

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

ІМУНОЛОГІЯ ТА АЛЕРГОЛОГІЯ

Навчальний посібник для практичних робіт з дисципліни
«Імунологія та алергологія»

Практикум

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за освітньою програмою «Медична інженерія» «Регенеративна та біофармацевтична
інженерія»
спеціальність 163 «Біомедична інженерія»

Укладач: О.Я. Беспалова

Електронне мережеве навчальне видання

Київ
КПІ ім. ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО
2025

УДК 57.083.3(075)

I -55

Укладач: *Беспалова Олена Ярославівна* канд. біол. наук, с.н.с., доцент кафедри ТМБ КПІ ім.Ігоря Сікорського

Рецензенти *Чумак А. А.* д-р мед.наук, професор, член-кореспондент НАМН України, директор Інституту клінічної радіології ННЦРМГО
Вовянюк С. І., канд. біол. наук, доцент кафедри біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського

Відповідальний редактор *Мотроненко В.В.* доктор філософії, доцент кафедри ТМБ КПІ ім. Ігоря Сікорського

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 7 від 08.05.2025 р.)
за поданням вченої ради факультету біомедичної інженерії
(протокол № 12 від 31.03.2025 р.)*

I -55 Імунологія та алергологія. Навчальний посібник для практичних робіт з дисципліни «Імунологія та алергологія» [Електронний ресурс]: практикум: навч. посіб. для здобувачів ступеня бакалавра за освіт. програмою «Медична інженерія» «Регенеративна та біофармацевтична інженерія» спец. 163 «Біомедична інженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: О.Я. Беспалова. – Електрон. текст. дані (1 файл 4,88 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025. – 85 с.

Навчальний посібник для практичних робіт побудований з урахуванням завдань з дисципліни «Імунологія та алергологія», передбачених програмою. Містить практичні роботи і завдання для самоконтролю знань студентів.

Видання призначено для студентів вищих навчальних закладів, що навчаються за спеціальністю 163 «Біомедична інженерія».

УДК 57.083.3(075)

Реєстр. № НП 24/25-476. Обсяг 3,9 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Берестейський, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП..... | 4 |
| Практична робота 1 Біобезпека при роботі з біологічним матеріалом. Структура імунологічної лабораторії | 6 |
| Практична робота 2 Центральні та периферійні органи імунної системи, будова, функції..... | 11 |
| Практична робота 3 Клітини імунної системи | 16 |
| Практична робота 4 Клітинні фактори неспецифічної резистентності..... | 19 |
| Практична робота 5 Адаптивний імунітет. Т- і В-лімфоцити | 26 |
| Практична робота 6. Неспецифічні фактори захисту організму | 33 |
| Практична робота 7 Будова та функції імуноглобулінів | 40 |
| Практична робота 8 Методи імунологічних досліджень. Імуноферментний аналіз..... | 46 |
| Практична робота 9 Антигени та їх характеристики | 58 |
| Практична робота 10 Головний комплекс гістосумісності..... | 68 |
| Практична робота 11 Біологічне значення цитокінів. Визначення фактору некрозу пухлин..... | 72 |
| Практична робота 12 Алергічні реакції. | 79 |
| СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ..... | 84 |

ВСТУП

Навчальний посібник для практичних робіт побудований з урахуванням завдань з дисципліни «Імунологія та алергологія», передбачених програмою. Містить практичні роботи і завдання для самоконтролю знань студентів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 163 – «Біомедична інженерія» за освітньою програмою «Медична інженерія» «Регенеративна та біофармацевтична інженерія». До кожного із 12 занять по всім основним розділам дисципліни наведено перелік теоретичних питань, описана практична частина заняття, контрольні питання. Практичні роботи проілюстровані рисунками, схемами і таблицями, які полегшують сприйняття матеріалу та сприяють його кращому засвоєнню.

Матеріали дають змогу сформуванню у студентів правильного розуміння закономірностей структури та будови органів імунної системи, процесів, що пов'язані з диференціацією, проліферацією клітин, з механізмами міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації. Механізмом розвитку алергічних реакцій організму. Сформуванню у студентів практичних навичок визначення патологічних процесів з участю імунних механізмів.

