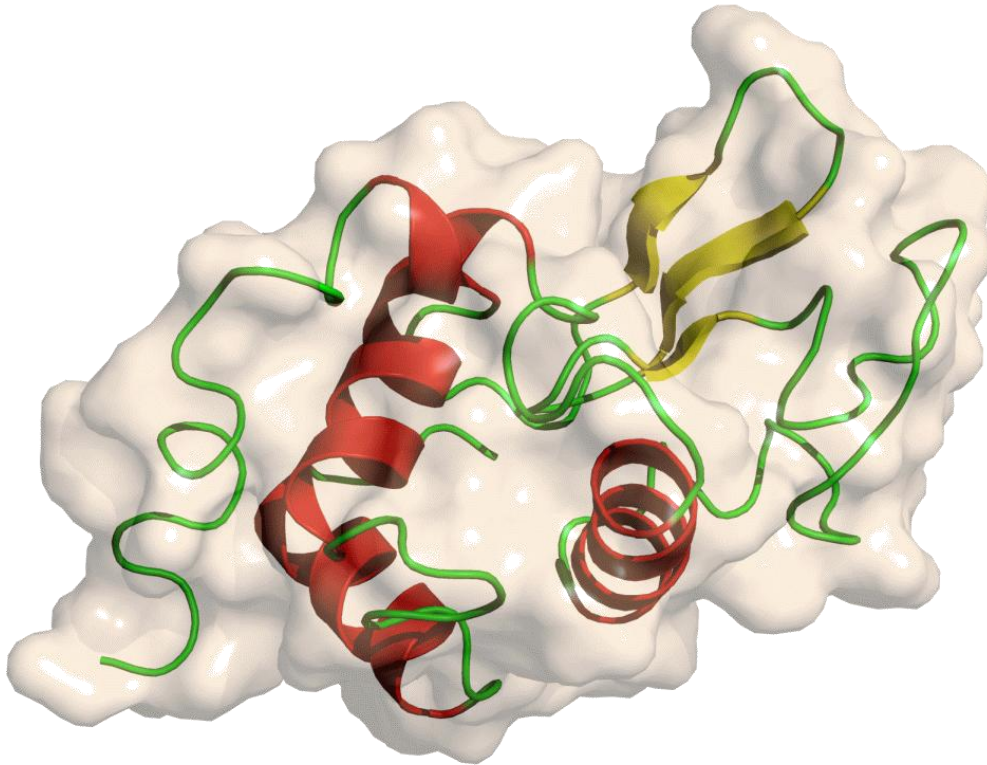
Етапи фагоцитозу: 1 – зближення; 2- адгезія; 3-4 – формування фагосоми; 4 – формування фаголізосоми; 5 – процес руйнування захопленого компонента.

9

Лізоцим – фермент класу гідролаз, у великих кількостях міститься в білку курячого яйця. У людини міститься в слині, слюзах на слизових оболонках. Перший фермент із встановленою третинною структурою. У молоці, скелетних м'язах, мозку, навколоплідних водах концентрація дещо нижча. Основна маса лізоциму продукується тканинними макрофагами та

молодими нейтрофілами. Макрофаги синтезують та секретують лізоцим постійно і інтенсивно, проте, його найбільший вміст у гранулах нейтрофілів. Звільняється він з них лише при руйнуванні. Щоденна продукція лізоциму здорової людини ≈ 150 мг. За годину катаболізується $3/4$ лізоцима, що міститься в плазмі. Саме у плазмі рівень лізоциму підтримується на стабільному рівні, в інших тканинах постійно міняється.

Крім бактерицидної і бактеріостатичної дії, лізоцим стимулює синтез антитіл. В умовах *in vitro* встановлено, що самотійно лізису бактерій лізоцим не викликає, проте стимулює дію гідролітичних ферментів. Лізоцим вважається одним з головних гуморальних факторів неспецифічної резистентності.



Тривимірна структура лізоциму

Отже, організм знаходиться під захистом фагоцитуючих клітин. Проте, вони абсолютно неефективні, якщо не відбувається трьох подій:

1. Зближення фагоциту і мікроорганізму.
2. Адгезії мікроорганізму та поверхні фагоцита.

3. Активації мембрани фагоцита, що призводить до поглинання мікроорганізму

Ряд бактерій дійсно продукує хімічні сполуки, що направлено притягують лейкоцити. Деякі бактерії прикріплюються до поверхні фагоцита, деякі спонтанно дають мембрані фагоцита сигнал ініціації. Проте, патогенні мікроорганізми постійно зазнають мутацій і здатні настільки видозмінюватися, що виходять з-під контролю захисних організмів. Для вирішення цього організм створив систему комплементу.

Комплемент – складний комплекс білків (≈ 20), які формують швидку, багатократно посилену відповідь на первинний сигнал у вигляді каскадного ланцюгового процесу. Причому, продукт однієї реакції є каталізатором для послідуєчої.

Ряд компонентів системи комплементу позначається символом «С» і цифрою, яка відповідає хронології відкриття, а не послідовності реакцій. Маленькі символи означають розміри продуктів розщеплення (а – менший продукт, b – більший). Активні комплекси позначаються рискою над ним. Найбільша концентрація в сироватці крові компоненту С3 (1,2 мг/мл)

Механізм діяльності комплементу наступний:

У плазмі крові постійно присутній активний комплекс С3Вb. Він приєднується до мікроорганізму (причому, сам мікроорганізм стимулює цей процес, що називається альтернативний шлях активації комплементу) і активує розщеплення великої кількості С3. Утворюється два фрагменти – 3a виділяється в середовище, а 3b зв'язується з мікроорганізмом. Це дає початок другому етапу – утворення С5a та МАК (мембраноатакуючий комплекс). МАК проникає в ліпідний шар мембрани клітини-мішені і робить її проникною для електролітів та води (утворює трансмембранний канал). За рахунок надходження Na^+ та води відбувається лізис клітини. Цим міг би й закінчитись процес, проте, багато мікроорганізмів володіють стійкістю до дії МАК.

C3a та C5a – невеликі пептиди, що продовжують процес, вони діють безпосередньо на фагоцити, особливо нейтрофіли, викликаючи різку активацію дихання та, як анафілатоксини, викид медіаторів з опасистих клітин та базофілів. Це дає початок гострої запальної реакції, і, як наслідок масовому виходу нейтрофілів із судин. Крім того, C5a володіє хемотаксичною дією для нейтрофілів (хемотаксис – рух фагоцитів до осередку патогенних чинників).

Фагоцитуючі клітини мають рецептори для C3b, якими масово покриті мікроорганізми, внаслідок чого відбувається адгезія. C3a та C5a різко активують клітинне дихання, що дає початок кисневозалежній бактерицидності ферментів.

Таким чином, весь процес фагоцитозу проходить за кілька стадій:

1. Підвищення проникності судин та вихід фагоцитів.
2. Опсонізація – адсорбція на поверхні бактеріальних клітин чи інших антигенів опсонінів – біологічно активних речовин плазми, зокрема C3 компоненту комплементу.
3. Хемотаксис – рух нейтрофілів до об'єкту фагоцитозу
4. Бактерицидна дія нейтрофілів

11

Серед розчинних (гуморальних факторів) неспецифічного захисту, крім лізоциму, варто згадати білки гострої фази та інтерферони.

Білки гострої фази – деякі білки плазми, найвідоміші з яких С-реактивний білок (CRP), що здатен за участю кальцію зв'язуватись з деякими мікроорганізмами, у яких склад мембрани входить **фосфорилхолін**. Утворений комплекс активує систему комплементу за класичним, а не за альтернативним шляхом і призводить до зв'язування C3b з поверхнею мікроорганізмів, чим готується фагоцитоз.

Інтерферони – ряд антивірусних агентів широкого спектру дії риб, птахів, рептилій та ссавців.

α -інтерферони продукуються лейкоцитами, β – фібробластами, γ – Т-лімфоцитами.

При вірусній інфекції клітини синтезують інтерферон і декретують його в міжклітинний простір, де він зв'язується зі специфічними рецепторами на сусідніх незаражених клітинах. Кінцевий результат полягає в утворенні бар'єру навколо вірусної інфекції з неінфікованих клітин, щоб запобігти його поширенню. Крім того, за сучасними уявленнями, α -інтерферони та β -інтерферони блокують процеси транскрипції і трансляції вірусного генетичного матеріалу, а γ -інтерферони здатні модулювати активність інших імунних клітин.

12

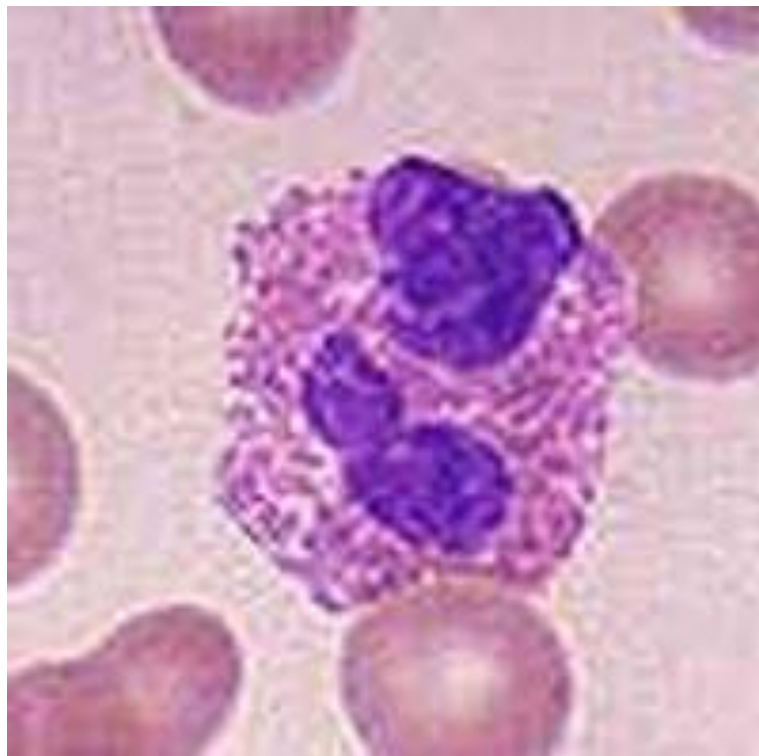
Віруси здатні розмножуватися лише в клітинах інфікованого господаря, тому бажано знищити заражені клітини до того, доки вірус почне розмножуватися. Цим займаються **природні кілери**.

ПК – великі зернисті лімфоцити, що впізнають певні структури високомолекулярних глікопротеїдів, котрі експресуються на мембрані інфікованих вірусом клітин. Впізнавання і зближення відбувається завдяки рецепторам ПК. ПК активуються, викидається вміст гранул у міжклітинний простір. Основна складова – **цитолізін**, має структурну схожість з С9 компонентом комплементу, і, подібно МАК, може утворювати трансмембранну пору, що призводить до лізису. Крім того, гранули ПК містять дві протеїнази, що функціонують як цитотоксичні фактори та речовину-захисник від автолізису.

Крупні паразити (гельмінти) – фізично не можуть бути фагоцитовані. Боротьбу з ними забезпечують еозинофіли, поліморфноядерні лейкоцити, вміст яких 2-4% від усіх лейкоцитів крові. Забарвлюються кислими фарбами, здійснюють позаклітинне знищення. Гранули ядра містять **головний основний білок** (MBP – major basic protein), у гранулах матриксу є **катионні білки** та

пероксидаза. Один з білків гранул може «протикати» мембрану за принципом С9, МАК чи цитолізину ПК. Еозинофіли мають поверхневі рецептори для С3b, при активації проходить особливо потужне посилення дихання, що супроводжуються утворенням активних кисневих метаболітів.

Гельмінти активують комплемент за альтернативним шляхом, і хоча вони досить стійкі до С9, звільнений головний основний білок та катіонні білки пошкоджують мембрану паразита.



Еозинофіл на мазку крові

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

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.

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 — $0,0025 \text{ мм}^2$ ($25 \times 10^{-4} \text{ мм}^2$).