Після вивчення курсу студенти повинні знати:

- властивості і функції клітин імунної системи;
- володіти основами методології імунологічних досліджень;
- виконувати ідентифікацію клітин імунної системи за допомогою імунологічних методів;
- визначати функціональну активність імунокопетентних клітин;
- досліджувати рівні антитіл за допомогою імуноферментного методу;
- відрізнити гіперчутливість негайного типу від гіперчутливості сповільненого типу.

Структура та оформлення звіту з практичних робіт

Звіт з практичної роботи оформлюється відповідно до змісту практичного завдання та повинен містити такі розділи:

- титульна сторінка;
- мета роботи;
- опис практичної частини;
- виконання практичного завдання;
- відповіді на контрольні запитання.

Організація, контроль виконання та захист практичних робіт

До виконання практичної роботи допускаються студенти, які мають теоретичні знання, що необхідні для виконання цієї роботи.

Захист практичної роботи відбувається тільки за наявності належно оформленого звіту.

Оцінювання знань студентів з дисципліни здійснюється поточним опитуванням, модульним та підсумковим контролем (заліком).

ПРАКТИЧНА РОБОТА 1

БІОБЕЗПЕКА ПРИ РОБОТІ З БІОЛОГІЧНИМ МАТЕРІАЛОМ.

СТРУКТУРА ІМУНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Мета: ознайомитись з правилами роботи з біологічним об'єктом. Структурою імунологічної лабораторії та її обладнанням. Методами дослідження, які використовуються в імунологічній лабораторії.

Обладнання: водяна баня, сушильна шафа, рН-метри, терези, центрифуги, холодильник, термостат, автоклав, мікроскоп, люмінесцентний мікроскоп, спектрофотометр, фотоколориметр, прилади для імуноелектрофорезу та імуноферментного аналізу, ПЛР-аналізатор, дозатор, гомогенізатори.

Теоретичні відомості

Вимоги до роботи в імунологічній лабораторії:

При виконанні практичних робіт необхідно дотримуватися певних правил поведінки. Заняття починаються із ознайомлення з загальними положеннями безпеки роботи в лабораторії. Дослідження біоматеріалу, належить до групи потенційно інфікованого (кров, суспензія клітин, сироватка, плазма). Це потребує дотримання основних вимог техніки безпеки та санітарно-протиепідемічного режиму. До основних заходів, спрямованих на підтримку санітарного режиму, належить проведення дезінфекції, дотримання вимог асептики та стерилізації.

Під час виконання робіт у лабораторії слід ретельно дотримуватися правил техніки безпеки, які запобігають впливу на організм таких шкідливих факторів, як: їдкі, токсичні, канцерогенні та мутагенні хімічні речовини; електричний струм; легкозаймисті речовини та природний газ, що можуть спричинити пожежу або вибух.

Роботи потрібно виконувати у спецодязі – халатах та змінному взутті. В разі потреби використовують також гумові рукавички, гумовані фартухи, маски та окуляри.

Заборонено входити до лабораторії без спецодягу.

У лабораторних приміщеннях забороняється класти на столи сумки, портфелі та інші індивідуальні речі, зберігати харчові продукти та вживати їжу. Особисті речі потрібно зберігати за межами лабораторії.

На робочому місці мають знаходитися лише потрібні для виконання конкретної роботи реактиви і матеріали, інструменти та обладнання. Посуд, призначений для зберігання реактивів, повинен мати етикетки з чіткими надписами. Заборонено використовувати реактиви без етикеток, або з нерозбірливими надписами.

1. До підготовки імунологічних досліджень потрібно приділяти багато уваги.
2. Під час виконання імунологічних робіт потрібна висока точність, охайність та стерильність.
3. Лабораторія повинна мати гарну вентиляцію і розташовуватися в такому приміщенні, яке має стіни, підлогу, лабораторні столи, що легко миються. Норма площі для кожного співробітника становить 12–14 м², а робоче місце – 0,9 м².
4. Залежно від профілю імунологічної лабораторії, до її складу може входити кімната для виділення і посіву бактерій, а також бокси для роботи з культурами клітин і тканин.
5. Мають бути спеціально обладнані місця для проведення імунохімічних, імунологічних та біохімічних досліджень.
6. В окремих приміщеннях слід зберігати матеріали для роботи в імунологічній лабораторії, реактиви, мити лабораторний посуд, а також утримувати тварин (віварій).
7. До імунологічної лабораторії допускаються лише у спеціальному одязі – халатах або медичних костюмах, роботу з біоматеріалом проводять у шапочках, гумових рукавичках, за потреби – у захисних окулярах та масці або спеціальних щитках.
8. На робочому місці не повинні знаходитись сторонні речі.

В імунологічній лабораторії мають бути такі прилади: водяні бані, сушильні шафи, рН-метри, терези, центрифуги, холодильники, термостати, автоклави, мікроскопи, люмінесцентні мікроскопи, спектрофотометри, фотоколориметри, прилади для імуноелектрофорезу та імуноферментного аналізу, ПЛР-аналізатори, дозатори, гомогенізатори, інші новітні засоби тощо.

Правила роботи в імунологічній лабораторії:

1. Усі роботи проводять у халатах або спеціальному одязі, під час роботи з кров'ю використовують гумові рукавички та одноразові засоби особистого захисту (шапочки, окуляри та маски).
2. Після роботи миють руки з милом і використовують дезінфікуючі засоби.
3. Посуд та матеріали, які використовували для роботи, обробляють дезінфікуючими розчинами або стерилізують у спеціальних апаратах.
4. Дотримуються вимог стерильності на робочих місцях.
5. Труп тварин спалюють, або відносять в спеціальні контейнери після обробки їх дезінфекційними засобами.

Правила роботи з радіоактивними сполуками в імунологічній лабораторії:

1. Робота з радіоактивними сполуками проводиться в радіоізотопному боксі.
2. Радіоізотопи зберігають у закритих контейнерах.
3. Із ізотопами можуть працювати лише люди, які мають на це медичне і юридичне право.
4. Для роботи з даним видом речовин потрібно мати спеціального призначення одяг.
5. Працювати з ізотопами треба обережно, щоб вони не потрапили на тіло, одяг, робочі столи та обладнання.
6. Забруднивши тіло, одяг, підлогу радіоактивними сполуками, необхідно вимити їх водою з милом, детергентом або спеціальними миючими засобами, після цього провести їх перевірку радіометричною апаратурою і обов'язково попередити відповідального за радіаційну безпеку.

7. Після роботи прибрати робоче місце і дезактивувати посуд, інструменти, обладнання і за потреби – одяг.

8. Забороняється викидати та виливати радіоактивні відходи у сміттєві ящики і каналізацію загального користування.

Практичне завдання

1. Ознайомитись з правилами техніки безпеки в лабораторії імуносерологічних досліджень та доповнити вирази:

а) Будь-який матеріал, що надходить на дослідження до лабораторії, розглядається як _____

б) Для серологічних досліджень контейнери з біологічним матеріалом доставляються в _____

в) Рідкі матеріали (зразки сироваток) повинні бути у _____

г) При розпакуванні матеріалу, що надійшов до лабораторії, персонал повинен використовувати _____

д) Зразки крові, що надходять на дослідження до лабораторії, розглядаються як _____

е) Усі процедури при роботі з біологічними рідинами проводяться в _____ за допомогою _____

2. Вкажіть методи діагностики, які використовуються в бактеріологічній лабораторії і дайте їм визначення.

| Назва методу | Характеристика методу | Приклад |
|--------------|-----------------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |

3. Намалуйте рух променів в сухій і імерсійній системах світлового мікроскопа (рис.1.1).