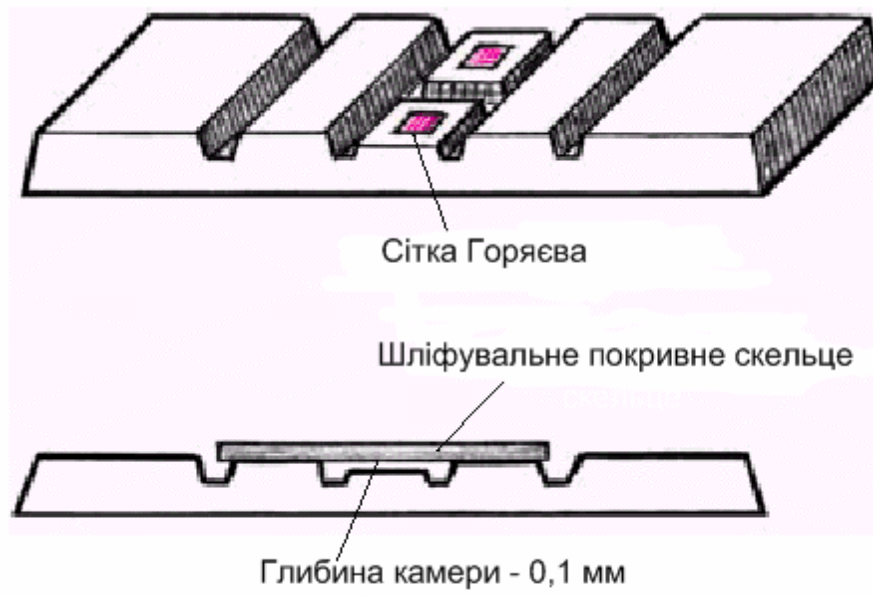


Рис. 2. Камера Горяєва

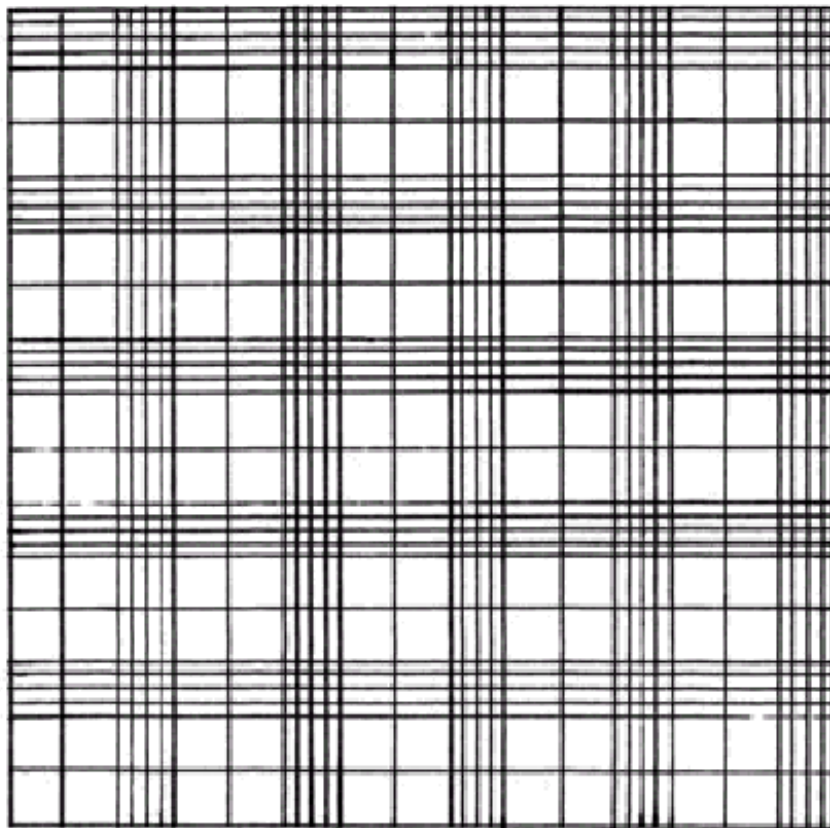


Рис. 3. Сітка Горяєва для підрахунку формених елементів

Якщо враховувати глибину камери, рівну 0,1 мм, то об'єм одного малого квадрата сітки Горяєва складе $2,5 \times 10^{-4}$ 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 ватяною 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 ватяною 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 притискають до бічних пластин камери і злегка пересувають його вгору і вниз

до тих пір, поки не з'являться веселкові смуги («ньютонів кільця»). Лише у цьому випадку витримується належний об'єм камери.

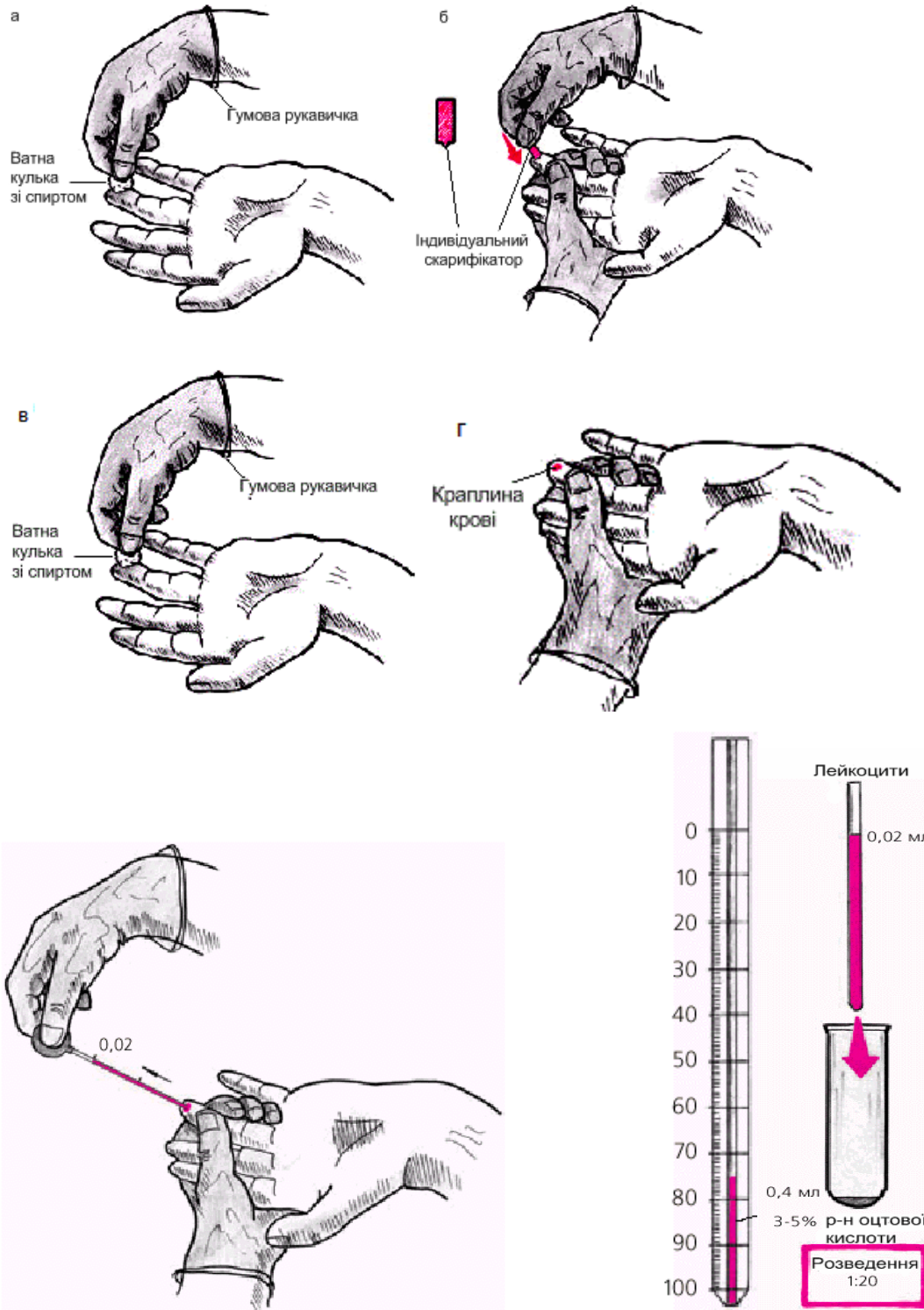


Рис. 4. Техніка забору крові для дослідження (а, б, в, г, д — послідовні етапи)

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'єктив 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 ($4,0 \times 10^{-3}$ 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 $6,5 \cdot 10^3 / \text{мкл}$.

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 $4,0 \cdot 10^9$ /л – $9,6 \cdot 10^9$ /л. Відхилення від даного показника проявляються у вигляді лейкоцитозу чи лейкопенії.

Лейкоцитоз – підвищення загальної кількості лейкоцитів у крові.
Лейкопенія – зменшення числа лейкоцитів нижче $4,0 \cdot 10^9$ /л, обумовлене пригніченням лейкоцитозу у кровотворних органах.

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.

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.

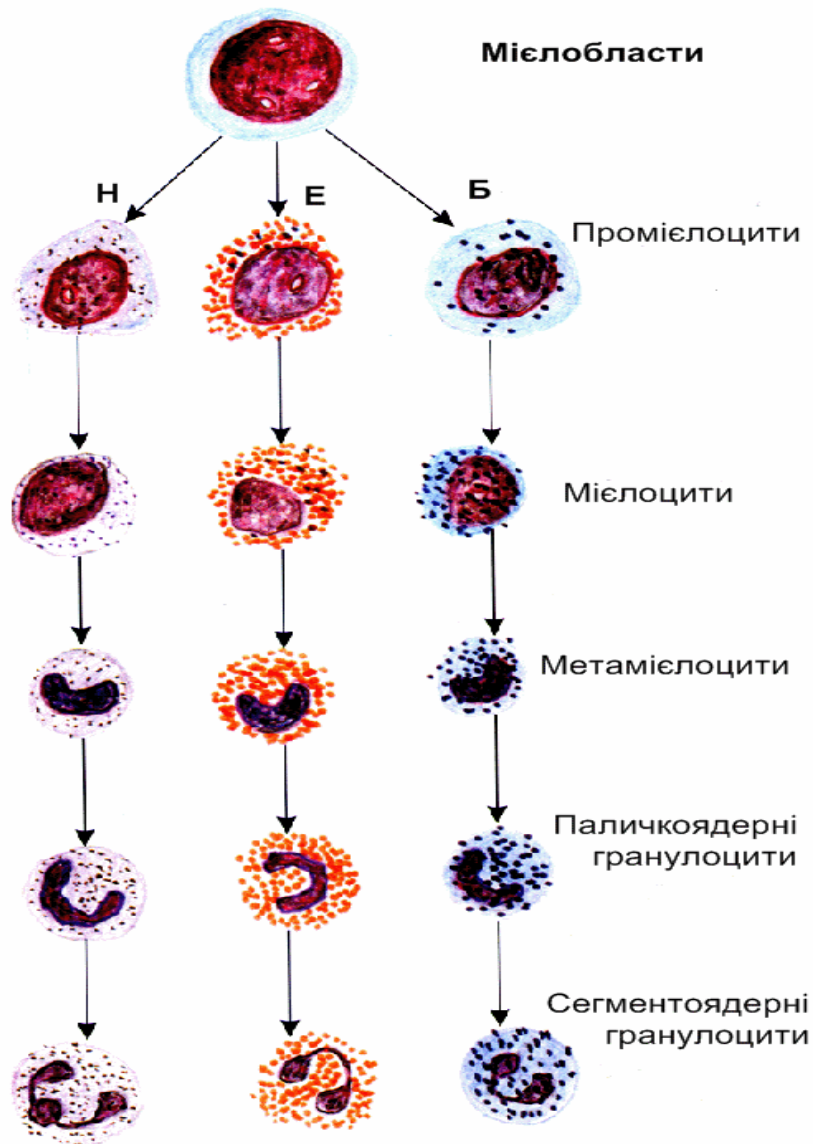


Рис. 5. Морфологія клітин гранулоцитарного паростка кровотворення (Схема). Пояснення у тексті. Н - нейтрофіли, Е - еозинофіли, Б - базофіли

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.