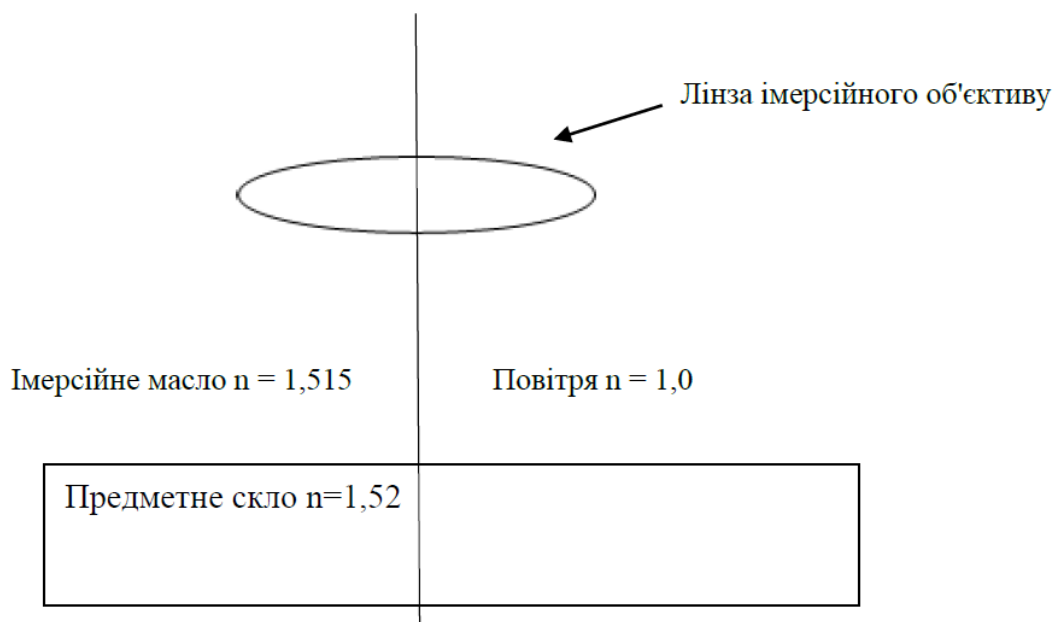


Рис.1.1. Рух променів в сухій і імерсійній системах світлового мікроскопа.

Контрольні питання:

1. Які правила роботи в імунологічній лабораторії?
2. Назвіть особливі умови роботи з радіоактивними речовинами у лабораторії.
3. Види мікроскопії, будова світлового мікроскопа та правила роботи з ним.
3. Методи дослідження, які використовуються в імунологічній лабораторії.
4. Мікроскопічний метод дослідження, особливості методу та його практичне використання.
5. Які шкідливі та небезпечні виробничі фактори можуть впливати на людину при виконанні робіт в лабораторії?
6. Основні правила при роботі з електроприладами?

ПРАКТИЧНА РОБОТА 2

ЦЕНТРАЛЬНІ ТА ПЕРИФІРІЙНІ ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ, БУДОВА, ФУНКЦІЇ.

Мета: вивчити центральні органи імунної системи, будову, функції: тимусу, червоного кісткового мозку; периферійних органів імунної системи: лімфовузли, селезінка

Обладнання: центрифуги, холодильник, термостат, автоклав, мікроскоп, спектрофотометр, фотоколориметр, прилади для імуноелектрофорезу та імуноферментного аналізу, гомогенізатори.

Теоретичні відомості

Центральні органи імунної системи – це основне місце дозрівання, диференціювання, розвитку (“навчання” і “виховання”) імуноцитів або імунокомпетентних клітин, які заселяють периферійні органи. *Периферійні лімфоїдні органи* забезпечують умови для розвитку імунної відповіді

Центральні органи імунної системи

Тимус – спеціалізований лімфоїдний орган, в якому проходить розвиток і “навчання” більшої частини Т-лімфоцитів. Тимус складається із двох долей і розміщений в передньому верхньому середостінні за грудиною над серцем і великими кровоносними судинами.

❖ *Кістковий мозок* – основний кровотворний орган і центральний орган імунної системи ссавців. У ньому міститься популяція поліпотентних СКК (стовбурових кровотворних клітин), які дають початок усім клітинам крові, в тому числі лімфоцитам.

Кістковий мозок – центральний орган кровотворення. Структурно складається із компактної кістки, стромы, кісткомозкових синусів, генеративної зони і зони дозрівання. Вважається, що всі елементи кісткового мозку беруть участь у формуванні і регуляції:

✚ Еритропоеза (закінчується утворенням еритроцитів)

- ✚ Мієлопоеза (утворюються базофіли, еозинофіли, моноцити)
- ✚ Мегалокаріоцитопоеза (формуються тромбоцити)
- ✚ Диференціювання дендритних клітин
- ✚ Повного лімфопоезу так званих класичних В-лімфоцитів

Ефекторні клітини – лімфоцити й фагоцити, які після завершення диференціювання можуть здійснювати свої кінцеві функції. Це функціональне поняття, що об'єднує клітини, які беруть участь в імунній відповіді безпосередньо (шляхом контакту) або опосередковано – через розчинні речовини (лімфокіни).

Запалення – сукупність процесів, що зумовлюють міграцію клітин і надходження ефекторів імунної системи до місця інфекції або ушкодження.

Імунітет – сукупність захисно-адаптаційних реакцій і пристосувань, спрямованих на збереження сталості антигенного складу внутрішнього середовища організму, здатність організму захищати власну цілісність і біологічну індивідуальність;

Імунітет гуморальний – імунітет, основним ефектором якого є антитіла.

Імунітет клітинний – імунітет, основним ефектором якого є клітини та сенсibiliзовані лімфоцити й продуковані ними лімфокіни.

Імунітет місцевий – частина загального імунітету, що забезпечує захист певних ділянок тіла людей і тварин (шкіри, слизових оболонок, тканин, органів) від паразитів і речовин антигенної природи.

Імунітет набутий – форма імунітету, набута в процесі індивідуального розвитку організму після контакту з паразитами і речовинами антигенної природи.

Імунітет пасивний – специфічна імунологічна реактивність, набута після штучного введення лікувальної сироватки або природного перенесення материнських імуноглобулінів крізь плаценту плоду.

Імунітет природний – уроджена, неспецифічна форма імунітету, зумовлена бар'єрними й антимікробними властивостями шкіри і слизових

оболонки, конкурентною активністю нормальної мікрофлори тіла, ареакивною тканин до дії пошкоджуючих факторів, фагоцитарною реакцією макрофагів і нейтрофілів, природними кілерами, комплементом, лізоцимом, інтерфероном тощо.

Імунна система – сукупність усіх лімфоїдних органів та скупчень лімфоїдних клітин.

Лімфатичні вузли – периферійні органи імунної системи, розміщені по ходу лімфатичних судин, в яких за допомогою захоплених із лімфи антигенів відбувається стимуляція Т- і В-лімфоцитів. В-лімфоцити знаходяться у кірковій речовині, а Т-лімфоцити – в паракортексі. Медула містить як В-, так і Т-лімфоцити, а також плазматичні клітини і макрофаги. Контакт з антигеном, що надходить у лімфатичні вузли через аферентні лімфатичні судини, зумовлює утворення зародкових центрів у корковій (гуморальна імунна реакція) або початок клональної проліферації в навколоріткульній речовині (клітинозалежні імунні реакції). Важливу роль при цьому відіграють клітини ретикулу (дендритні макрофаги), здатні до фагоцитозу і (або) накопичення антигену.

Лімфатичні скупчення – лімфатичні вузли вздовж кишок і верхніх дихальних шляхів, які є дрібними скупченнями лімфоїдних елементів і фагоцитуючих клітин, що відрізняються від лімфовузлів відсутністю капсул.

Практичне завдання

1. Дайте порівняльну характеристику вродженому та набутому імунітету. Заповніть таблицю:

| Вид імунітету | Вроджений імунітет | Набутий імунітет |
|---|--------------------|------------------|
| Функція | | |
| Активність системи | | |
| Механізм прояву | | |
| Імунологічна пам'ять | | |
| Клітини, що задіяні у прояві імунітету | | |
| Гуморальні фактори, що забезпечують прояв | | |

2. Укажіть на рисунку 2.1 основні органи імунної системи людини.