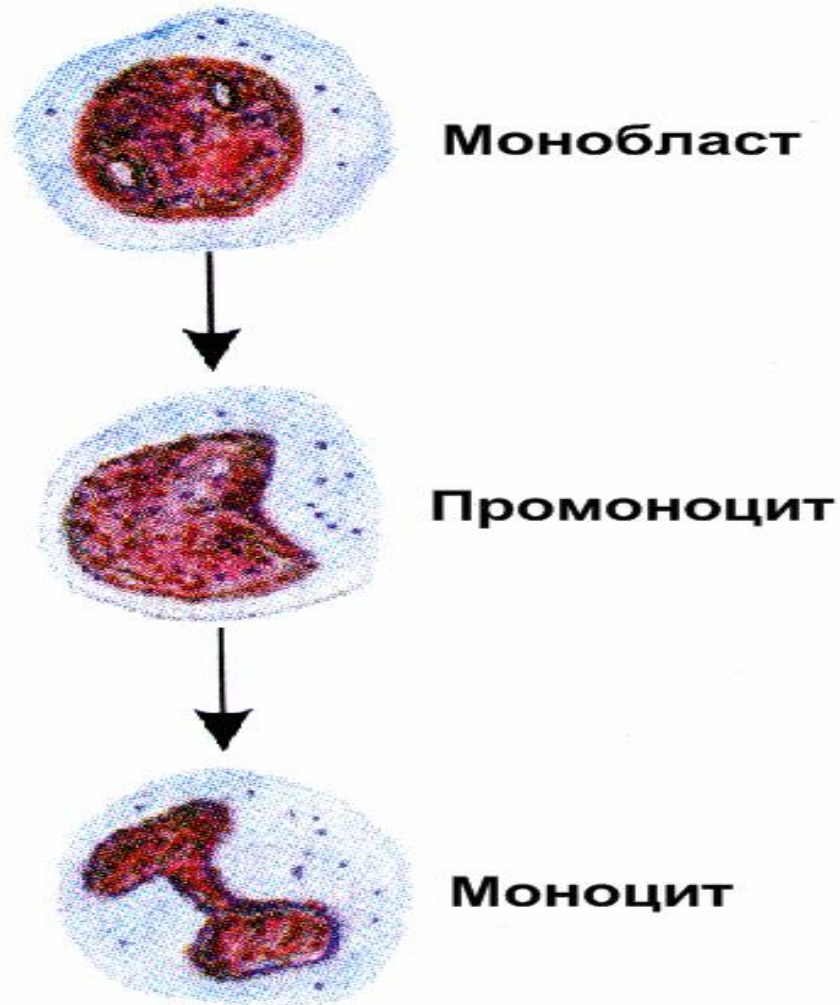
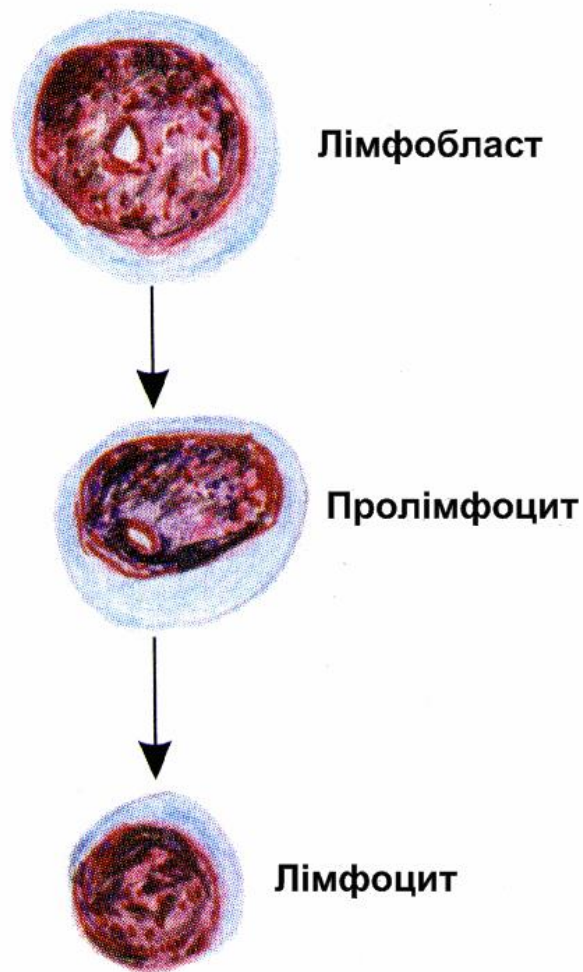


Рис. 6. Морфологія клітин моноцитарного паростка кровоторення (Схема). Пояснення у тексті.

Для клітин **лімфоїдного** ряду кровоторення (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. Сегментоядерні 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.

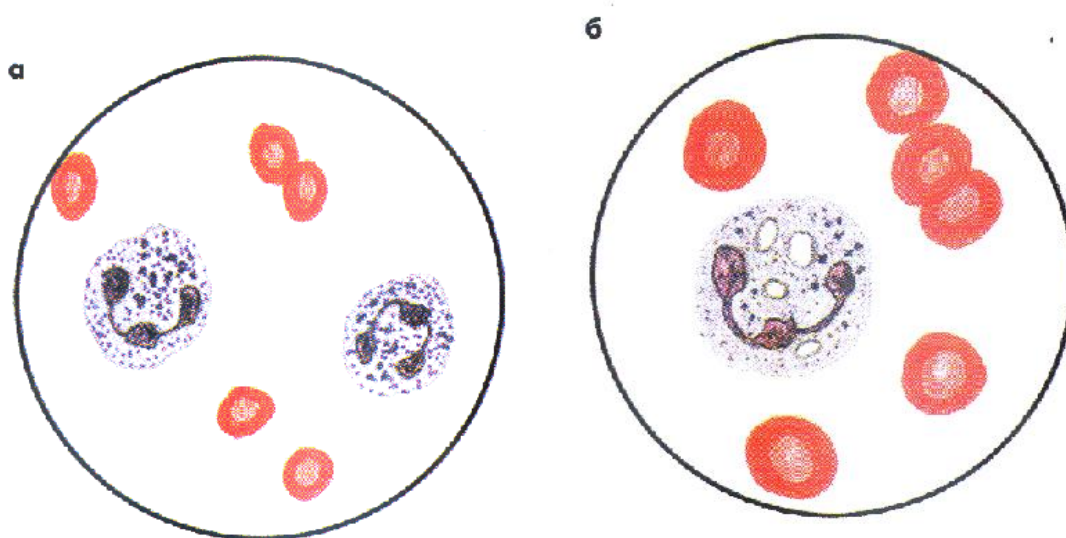


Рис. 8. Дегенеративні форми нейтрофілів: а - токсична зернистість нейтрофілів, б - нейтрофіли з вакуолізацією цитоплазми

2. Гіперсегментовані нейтрофіли, ядро яких складається з 5 і більше сегментів (рис. 9), зустрічаються при V_{12} -фолієводефіцитній анемії, лейкозі, а також при деяких інфекціях і гнійно-запальних захворюваннях, відображаючи так званий ядерний зсув нейтрофілів управо.

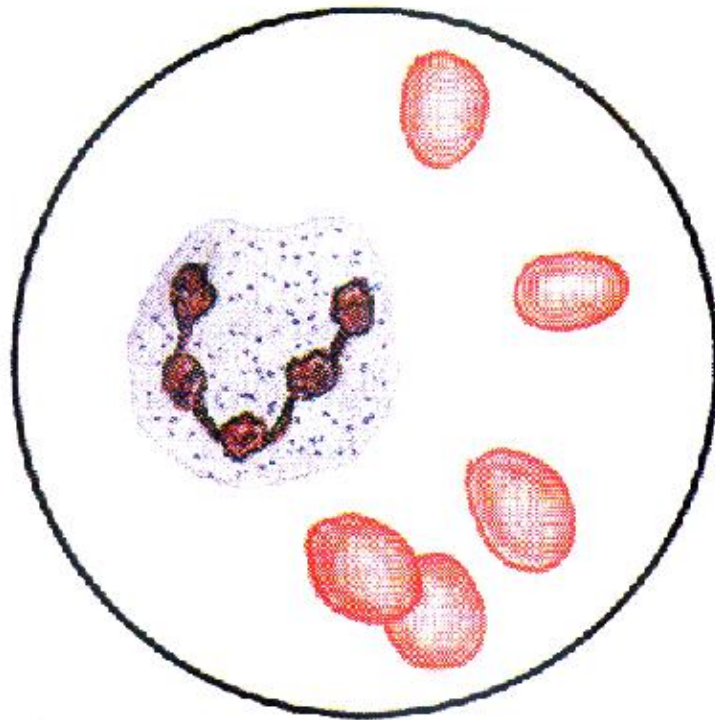


Рис. 9. Гіперсегментований нейтрофіл

3. Дегенеративні зміни лімфоцитів у вигляді пікнотично зміненого ядра, що інколи має дводольну будову, і слабого 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 еозинметиленового 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.



Рис. 10. Виготовлення мазка крові

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.

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 відтитрують, 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 (рис. 11).

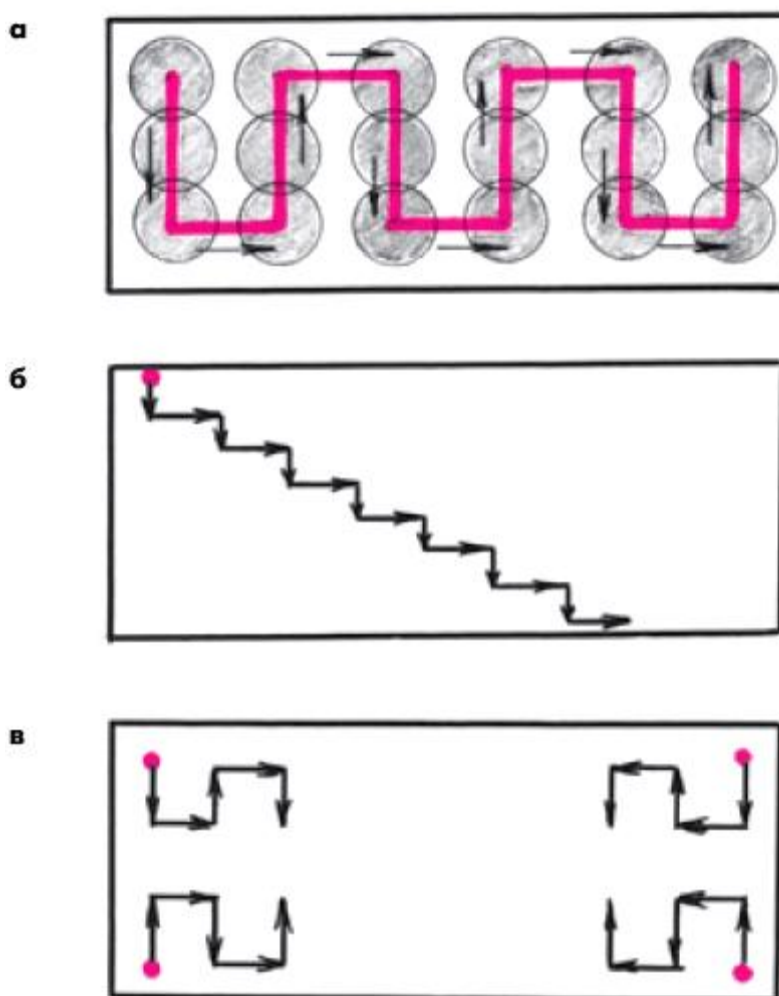


Рис. 11. Способи мікроскопії (а, б, в) мазків крові

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.

Інтерпретація результатів

Таблиця.1

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

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 популяції на 100 знайдених при мікроскопії лейкоцитів. Для визначення

загальної (абсолютної) кількості клітин їх відсоток перемножують на загальне число лейкоцитів і ділять на 100.

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 відносно 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.

Тема: Гуморальний специфічний імунітет

Зміст:

1. Необхідність специфічного імунітету.
2. Антитіла, їх складові, властивості та функції.
3. Закономірності взаємодії антигену з антитілом. Комплементарність.
4. Структурні компоненти молекули антитіла.
5. Поняття ізотипів, алаотипів, ідіотипів.
6. Класи та підкласи імуноглобулінів людини.