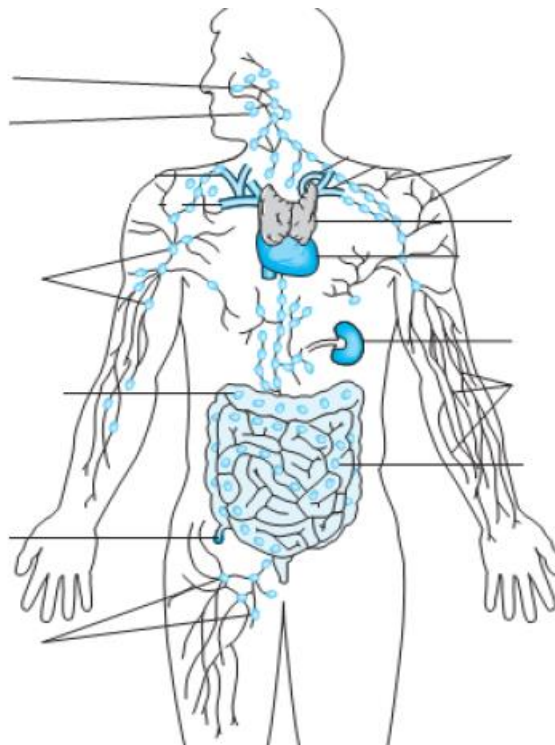


Рис. 2.1. Органи імунної системи людини

3. Укажіть на рисунку 2.2 структурні фрагменти лімфатичного вузла.

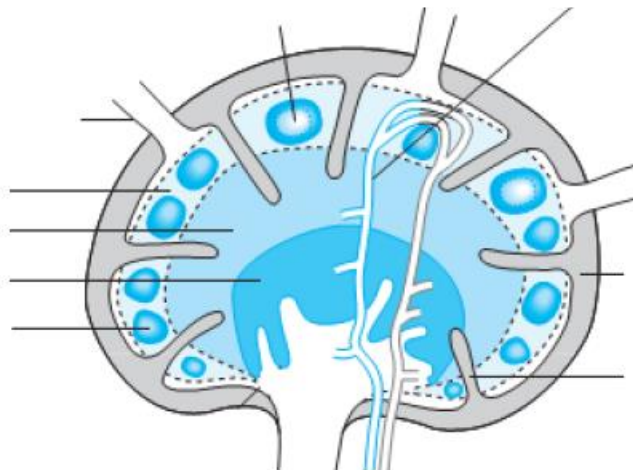


Рис. 2.2 Будова лімфатичного вузла

Контрольні питання

1. Назвіть складові системи природного імунітету.
2. Охарактеризуйте гуморальні та клітинні фактори природної резистентності.
3. Запалення як прояв місцевої реакції неспецифічного імунітету.
4. Охарактеризуйте функції первинних і вторинних лімфоїдних органів.
5. Проаналізуйте механізми імунного захисту слизових оболонок.

ПРАКТИЧНА РОБОТА 3

КЛІТИНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

***Мета:** Вивчити основні клітини імунної системи, онтогенез В- і Т-лімфоцитів. Міграція Т- і В-лімфоцитів у периферійні лімфоїдні органи*

Обладнання: водяна баня, сушильна шафа, рН-метри, терези, центрифуги, холодильник, термостат, автоклав, мікроскоп, спектрофотометр, фотоколориметр, прилади для імуноелектрофорезу та імуноферментного аналізу, гомогенізатори.

Клітини плазматичні – кінцевий результат диференціації В-лімфоцитів. Мають базофільну цитоплазму, багату на ендоплазматичний ретикулум і мітохондрії, ексцентрично розташоване ядро характерного виду (“колесо зі спицями”), добре виражений комплекс Гольджі. Плазматичні клітини є продуцентами антитіл. Вони не діляться. Тривалість їх життя у людини складає близько 4 діб.