1

Неспецифічний імунітет має свої недоліки:

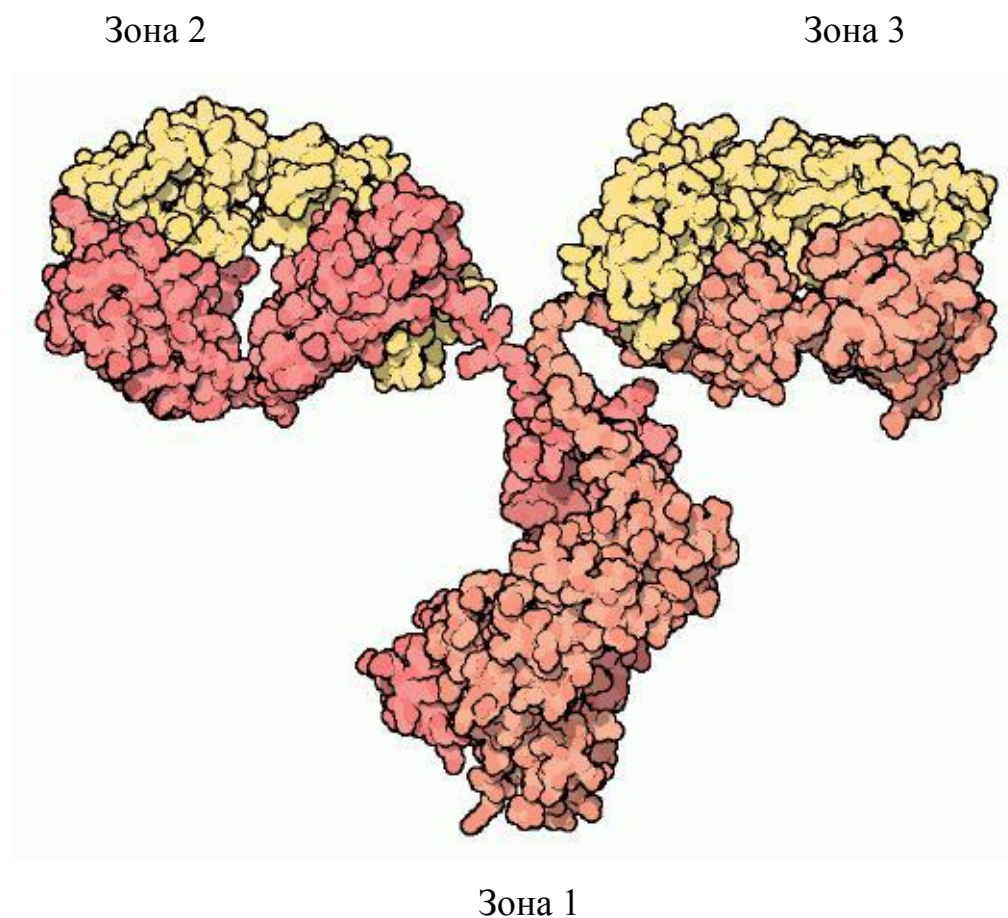
1. При потраплянні антигену в організм діють відразу всі фактори, що може мати побічні ефекти;
2. Не має імунологічної пам'яті;
3. Не пристосовуються до змін збудника. Зокрема, патогенні мікроорганізми володіють великими можливостями міняти стратегію завдяки мутації, що дозволяє їм уникати вроджених механізмів захисту людини. Наприклад більшість «успішних» популяцій фіксують компонент комплементу С3b, проте їм, завдяки модифікаціям, вдається повністю уникнути активації комплементу. Тому виникла необхідність виробляти механізми захисту від кожного конкретного мікроорганізму, як би багато їх не було. Тобто, існувала необхідність великої кількості компонентів імунного захисту. Вирішенням такої проблеми стали антитіла.

2

Антитіла – білки, синтез яких стимулюється потраплянням в організм антигенів певної видової специфічності. Вони здатні не лише активувати систему комплементу і стимулювати фагоцитуючі клітини, але й зв'язатися з мікрофагами. Відповідно, молекула антитіла має три основні функціональні області:

1 – вступає в контакт з комплементом і фагоцитами (зона біологічних функцій)

2,3 – зв'язуються з конкретним антигеном мікроорганізму (зони функцій зовнішнього розпізнавання).



Об'ємна модель молекули антитіла

Антитіла виробляються лімфоцитами. Це невеликі клітини з темним ядром, що зумовлено конденсацією хроматину і порівняно невеликою кількістю цитоплазми, що містить розрізнені мітохондрії.

Центральну роль малих лімфоцитів в утворенні антитіл встановив Гованс. У тварин зі зменшеним запасом лімфоцитів різко знижувалась здатність виробляти антитіла у відповідь на введення мікроорганізмів. При введенні

лімфоцитів від іншої тварини імунна відповідь поновлювалась. Відведення робилось через фістулу з грудного протоку. Якщо клітини з грудного протоку іншої тварини перед введенням проінкубувати протягом доби, при температурі 37°C, живими залишаються лише малі лімфоцити, великі й середні клітини гинуть. Але здатність виробляти антитіла при цьому не втрачається. Малі лімфоцити можна попередньо помітити тимідином. Перенесені реципієнту, саме вони розвиваються в плазматичні клітини і, таким чином, саме вони містять і секретують антитіла.

Спочатку вважалось, що антитіла утворюються з вихідних пластичних молекул господаря, набуваючи відповідної форми, і використовуючи антиген як матрицю. Зараз доведено, що антитіла формуються ще до появи антигену і антиген сам «відбирає» для себе антитіла.

Механізм: кожен В-лімфоцит, що диференціюється в кістковому мозку, запрограмований на утворення антитіл, що експресуються на поверхневій мембрані лімфоцита і функціонують як рецептори ($=10^5$ молекул на одному лімфоциті).

При проникненні антигену його зустрічає «армія» лімфоцитів, що несуть антитіла з ділянками розпізнавання. Лімфоцити, що зв'язали антиген, отримують пусковий сингал і диференціюються у плазматичні клітини. Ці клітини будуть продукувати антитіла, ідентичні оригіналу, тобто такфі, що будуть гарно зв'язуватись з антигеном.

Організм здатний синтезувати мільйони різноманітних молекул антитіл. Такої кількості лімфоцитів бути не може, щоб повністю забезпечити імунну відповідь. Тому лімфоцити, сенсibiliзовані антигеном, послідовно проходить кілька стадій проліферації і формують великий клон плазматичних клітин. Ці клітини синтезують антитіла лише заданої специфічності .

Важливість проліферації доводить те, що антимітотичні препарати повністю подавляють вироблення антитіл у відповідь на антигенний стимул.

Проліферуючому клону необхідний час для утворення достатньої кількості клітин. Тому необхідно кілька днів після первинного контакту з антигеном щоб в сироватці виявились антитіла.

Таким чином, основні властивості і функції антитіл:

1. Антитіла продукуються плазматичними клітинами, що утворилися в результаті проліферації активованих В-лімфоцитів.

2. Антитіла є глобулярною фракцією білків сироватки крові, γ -глобулінами (узагальнена назва - імуноглобуліни).

3. Антитіла виконують функцію розпізнавання та аглютинації з антигеном.

2. Антитіла виконують функцію опсонізації - представлення нейтрофілам та макрофагам антигену і цим посилення їх фагоцитарії активності.

3. Антитіла виконують функцію лізису деяких антигенів, проти яких вони виникли. Це відбувається лише в присутності комплексу.

4. Антитіла виконують функцію цитотоксичності - здатні за допомогою токсинів вбивати живі клітини у присутності компонента.

5. Антитіла ініціюють класичний шлях активації комплексу, коли стимулом для активації є комплекс антиген-антитіло.

3

У більшості біологічних систем, таких як гормони і рецептори, ферменти і субстрати, розпізнавання проходить завдяки досить тонкій структурі комплементарності. Це дає можливість лігандам наблизитись один до одного на відстань, коли міжмолекулярні взаємодії стають досить сильними. У кожного антитіла повинна бути розпізнаюча область, за формою комплементарна якому-небудь мікроорганізму, з яким це антитіло могло б досить тісно зв'язуватись.

Як правило, область молекули антитіла, що відповідає за біологічні функції, залишається константною, а для кожного з сотень тисяч мікроорганізмів необхідна специфічна розпізнаюча область.

Таким чином, організм людини повинен мати мільйони антитіл з різними розпізнаючими областями.

Одна молекула антитіла, що утворила комплекс з мікроорганізмом, не може викликати перехресного зв'язування рецепторів антитіл на поверхні фагоцита, що є необхідною умовою його активації. Існує специфічний термодинамічний закон **«посилюючого ефекту полівалентності»**. Він проявляється в тому, що три молекули антитіла зв'язані з поверхнею бактерії і розміщені на ній близько одна до одної, притягуються до макрофага у 1000 разів сильніше, ніж одна молекула антитіла.

Існує кілька основних закономірностей взаємодії антигенів з антитілами.

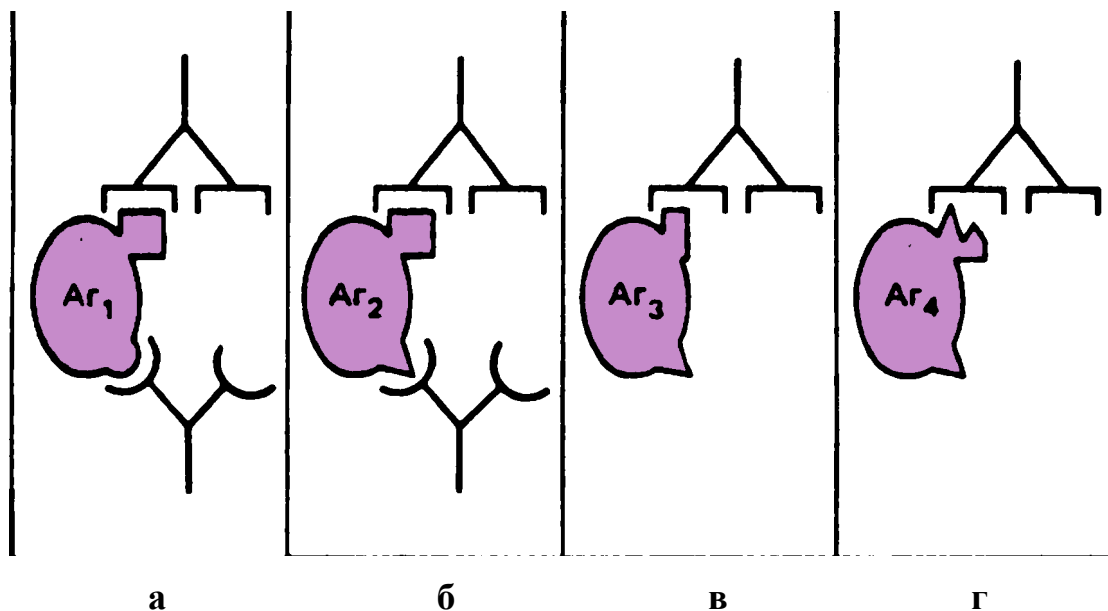
Частина гіперваріабельної області антитіла, що контактує з антигеном, називається **паратопом**, а частина антигену, що взаємодіє з паратопом, називається **епітопом**.

Якщо антиген – лінійний пептид або полісахарид, то у взаємодії з антитілом бере участь 5-6 амінокислотних залишків, якщо антиген – глобулярний білок, з антитілом контактує до 16 амінокислот.

Антитіла, що утворюються у відповідь на введення глобулярного білка, слабо взаємодіють з денатурованими препаратами того ж білка. Це пояснюється тим, що амінокислотні залишки, які знаходяться далеко одна від одної в первинній послідовності, часто зібрані в один епітоп у четвертинній структурі: Більшість антитіл розпізнають топографічні структури на поверхні білка, зумовлені конформацією нативної молекули.

Якщо схематично зобразити поверхню білкового антигену і відмітити на ній центри епітопів, на цій карті можна буде виявити кластери домінантних епітопів, тобто ділянки антигену, в яких особливо часто відбувається взаємодія з антитілами. Ці кластери називаються **антигенними детермінантами**. На

поверхні антигену може знаходитися кілька антигенних детермінант різної структури. МАТ, що реагують з однією детермінантою, не будуть реагувати з іншою, якщо тільки молекули антигену не мають осів симетрії.



Приклади взаємодії антигенів і антитіл: а – взаємодія двох антитіл різної специфічності з двома антигенними детермінантами; б – повноцінна взаємодія і перехресна реактивність; в - перехресна реактивність; г – немає взаємодії

Досліди показують, що для взаємодії з антигенами більш істотна загальна конфігурація, а не хімічна природа гаптена. У цій взаємодії не беруть участі ковалентні зв'язки.

Міцність зв'язування антигену з антитілом називається **афінністю**. Чим сильніший зв'язок тим вища афінність і антитіла називаються високоафінними. Міжмолекулярні сили зв'язування: електростатичні, водневі, гідрофобні, вандервальсові.

Термін «афінність» застосовується для оцінки зв'язування антитіла з однією антигенною детермінантою. Проте, як правило, взаємодія проходить з полівалентним антигеном і називається **авідністю**. Саме звідність характеризує імунну відповідь *in vivo*.