Навчання Т-клітин – процеси позитивної та негативної селекції клітин, що розвиваються з тимоцитів. Позитивний добір проходять незрілі Т-клітини, здатні відповідати на антигенні пептиди, що асоційовані з власними молекулами МНС. Негативного добору із наступною загибеллю зазнають Т-клітини, що відповідають на власні антигени гістосумісності.

В-лімфоцити, – лімфоїдні клітини, що походять із кісткового мозку. Диференціюються у фабрицієвій сумці (у птахів) і у кістковому мозку (савців). В-лімфоцити утворюються з про-В-лімфоцитів; заселяють тимуснезалежні зони вторинних лімфоїдних органів; виявляються у крово- та лімфотоках як їх складова частина.

Т-лімфоцити, Т-клітини, тимусзалежні лімфоцити – гетерогенна популяція клітин, які дозрівають під впливом інтактного тимуса. Т-лімфоцити покидають тимус як посттимусні клітини-попередники, які на периферії перетворюються на імунокомпетентні Т-лімфоцити. Т-лімфоцити

мігрують у тимусзалежні зони вторинних лімфоїдних органів. Т-лімфоцити відповідальні за клітинозалежні імунні реакції; здійснюють регулюючий вплив на гуморальну імунну відповідь.

Практичне завдання

1. Опишіть основні етапи дозрівання і диференціювання Т-лімфоцитів.

Заповніть таблицю:

| Етапи дозрівання | Місцезнаходження | Роль антигену | Рецептори для антигену |
|-----------------------------|------------------|---------------|------------------------|
| Стовбурова клітина ↓ | | | |
| Пре-Т-лімфоцит ↓ | | | |
| Незрілий Т-лімфоцит ↓ | | | |
| Зрілий Т-лімфоцит ↓ | | | |
| Активованій Т-лімфоцит ↓ | | | |
| Ефекторна клітина | | | |

2. Опишіть основні етапи дозрівання та диференціювання В-лімфоцитів.

Заповніть таблицю:

| Етапи дозрівання | Місцезнаходження | Роль антигену | Імуноглобуліни |
|-----------------------------|------------------|---------------|----------------|
| Стовбурова клітина ↓ | | | |
| Пре-В-лімфоцит ↓ | | | |
| Незрілий В-лімфоцит ↓ | | | |
| Зрілий В-лімфоцит ↓ | | | |
| Активованій В-лімфоцит ↓ | | | |
| Плазматична клітина | | | |

3. Дайте порівняльну характеристику Т- і В-лімфоцитам. Заповніть таблицю:

| Параметр | Т-лімфоцити | В-лімфоцити |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Походження | | |
| Дозрівання | | |
| Вміст у крові | | |
| Рецептор для антигену | | |
| Продукування антитіл | | |
| Участь у клітинних реакціях | | |
| Клітини пам'яті | | |
| CD-антигени | | |

Контрольні питання

1. Охарактеризуйте клітини неспецифічного імунного захисту.
2. Поясніть онтогенез В- і Т-лімфоцитів.
3. Поясніть міграцію Т- і В- лімфоцитів у периферійні лімфоїдні органи.
4. Яке біологічне значення має постійне оновлення лімфоїдних клітин в організмі?
5. Охарактеризуйте процеси активації лімфоцитів.

ПРАКТИЧНА РОБОТА 4

КЛІТИННІ ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ

Мета: вивчити основні клітини неспецифічного імунного захисту.

Визначення лейкоцитарної формули

Обладнання: мікроскоп, предметне скло, піпетки, 96% спирт етиловий, барвник Романовського-Гімзи, лейкоцитарний лічильник, сушильна шафа, центрифуги, холодильник, термостат, автоклав, мікроскоп, спектрофотометр, фотоколориметр.

Теоретичні відомості

Лейкоцити – неоднорідна за складом група клітин, що відрізняються за походженням, морфологічними (розмір клітин, будова ядра, наявність цитоплазматичних гранул), цитохімічними та функціональними властивостями. Лейкоцити поділяють на 2 типи: для одних характерна зерниста цитоплазма (гранулоцити), для других – незерниста (агранулоцити). До зернистих лейкоцитів належать три групи лейкоцитів, що відрізняються за забарвленням цитоплазматичних гранул.