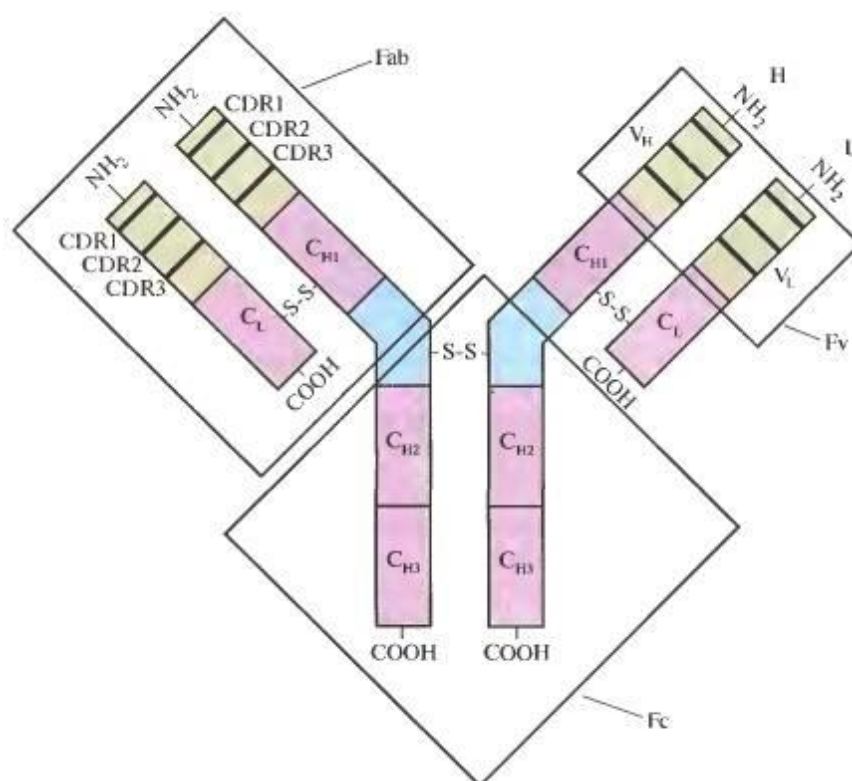
Специфічність взаємодії антитіла з антигеном не абсолютна. Антисироватка, отримана з одного антигену, може перехресно реагувати зі

спорідненими антигенами, що несуть одну або кілька ідентичних або схожих детермінант. Авідність до одних антигенів буде вищою, до інших нижчою. Якщо проявляється не абсолютна, а відносна специфічність, це називається **перехресною реактивністю**. Як правило, моноклональні антитіла, що направлені до одного епітопу, володіють більшою специфічністю, ніж сироватки. Проте, іноді буває навпаки: моноклональні антитіла зв'язуються зі стороннім антигенами з вищою специфічністю, ніж поліклональні із специфічною антисироваткою.

4

Молекула антитіла складається з двох важких і двох легких ланцюгів, зв'язаних між собою дисульфідними клітинами. Легкі і важкі ланцюги ідентичні. Певні ферменти можуть розщеплювати молекулу антитіла на специфічні фрагменти. Папаїн розщеплює на два однакових Fab-фрагменти (fragment antigen binding), кожен з яких має один антиген-зв'язуючий центр, і Fc-фрагмент (fragment crystallizable), нездатний зв'язувати антиген.

Пепсин розщеплює молекулу так, що дисульфідний зв'язок залишається біля Fab фрагментів, утворюючи бівалентну структуру $F(ab')_2$ та pFc' . Популяції антитіл у організмі надзвичайно гетерогенні, структурно різноманітні. Структурну різноманітність антитіл визначає певна послідовність амінокислот у антигензв'язуючій частині (функціональна розпізнавальна одиниця). При визначенні амінокислотних залишків було встановлено, що N-кінцеві ділянки як легких, так і важких ланцюгів мають різноманітні послідовності, в той час як інші ділянки відносно стабільні, і їх можна розділити на обмежене число доменів. Таким чином, існують **варіабельні** та **константні** області легких і важких ланцюгів. На трьох фрагментах легкого ланцюга і трьох важкого існують особливо різноманітні за амінокислотним складом області, що називаються **гіперваріабельними**.



Будова молекули антитіла

5

У залежності від будови константних областей важких ланцюгів виділяють класи антитіл, роль яких виконують імуноглобуліни. Класи поділяються на підкласи. У людини 5 класів імуноглобулінів IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Вони відрізняються не лише за амінокислотними послідовностями, але й за антигенною специфічністю.

Оскільки у сироватці крові здорової людини циркулюють імуноглобуліни, що містять всі структурні варіанти константних областей важких ланцюгів, їх позначають як **ізотипи**. Аналогічні константні області легких ланцюгів представлені двома ізотиповими формами – κ (капа) чи λ (лямбда). Оскільки, легкі ланцюги у молекулі антитіла ідентичні, імуноглобуліни містять або κ або

λ , але ніколи - обидва типи ланцюгів (крім молекул, створених штучно). Таким чином, відомо два типи молекул кожного з 5 класів (IgG κ та IgG λ і т. Д).

Для антитіл характерна також наявність алельних форм (кодуються алельними генами одного локусу). Такі форми називаються **аллотипами**. Аллотипні детермінанти є генетичними маркерами. Подібно до того, як еритроцити у генетичне різних індивідуалів можуть відрізнятися за системами антигенів груп крові АВ0, важкі ланцюги імуноглобулінів відрізняються за експресією аллотипових груп. Сукупність індивідуальних ознак, характерних для кожного антитіла, називається **ідіотипом**. Ідіотипні детермінанти локалізовані у варіабельній області антитіл і асоційовані з гіперваріабельними ділянками. Можна отримати антисороватку, специфічну до конкретного антитіла, незалежно від його ізотипів чи аллотипів.

У додаток до дисульфідних зв'язків, що сполучають важкі й легкі ланцюги, існують дисульфідні зв'язки всередині ланцюгів, за рахунок яких у ланцюгу утворюються петлі.

Розміщення гіперваріабельних послідовностей на кінцях варіабельних областей у місці розміщення антигензв'язуючого центру дозволяє зробити припущення, що саме вони впізнають антиген.

6

IgG домінує серед Ig у внутрішніх рідинах організму. Очевидно, при вторинній імунній відповіді синтезується в основному саме він. Здатний проникати через плацентарний бар'єр (інші не можуть), тому, йому належить головна роль у захисті від інфекцій протягом декількох перших тижнів життя. У новонароджених захищеність посилюється завдяки надходженню у кровотік IgG через слизову кишечника з молозивом. Легше, ніж інші Ig поширюється у тканинній рідині, де домінує серед антитіл інших ізотипів.

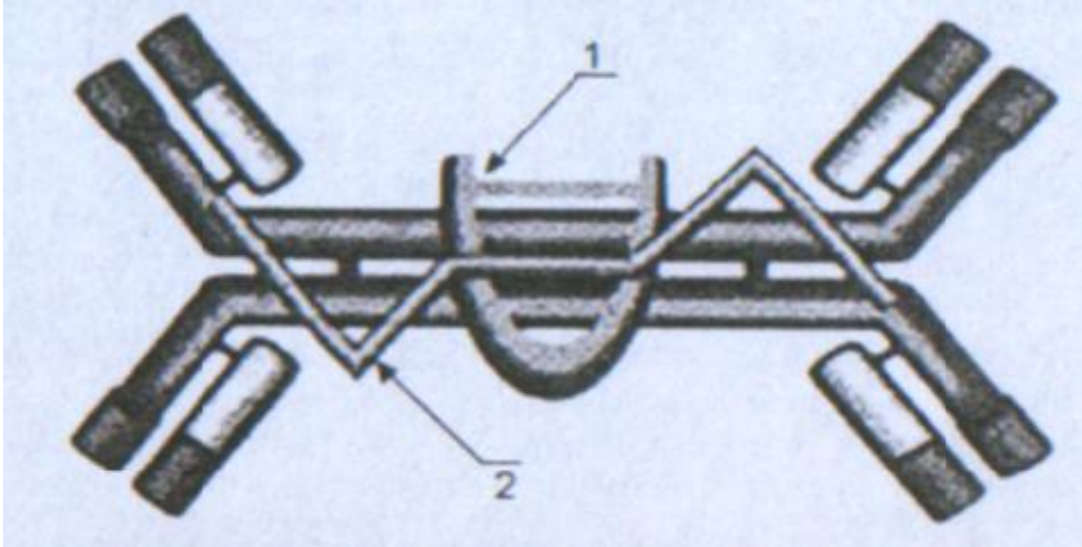
Має найбільше значення для нейтрагідації бактеріальних токсинів і зв'язуванні мікроорганізмів з метою опсонізації. Зв'язуючись з бактеріями, активує комплемент за класичним шляхом, викликає хемотаксис поліморфноядерних лейкоцитів та макрофагів.

Зв'язування комплексу антиген-IgG з лейкоцитом зумовлене наявністю на поверхні лейкоциту рецепторів для комплексу та Fc ділянок. IgG не здатний тісно зв'язуватися з опасистими клітинами і базофілами. Антигенний аналіз IgG виявив додаткові варіації - пікласи ізотипового характеру - IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4, що відрізняються між собою важкими ланцюгами. Ці ланцюги досить гомологічні, проте кожен має додаткові структурні особливості і дещо відмінні властивості.

Синтез IgG регулюється антигенною стимуляцією. При утриманні в стерильних умовах його рівень дуже низький, при потраплянні в нормальні умови швидко підвищується. Катаболізм перебуває у прямій залежності від тотальної концентрації IgG.

IgA міститься в основному у виділеннях слизових оболонок - слині, слізній рідині, носових виділеннях, поту, молозиві, секреті легень, сечостатевого шляхів, шлунково-кишкового тракту. Забезпечує захист слизових оболонок від мікроорганізмів при контакті з середовищем. Секреторний IgA існує у вигляді димера, захищеного від протеолізу утворенням комплексу з **секреторним компонентом** - білком, що є частиною рецептора клітини залозистого епітелію. IgA синтезується плазматичними клітинами, димеризується, приєднується до попередника секреторного компонента на поверхні клітини, що його синтезувала, комплекс надходить в середину клітини (шляхом ендцитозу), переміщується в цитоплазмі і потрапляє в рідини, що секретуються.

IgA, приєднуючись до мікроорганізмів, інгібує їх зв'язування з клітинами слизових оболонок, запобігає проникненню в тканини. Агрегати Ig сполучаються з нейтрофілами (можуть і не зв'язуватися), можуть запусити



**Димеризована молекула секреторного IgA: 1 – ланцюг J;
2 – секреторний компонент**

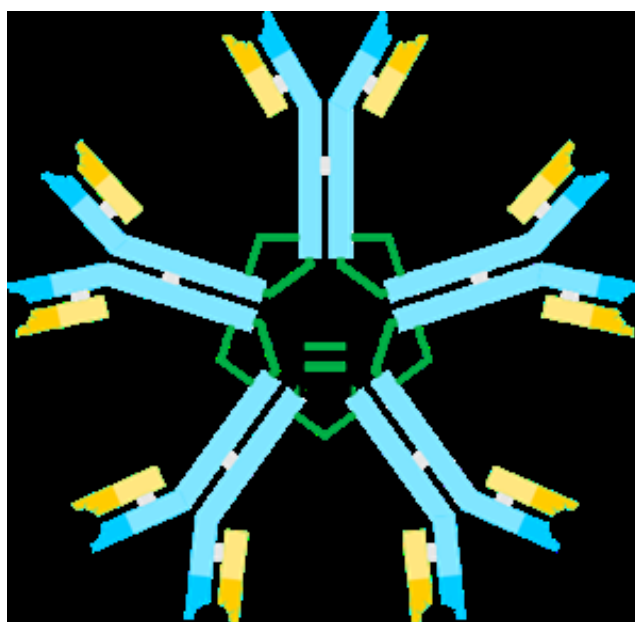
альтернативний шлях активації комплементу). З опасистими клітинами не зв'язується.

У сироватці крові представлений переважно мономером. Концентрація IgA у сироватці досить висока, біологічна функція не з'ясована до кінця.

Існує 2 підкласи, переважна більшість (80-90%) – IgA1. A2 незвичайний – у нього відсутні дисульфідні зв'язки між важкими і легкими ланцюгами.

IgM - полімер з 5 субодиниць, що має велику молекулярну масу, тому називається макроглобуліном. Електронна мікроскопія показує, що при зв'язуванні з поверхнею антигену молекула набуває крабовидної форми.

Теоретично така молекула може зв'язати 10 антигенів, але на практиці це спостерігається лише при взаємодії з невеликими гаптенами. Для крупних антигенів ефективна валентність падає до 5. Це зумовлюється недостатньою гнучкістю молекули та відносно низькою афінністю антигензв'язуючих центрів. Проте, завдяки полівалентності молекули IgM зв'язує антигени з численними епітопами зі значною авідністю. Тому IgM легко викликає аглютинацію і лизис клітин.



Макромолекула IgM

IgM з'являється у кров'яному руслі на ранній стадії відповіді на інфекцію, тому відіграє провідну роль при бактеріємії. Ізомаглютиніни (анти-А і анти-В) теж належать до IgM. Очевидно, у філогенезі IgM виник раніше ніж IgG. Володіє значною здатністю запускати класичний шлях активації комплементу. З макрофагами, нейтрофілами, еозинофілами і опасистими клітинами не зв'язуються.

Рецептори В-лімфоцитів, що упізнають антиген, як правило, є мономерним IgM.

IgD був виявлений при аналізі мієломного білка (антитіла, що продукуються лімфоїдною пухлиною), що не володіють антигенною специфічністю IgG, IgA чи IgM, хоча і зв'язуються з антитілами до легких ланцюгів.

Молекули IgD володіють підвищеною чутливістю до протеолітичного розщеплення, період піврозпаду у крові дуже короткий (2,8 доби). Майже весь IgD разом з IgM міститься на поверхні лімфоцитів крові і, очевидно, ці антигенні рецептори можуть взаємодіяти між собою, здійснюючи контроль за активацією і супресією лімфоцитів.

Концентрація IgE у сироватці крові невелика, лише невелика частина плазматичних клітин синтезує цей імуноглобулін. Взаємодіючи з антигенами, стимулює дегрануляцію опасистих клітин. Основна фізіологічна функція IgE - захист зовнішніх слизових оболонок шляхом локальної активації факторів плазми і ефекторних клітин завдяки індукції гострої запальної реакції.

Якщо інфекційні агенти проникають через бар'єр IgA, вони зв'язуються зі специфічними IgE на поверхні опасистих клітин, котрі отримують сигнал до звільнення вазоактивних агентів і хемотаксичних факторів, що викликає притік циркулюючих у крові IgG, комплементу, нейтрофілів та еозинофілів.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3

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).

ХІД РОБОТИ

В основі цього методу лежить метод Манчіні, який засновано на вимірюванні діаметру кільця преципітації, що утворюються при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в шарі агару, в якому завчасно диспергована моноспецифічна антисироватка. У стандартних умовах досліду 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 мікросприца 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 $+4^{\circ}\text{C}$, 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 кілець преципітації.

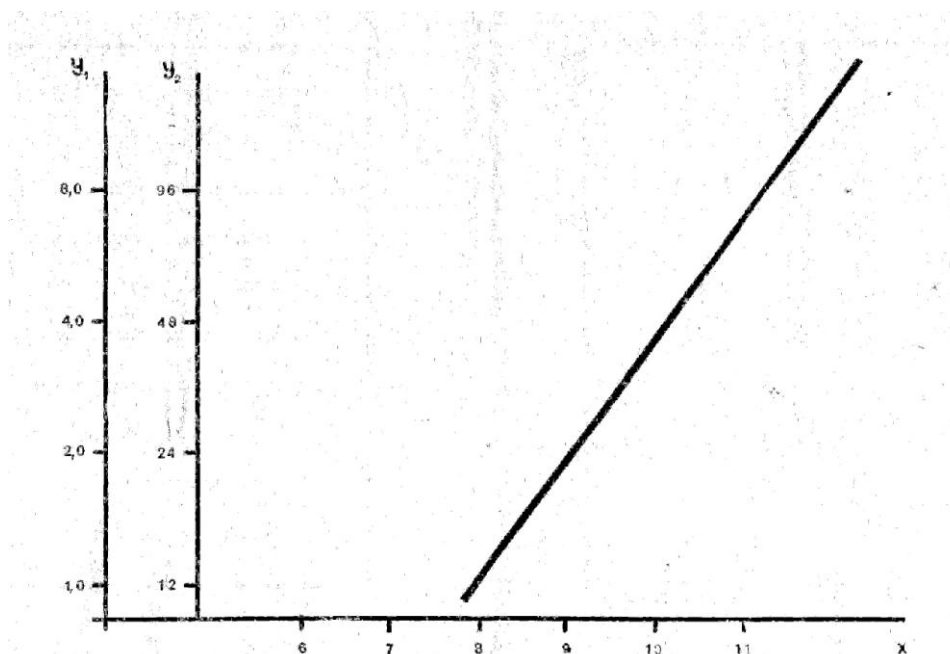


Рис. 12. Розрахунок кількості IgG у дослідній сироватці за калібрувальною кривою. Калібрувальна крива відображає залежність діаметра кільця від концентрації імуноглобуліну: y_1 – кількість IgG у мг/мл; y_2 – кількість IgG у МЕ/мл; x – діаметр кільця преципітації у мм.

На напівлогарифмічному папері по осі абсцис відкладають діаметри кілець 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.

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

Отримані результати порівнюються зі стандартними, робляться висновки.

Тема: Клітинний специфічний імунітет**Зміст**

- 1.Необхідність Т-клітинного імунітету.**
- 2. Головний комплекс гістосумісності людини.**
- 3.Активація хелперних і ефекторних Т-лімфоцитів.**
- 4. Рецептори Т-лімфоцитів. Кластери диференціювання.**
- 6. Загальна характеристика лімфоцитів.**
- 7. Субпопуляції В-лімфоцитів.**
- 8. Субпопуляції Т-лімфоцитів.**
- 9. Імунологічна пам'ять.**
- 10. Природні кілери.**

1

Багато мікроорганізмів живуть всередині клітин-господарів і є недосяжними для гуморальних антитіл. У той час, як реплікація вірусів обов'язково відбувається в заражених клітинах, мікобактерії та лейшманії можуть розмножуватися не лише в клітинах. Внутрішньоклітинне життя їх влаштовує тому, що при цьому забезпечується певний захист. Щоб справитися з цією проблемою, виникла ще одна відособлена імунна система, що базується на функціонуванні субпопуляції Т-лімфоцитів. Оскільки Т-лімфоцити повинні взаємодіяти з клітинами, що містять паразитів, вони впізнають антиген лише у тому випадку, коли він експресується на поверхні клітини. Відповідно, поверхневі рецептори Т-лімфоцитів упізнають антиген у комплексі з поверхневим маркером клітини організму. Ці клітинні маркери належать до найважливішої групи молекул, що називаються **ГОЛОВНИМ КОМПЛЕКСОМ ГІСТОСУМІСНОСТІ** (ГКГС, МНС – Major histocompatibility complex). Молекули ГКГС початково були ідентифіковані за їх здатністю викликати сильні

трансплантанційні реакції у різних представників одного виду. Пізніше з'ясувалася їх провідна роль у генетичній регуляції імунної відповіді.

Виділяють три класи молекул ГКГС: I, II і III, головну роль у імунних процесах відіграють перший та другий класи. Ці молекули є гетеродимерами, зв'язаними з мембраною клітини.

Різноманітність молекул імуноглобулінів досягається за рахунок мультигенної системи. У випадку ГКГС цей результат досягається поліморфною системою, що базується на великій кількості алелів (альтернативних варіантів гену в кожному локусі). ГКГС людини (HLA – Human Leucocyte A-system) найбільш поліморфна з генетичних систем людини. Їх клас I включає 3 класичні локуси: A, B, C; клас 2 - локус D, в якому виділяють 3 сублокуси - DR, DQ, DP. Кожен з локусів володіє великим поліморфізмом: зокрема, локус B має 49 варіантів. Усі чотири локуси розміщені в невеликому сегменті шостої хромосоми. У кожної людини є максимум 8 антигенів системи HLA, це називається «Full house» (повний дім антигенів). Серед народів різних рас є відмінності у частоті антигенів HLA.

Антигени ГКГС класу I експресуються практично на всіх клітинах, що мають ядро. Особливо велика їх кількість на лімфоїдних клітинах, менше у легенях та нирках, найменше у м'язах і мозку. Розміщення антигенів ГКГС класу II більш обмежене, вони асоційовані з B-клітинами, антигенпрезентуючими клітинами і макрофагами. Проте, при активації такими агентами, які інтерферон, вони виділяються на ендотелії капілярів і епітеліальних клітин. Антигени HLA розчинні і виявляються у молоці та сироватці крові.

2

Внутрішньоклітинні паразити здатні вижити всередині макрофагів, руйнуючи механізми знищення властиві цим клітинам. Проте, дані мікроорганізми не можуть завадити макрофагу переробити невеликі фрагменти

антигенів, зокрема, ті, що належать мікроорганізмам, котрі спонтанно загинули. При цьому дані фрагменти експресуються на поверхні макрофагу. Субпопуляція Т-лімфоцитів, що називається хелперами, завдяки рецепторам на своїй мембрані впізнає комбінацію з антигену та молекули ГКГС класу II, зв'язується з нею і продукує розчинні фактори - лімфокіни. До лімфокінів належать γ -інтерферон та інші речовини, що активують макрофаги: запускають пошкоджені раніше мікробіцидні механізми макрофагів і викликають загибель внутрішньоклітинних мікроорганізмів.

Знищення клітини, зараженої вірусом, бажано провести до того, доки почнеться реплікація вірусу. Тому у процесі еволюції виникла система цитотоксичних Т-лімфоцитів. Ці клітини володіють широкою специфічністю завдяки колоніальній експресії численних рецепторів, схожих на рецептори В-лімфоцитів, але не ідентичних їм. Кожен Т-цитотоксичний лімфоцит (ЦТЛ) упізнає антиген у комплексі з молекулою ГКГС класу I. У процесі розпізнавання відбувається тісний контакт ЦТЛ з мішенню і її знищення. Крім того, він продукує γ -інтерферон, що запобігає проникненню вірусу в сусідні клітини, особливо, якщо вірус слабо індукує дію інтерферонів α і β .

На відміну від В-лімфоцита, рецептор якого мономер, рецептор Т – лімфоцита – білковий гетеродимер.

Молекула рецептору нековалентно зв'язана з 2 молекулами комплексу T3 (CD3), утвореного кількома пептидними ланцюгами. Наявність CD3-антигену характеризує функціональну зрілість Т-лімфоцитів, він експресується на пізніх стадіях їх розвитку у тимусі.

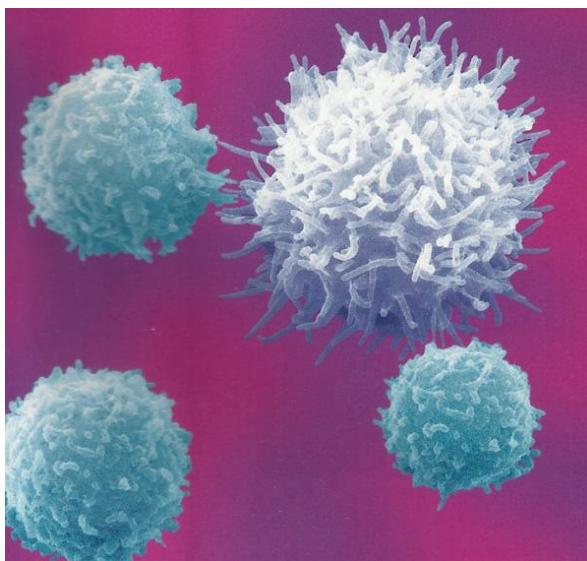
Комплексу T3 відводиться провідна роль у передачі сигналу від ланцюгів основного рецептора, що розпізнають антиген, всередину клітини.

Більшість мембранних білків лімфоцитів (рецепторів) були ідентифіковані за їх антигенними властивостями. Тобто, кожна Т-клітина має свій антигенний комплекс. Близько 40% охарактеризованих на цей час поверхневих антигенів імунокомпетентних клітин виконують роль рецепторів.

Всього існує більше 70 специфічних рецепторів, об'єднаних в одну велику групу рецепторів контактної взаємодії (cell contact interaction receptors) або молекул адгезії (cell adhesion molecules). Здебільшого, рецептори адгезії позначаються CD («кластери диференціювання»): CD3, CD4, CD8 і т. д.

3

Лімфоцити - спеціалізовані клітини, здатні відповідати на обмежену групу антигенів певної структури. Ця здатність існує ще до першого контакту імунної системи з даним антигеном і забезпечується наявністю на мембрані лімфоцита специфічних до антигену рецепторів. Походять лімфоцити від лімфоцитарних стовбурових клітин кісткового мозку.



Макрофаг у оточенні лімфоцитів

Лімфоцити беруть участь у всіх імунологічних реакціях і є головними ефекторами імунної відповіді.

Основні властивості лімфоцитів:

1. Рухливість.
2. Висока чутливість до дії фізичних і біологічних факторів внаслідок динамічності поверхневої мембрани.

3. Здатність диференціюватися під дією специфічного агенту.

Розрізняють малі, середні і великі лімфоцити. Малі мають діаметр близько 8 мкм. Це ніби контейнери ДНК. В ядрі у них містяться скупчення хроматину, цитоплазма навколо ядра – гомогенна, без рибосом.

Середні лімфоцити мають схожу структуру і діаметр 8-12 мкм.

Великі діаметром 12-14 мкм, ядро велике, світле, з зернами хроматину, у цитоплазмі багато рибосом.

Вміст лімфоцитів у лімфі 95% від усіх лейкоцитів. Близько 80% лімфоцитів людини і тварин є довгоживучими, існують протягом 100 – 200 днів, при цьому 10% з них за цей час не ділиться. Близько 10% лімфоцитів – короткоживучі, існують кілька днів. Протягом життя лімфоцити кілька разів можуть мігрувати у лімфоїдні тканини, а потім повертатися в русло крові і лімфи разом з новоутвореними клітинами.

Основними популяціями лімфоцитів є Т і В лімфоцити.

Зрілі Т-лімфоцити діаметром 6,3-6,5 мкм, містять щільне, інтенсивно забарвлене ядро, бліде окрашену майже відсутню цитоплазму, розміщену ексцентрично.

В-лімфоцити діаметром 8,4-8,65 мкм, ядро забарвлене не так інтенсивно, не містить ядерець.

4

В-лімфоцити є клітинною ланкою гуморального специфічного імунітету, антитілосинтезуючими клітинами та їх попередниками. Розрізняють три субпопуляції В-клітин, що відрізняються функціонально.

B_1 і B_2 після контакту з антигеном трансформуються у плазматичні клітини.

Клітини типу B_1 не вимагають допомоги Т-хелперів і синтезують антитіла класу М. У них на мембрані присутні рецептори IgM та IgD. Проте, у цих

клітин відсутні білки - продукти ГКГС, необхідні для кооперації з Т-лімфоцитами і рецептори для СЗ-компоненту комплементу.

Субпопуляції B_2 для запуску процесу синтезу антитіл необхідна допомога Т-клітин. Тобто, необхідні два сигнали: від рецепторів та від Т-лімфоцитів (у вигляді лімфокінів). Субпопуляція B_2 представлена клітинами з рецептором $IgM+IgG+IgD$ або $IgM+IgA+IgD$. Таким чином, клітини з рецептором IgM є попередниками для В-лімфоцитів, що будуть синтезувати IgG та IgA . Вважається що B_1 -клітини є філогенетично примітивними, оскільки виникли до появи у тварин тимусу. Наприклад, акули мають тільки B_1 клітини.

Поверхневим маркером В-лімфоцитів є кластер диференціювання CD72.

Субпопуляція B_3 синтезує IgE .

5

Популяція Т-лімфоцитів поділяється на ти основні субпопуляції - хелперні, супресорні і ефекторні (цитотоксичні або кілерні).

Т-хелпери - довгоживучі клітини, що взаємодіють з антигеном, асоційованим з молекулами гістосумісності класу II (локус D) допоміжних (антигенпрезентуючих) клітин (макрофаги, дендритні клітини селезінки, клітини Лангерганса). У результаті такої взаємодії макрофаги виділяють розчинний гуморальний фактор $IL-1$, під впливом якого хелпери починають синтезувати власні медіатори – лімфокіни. Серед них важлива роль належить інтерлейкінам ($IL1 - IL10$).

Окремі клони Т-хелперних клітин відрізняються фенотипово та цитолічною продукцією. Хелпери першого типу Th_1 стимулюють клітинний імунітет, другого Th_2 – гуморальний, хоча й розвиваються зі спільного попередника – нульової хелперної клітини.

Т-хелперні клітини з фенотипом $CD4+$ виявляються за допомогою моноклональних антитіл LT4 (LT4). Вміст Т-хелперів у периферичній крові 35-55 % від усіх лімфоцитів.

Лізис клітин-мішеней лімфоцитами називається клітино-залежною цитотоксичністю. При цьому Т-лімфоцит діє при відсутності специфічних антитіл і комплементу: антитіла можуть навіть інгібувати цитотоксичність, заважаючи тісному контакту з мішенню.

Ефектори утворюються при контакті Т-лімфоцитів з антигенними детермінантами на поверхні клітин, тоді як хелпери – при транспортуванні антигену в лімфоїду тканину макрофагами.

Цитотоксичні реакції по відношенню до клітин, інфікованих вірусом, не є строго специфічними, у ряді випадків вони можливі стосовно клітин, заражених спорідненими вірусом. Можливо, ЦТЛ специфічні до групових антигенів вірусів. Тому ЦТЛ можуть також реагувати проти власних клітин, у яких є нові поверхневі антигени - ракові клітини, макрофаги, що адсорбували різні антигени і т. д.

Реакція ЦТЛ спостерігається через 2-3 доби після першого контакту з клітинами-мішенями. Реакція найефективніша при 37⁰С, при 40⁰С контакт здійснюється, але цитотоксичного ефекту немає.

Оскільки ефекторні Т-клітини з фенотипом CD8+, внаслідок цитотоксичної продукції, можуть гальмувати процеси проліферації і диференціювання гемопоетичних попередників, вироблення антитіл, ці лімфоцити називають ще супресорними або гальмівними регуляторними лімфоцитами. Т – супресори, на відміну від інших ефекторних клітин, тривалість життя яких близько 5 тижнів, живуть не більше 3 тижнів.

Існування системи супресорів є логічним: якщо існує система хелперів, що посилює імунну відповідь, повинна існувати і система контролю хелперів. Механізми супресії остаточно не з'ясовані . Описані популяції антиген специфічних ефекторних Т – супресорів, що діють як на ранній стадію, так і на пізній стадіях імунної відповіді.

Клітини з фенотипом CD8+ виявляються за допомогою моноклональних антитіл ЛТ8 (LT8). Вміст Ts в периферичній крові 19-37% .

Співвідношення хелперів і супресорів називають імунорегуляторним індексом і вважають вагомим критерієм функціонального стану імунної системи.

6

Імунологічна пам'ять – здатність лімфоїдних клітин зберігати інформацію про антиген і відповідати посиленою і прискореною реакцією на повторну зустріч з гомологічним антигеном. Механізм утворення імунологічної пам'яті – збільшення кількості клітин, що реагують на даний антиген у лімфоїдній тканині. Це відбувається після першого контакту з антигеном внаслідок проліферації. Імунна пам'ять у людини може зберігатися до 10 років, іноді – все життя. Популяція клітин пам'яті гетерогенна. Т-клітини пам'яті утворюються на малі дози антигену, котрі не викликають гуморальної відповіді.

Основні відмінності клітин пам'яті від попередників :

1. Значно більша тривалість життя.
2. Більша стійкість до мутагенів.
3. Вища чутливість до гомологічного антигену.
4. Здатність викликати вторинну імунну реакцію.

В-клітини пам'яті мають вищу густину імуноглобулінових рецепторів, на мембрані, що забезпечує можливість реагувати на малі дози антигену.

8

Існує особлива субпопуляція не Т- і не В-лімфоцитів, що функціонально характеризується здатністю до лізису клітин-мішеней при відсутності молекул ГКГС і без попередньої сенсибілізації – натуральні або природні кіллери (НК, ПК). Вважається, що роль ПК в імунній відповіді зводиться до захисту від різних патогенних мікроорганізмів. За участю натуральних кілерів може проходити знищення пухлинних та заражених вірусами клітин, аутологічних Т-лімфоцитів. Натуральні кіллери є одними з важливих секреторних клітин

імунної системи. Продукуючи інтерферон- γ , вони сприяють диференціації Т-хелперів типу I.

Вже згадувалось що ПК – великі зернисті лімфоцити.

Їх мішені – великі ядерні клітини. Близько 50 % ПК мають певні рецептори Т-лімфоцитів. Раніше вважали, що 30-40 % ПК повинні бути Т-лімфоцитами. Проте, вони не несуть ознак зрілої Т-клітини - маркеру CD3. Якщо CD3 присутній - це цитолітичний (ефекторний, кілерний) Т-лімфоцит.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4**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, рН=7,4), KН₂РO₄, Na₂НРO₄, 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 діагностикумів 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, НК) 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 ефекторні 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 **TAPA-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°C.

Пробірки з нашарованою на градієнт кров'ю центрифугуються протягом

20 – 25 хв. при 1500 об/хв. Піпеткою з грушею відбирається середній опалесціючий 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 мононуклеарних 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 $+4^{\circ}\text{C}$.

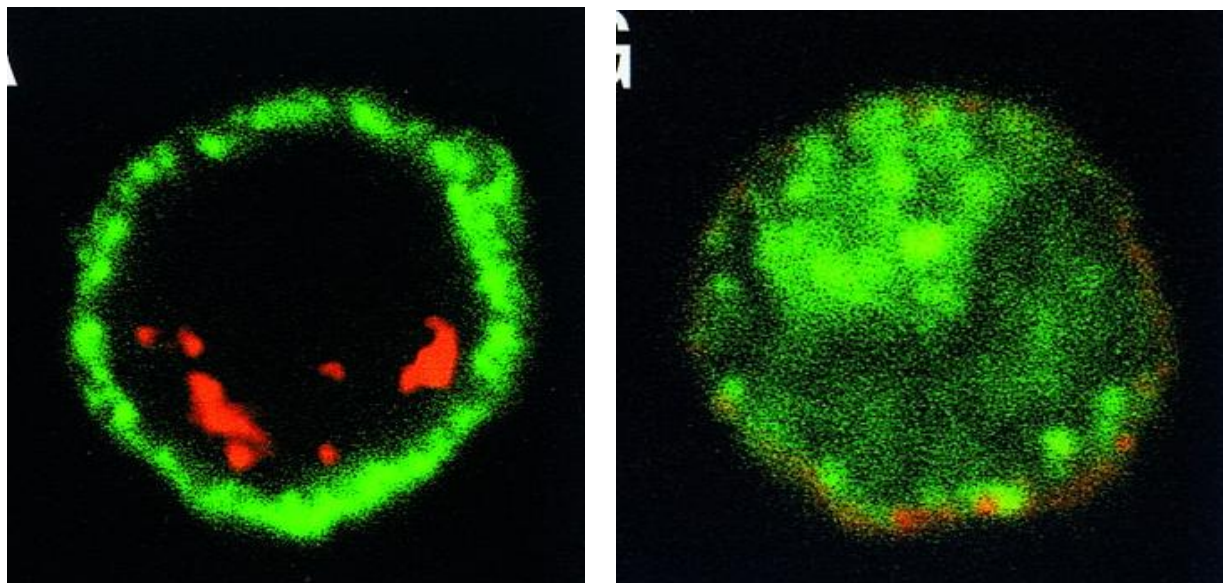
Після 2-разової відмивки і остаточного видалення супернатанту клітини вносяться на предметні скельця і поміщаються в пари формаліну для фіксації на 10 – 15 хв.

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. Отримані самостійно результати порівнюються з табличними, робиться висновок.



Вигляд маркованих клітин під мікроскопом з люмінесцентною насадкою

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

Тема: Регуляція функцій імунної системи**Зміст**

- 1. Органи імунної системи**
- 2. Антиген, як фактор саморегуляції імунітету.**
- 3. Регуляція антитілопродукції**
- 4. Регуляція Т – клітинного імунітету.**
- 5. Тріади імунної регуляції**
- 6. Генетичний контроль імунної відповіді.**
- 7. Патології імунореактивності.**

1

Лімфоїдні органи поділяються на **первинні (центральні)** та **вторинні (периферійні)**.

До первинних відносять кістковий мозок, тимус (вилочкову залозу), сумку Фабриціуса у птахів. У первинних органах проходить дозрівання лімфоцитів.

До вторинних органів відносять лімфатичні вузли, селезінку, мигдалини, шкіру та скупчення дифузної лімфоїдної тканини у слизових оболонках дихальної, травної і сечостатевої органів (у вторинних органах проходять складні клітинні взаємодії, що формують основу імунної реакції).

Вторинні лімфоїдні органи заселені клітинами ретикулярного походження, макрофагами та лімфоцитами, попередники яких – стовбурові клітини кісткового мозку.

Загальна схема взаємодії лімфоїдних органів наступна: Т-лімфоцити диференціюються в імунокомпетентні клітини в тимусі. В-лімфоцити в кістковому мозку.

Лімфатичні вузли відфільтровують чужорідні матеріали і при необхідності реагують на них. Селезінка здійснює контроль за цитологічним складом крові.

Дифузна лімфоїдна тканина слизових оболонок є першим бар'єром на шляху інфекцій завдяки секреції sIgA.

Взаємодія між вторинними лімфоїдними органами і іншими тканинами організму здійснюється рециркулюючими лімфоцитами, які надходять з крові у лімфатичні вузли, селезінку та інші тканини, і потім потрапляють знову в кров основними лімфатичними шляхами, наприклад, грудному протоку.

2

Регуляція імунної відповіді відбувається за рахунок саморегуляції та нейроендокринної регуляції, а також генетичної регуляції.

Основним фактором саморегуляції є антиген. У його присутності імунна відповідь стимулюється, при зменшеній концентрації знижується. Це підтверджується проліферацією клонів Т-клітин *in vitro* при додаванні антигену, а також утворенням антитілопродукуючих В-клітин з одного попередника при культивуванні з антигеном і Т-клітинними розчинними факторами у граничному розведенні.

3

Антитіла здійснюють контроль за типом зворотного зв'язку, тобто продукт реакції одночасно служить інгібітором. Якщо у процесі імунної відповіді ввести в організм надлишок антитіл, спостерігається різке падіння антитілоутворення і зменшення числа клітин, що продукують антитіла. Це ще один доказ центральної ролі антигену в саморегуляції, оскільки надлишок антитіл знищуватиме антиген. Фактор зворотного зв'язку використовується у

клінічній практиці: Rh– матерям вводять анти D-антитіла, що запобігають первинній сенбілізації резус-антигеном і наступній сенсбілізації.

Видалення з кровотоку антитіл методом плазмофорезу посилює синтез антитіл у процесі імунної відповіді.

Введення різних антитіл різним чином впливають на хід імунної відповіді: ін'єкція IgG гальмує синтез антитіл, а IgM навпаки, посилює імунну відповідь. Оскільки антитіла цього ізотипу з'являються першими після введення антигену, їм властиві посилююча роль.

4

T-клітинна регуляція здійснюється за принципом позитивної чи негативної модуляції. Роль індукторів відіграють клітини з фенотипом CD4+.

Механізм супресії також запускається клітинами з фенотипом T-хелперів - CD4+, але його реалізують клітини з фенотипом CD8+. Взагалі, T-хелпери можна розглядати у якості індукторів любих ефекторних клітин як клітинного, так і гуморального імунітету. У той же час, хелпери самі стають об'єктом дії супресорів. T-супресори важко клонувати. Відомі дві популяції супресорних клітин, здатних діяти як на ранній, так і на пізній стадії імунної відповіді.

Таким чином, показником саморегуляції є імунорегуляторний індекс, тобто, співвідношення хелперів і супресорів.

5

В загальному, всю різноманітність взаємодій при імунних реакціях можна подати у вигляді двох тріад, взаємодія між компонентами яких визначає саморегуляцію імунної відповіді.

Першу тріаду складають антитіла, комплемент і поліморфноядерні нейтрофіли, що забезпечують захист від більшості позаклітинних чужорідних антигенів

Друга тріада: Т-лімфоцити, розчинні цитокіни та макрофаги, котрі забезпечують захист від внутрішньоклітинних чужорідних антигенів .

6

На імунних клітинах є рецептори до нейромедіаторів, що називаються лімфоїдними синапсами. Самі імунні клітини здатні продукувати нейромедіатори. Тобто, існує тісний взаємозв'язок між нервовою і імунною системою.

У регуляції імунітету беруть участь залози внутрішньої секреції. Гормони тимусу контролюють розвиток Т-лімфоцитів. Гормони щитоподібної залози впливають на імунітет опосередковано, через обмінні процеси.

На імунні реакції впливають стероїдні гормони статевих залоз та надниркової залози. Наднирники виділяють кортикостикостероїди, що у стресовій ситуації гальмують імунітет, зберігаючи енергію на подолання стресової ситуації (імунні реакції дуже енергоємні).

В загальному, зараз імунну, нервову та ендокринну системи поєднують у єдину імунонейроендокринну систему.

7

Імунна відповідь знаходиться під контролем різноманітних генетичних факторів. Приблизно десять генів контролюють загальний рівень утворення антитіл на складні антигени. Деякі з цих генів впливають на процес переробки антигенів макрофагами, деякі – на швидкість проліферації В- клітин, що диференціюються. У загальному, імунна відповідь знаходиться під впливом генів , що локалізовані в головному комплексі гістосумісності.

Гени імунореактивності, зчеплені з локусом ГКГС, кодують продукти ГКГС, вони, у свою чергу, контролюють процес кооперації між Т- і В- клітинами.

При виникненні певних змін специфічної імунореактивності проявляються патологічні стани імунної системи, що впливають на гомеостаз організму. Такі стани ще називають **імунодефіцитними**.

Імунодефіцитні стани поділяються на спадкові (первинні) або набуті (вторинні).

Найбільш характерним клінічним проявом первинних імунодефіцитних станів є рецидивуючі інфекції верхніх дихальних шляхів і травного каналу, артрити, остеомієліти. Первинні імунодефіцитні стани можуть залежати від дефіциту Т- або В-систем імунітету, або бути комбінованими. При недостатності гуморального імунітету переважають бактеріальні інфекції, при недостатності клітинного – вірусні і грибові.

Первинні імунодефіцити можуть бути зумовлені блокадою системи імунітету на різних рівнях:

I рівень генетичної блокади – виникає внаслідок блокади процесів диференціювання у кістковому мозку. Це може бути наслідком відсутності поліпотентних стовбурових клітин, що робить неможливим утворення Т- та В-лімфоцитів.

II рівень генетичної блокади полягає у відсутності або недорозвиненості тимусу. Тобто, у кістковому мозку визрівають клітини лише до рівня пре-Т-лімфоцитів. Надалі диференціювання клітин обмежене.

III рівень генетичної блокади виникає внаслідок блокади процесів диференціювання у тимусі. Тобто, попередники Т-лімфоцитів, потрапляючи до тимусу, не визрівають до клітин-хелперів, супресорів та кілерів. Можливо, це виникає внаслідок порушення здатності клітин експресувати первинні антигени на своїй мембрані.

Блокада диференціювання В-лімфоцитів реалізується за такими напрямками:

I рівень генетичної блокади: блокада диференціювання попередників у зрілі В-лімфоцити.

II рівень генетичної блокади: блокада синтезу імуноглобулінів.

При одночасній недостатності клітинного і гуморального імунітету діти гинуть від вірусних, бактеріальних і грибкових інфекцій у перші тижні життя. У хворих на імунодефіцитні стани збільшується вірогідність захворювань на рак у 200-1000 разів.

Вторинні імунодефіцитні стани набуваються протягом життя. Імунологічна недостатність виникає після вірусних інфекцій грипу, кору, гепатиту. Вторинні дефекти Т-клітинної ланки імунітету викликаються стресовими станами, дією іонізуючого випромінювання та різних патологічних агентів, ендокринними захворюваннями. Якщо після припинення дії фактора, що викликав імунодефіцит, він зникає, імунодефіцит називається **транзиторним**, якщо зберігається – **стабільним**.

Крім процесів, що зумовлюють первинне порушення імунологічно-компетентних тканин, в організмі можливі патологічні явища, пов'язані з утворенням комплексу антиген-антитіло – **реакції гіперчутливості**.

Аутоімунні захворювання – реакції імунної системи проти компонентів власного організму. Причини:

1. Демаскування антигенів: зникає бар'єр між імунітетом і тканиною, яка за нормальних умов не контактує з імунітетом.
2. Мутації імунних клітин.
3. Мутації клітин організму.
4. Імунізація антигеном, структурно схожим з певними компонентами організму.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5

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 О (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 (AB0, Левіс, Індіан). Білкові молекули, що несуть антигени груп крові, функціонують як трансмембранні транспортери, рецептори, молекули клітинної адгезії.

Уявлення про групу крові системи AB0 базується на наявності в еритроцитах групо-специфічних антигенів (0, A, B), а у сироватці - антитіл α та β . Система AB0 була першою відкритою системою груп крові. Доведено багатоалельність компонентів системи AB0. На даний час відомо близько 70 алелей.

Антигени груп крові системи AB0 схожі між собою і містять спільний компонент – речовину H. Ця речовина виявлена в еритроцитах людей, що мають групу крові 0, але вона не є продуктом гену 0. Кількість речовини H обернено пропорційна кількості речовини A та B. Речовина H, як антиген, неоднорідна і є базисною для синтезу всіх факторів груп крові системи AB0. Секреція факторів A, B та H незалежна від генів системи AB0 і кодується генами, що розташовані на 19 хромосомі.

Існує дві точки зору на сутність антигену 0, відмінного від речовини H. Згідно першої, речовина 0 синтезується геном P. Проте, наявність речовини 0 твердо не встановлена, специфічні антитіла до нього не виявлені. Згідно іншої точки зору, речовина 0 є ознакою відсутності антигенів A та B в еритроцитах осіб з групою крові 0(I). Деякі автори ідентифікують 0-речовину як H. Тому антигенну систему, відкриту Ландштайнером, часто називають AB0 (H)-системою.

Фенотипово розрізняють 4 групи крові. Генетично існує 6 комбінацій антигенів: 00, A0, AA, B0, BB, AB. Це відбувається внаслідок того, що три алельні гени групових субстанцій H, A, B, 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 АВО, 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 АВО, кодуються алельними генами, розміщеними у локусі q34 на хромосомі 9.

Антигени АВО 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 зустріваності різних груп системи АВО 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 АВО-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 глікозилований 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 О (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: О (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: О(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.

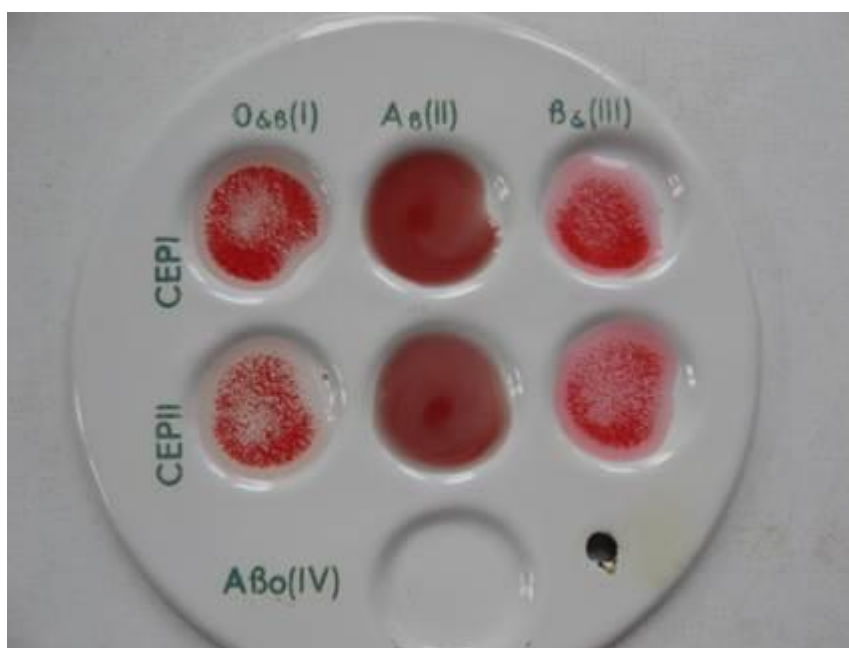
При негативній реакції (-) крапля залишається забарвленою рівномірно.

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

аглотинації проводиться додаткове дослідження еритроцитів крові зі стандартною сироваткою групи АВ (IV), яка не містить групових аглютининів. Лише відсутність аглотинації з сироваткою групи АВ (IV) дозволяє врахувати позитивний результат реакції з сироватками 0(I), А(II), В(III) як істинний.



Приклад аглотинації на стандартному планшеті: у обстеженого А(II) група крові

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 провертається і результат оцінюється у відбитому світлі. Наявність аглотинації свідчить про наявність Rh-антигену.

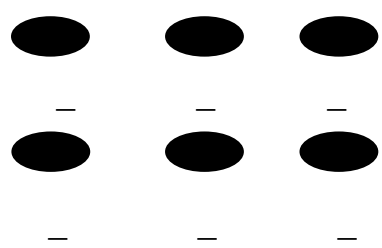
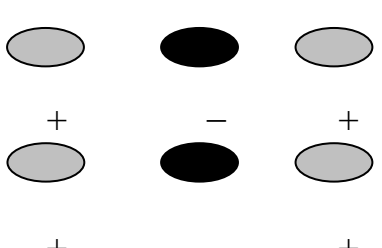
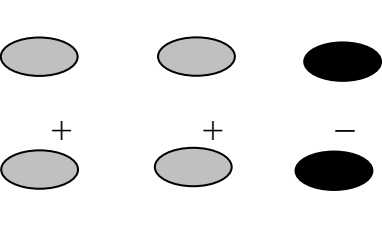
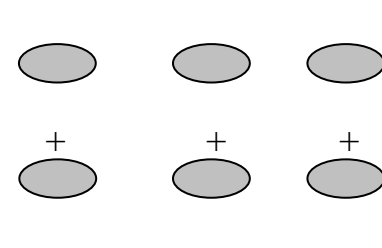

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

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 АВ(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 АВ(IV) зустрічається в 2,5 рази частіше серед осіб з гіпогамаглобулінемією. Серед цієї ж групи підвищена частота осіб з порушеною

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)			
		- 	

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.

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. Йомтов, 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.

Навчальне видання

Соколенко Вадим Леонідович
Соколенко Світлана Вікторівна

ІМУНОЛОГІЯ

Навчально-методичний посібник

Друкується в авторській редакції

Формат 60x84¹/16. Папір офсетний. Гарнітура Times.
Умовн. друк. арк. 3,8. Тираж 50 прим.

Друк: ТОВ «ЛЕМАР-ПРОМ»
Україна, м. Черкаси, вул. Карбишева, 21/1
Тел: (097) 143-65-35.