Нейтрофіли – лейкоцити діаметром 10-15 мкм, гранули яких при нейтральних значеннях рН не забарвлюються ані кислими, ані основними барвниками. У зв'язку з сегментованою будовою ядра зрілі нейтрофіли ще називають поліморфноядерними лейкоцитами. До незрілих форм нейтрофілів належать юні та паличко-ядерні клітини. Цитоплазма нейтрофілів блідо-рожева, з нерівномірною зернистістю, забарвленою у рожево-синій або фіолетовий колір. Ядро темно-фіолетове паличковидне або сегментоване (2-5 сегментів).

Нейтрофіли – найчисельніша група лейкоцитів периферійної крові. Вони складають 48-78 % від загальної кількості лейкоцитів. Основна ефекторна функція нейтрофілів – фагоцитоз, який вони можуть здійснювати лише 1 раз, після чого гинуть. Разом із антитілами та системою комплементу вони виконують важливу роль у розвитку гострої захисної (запальної)

реакції. Нейтрофіли містять гранули кількох типів: первинні гранули містять лізоцим, кислі гідролази та мієлопероксидазу; вторинні гранули містять лактоферин та антимікробні білки (дефензини, катіонні білки).

Еозинофіли – округлі клітини діаметром 12-17 мкм, містять великі гранули, що забарвлюються кислим барвником еозином. Цитоплазма цих лейкоцитів забарвлена у слабо-блакитний колір, погано помітний через виражену жовто-червону зернистість. Ядро пухке, широке, складається з 2-3 сегментів, забарвлене у фіолетовий колір.

Еозинофіли складають 1-4 % усіх лейкоцитів. Це спеціалізовані лейкоцити, здатні вражати позаклітинні паразити 39 (гельмінти, шистосоми), які не піддаються фагоцитозу. Токсикогенність еозинофілів зумовлена реакцією дегрануляції: чисельні гранули, що містять токсичні речовини, зливаються з цитоплазматичною мембраною та їх вміст вивільняється у позаклітинне середовище. Окрім того, еозинофіли утворюють токсичні метаболіти кисню. Обидва механізми складають основу протигельмінтного імунітету.

На поверхні еозинофілів розташовані рецептори до IgE, тому вони беруть участь у реакціях антиген-антитіло і можуть пошкоджувати не лише чужорідні, але і клітини власного організму при алергічних реакціях. Кількість еозинофілів підвищується при імунізації, запальних і алергічних реакціях, аутоімунних захворюваннях.

Базофіли – клітини округлої чи овальної форми діаметром 8-12 мкм, гранули яких забарвлюються основними барвниками. Цитоплазма забарвлена у слабо-рожевий колір з крупними гранулами темно-фіолетового кольору. Ядро округле або нечіткої структури з 2-3 лопатями, забарвлене у фіолетово-рожеве забарвлення. Базофіли присутні у циркулюючій крові у дуже невеликих кількостях (0,2-0,5 % від загальної кількості лейкоцитів). Цитоплазма базофілів заповнена гранулами, що містять різноманітні медіатори та біологічно-активні речовини (гістамін, гепарин). При активації

базофілів медіатори із гранул вивільняються, посилюючи запальний процес, індукуюючи розвиток анафілактичної реакції.

До агранулоцитів належать лімфоцити та моноцити. Лімфоцити (21-35 % від загальної кількості лейкоцитів) – округлі клітини діаметром 5-15 мкм з крупним, забарвленим у темно-фіолетовий колір ядром, і вузьким ободком блакитної чи синьої цитоплазми з поодинокими азуровими включеннями.

Моноцити (2-8 % від загальної кількості лейкоцитів) – крупніші клітини (12-20 мкм), ядро бобовидної форми світло-фіолетового або бузкового кольору займає більшу частину цитоплазми. Протоплазма синювата, іноді містить дрібну азурофільну зернистість. З крові моноцити мігрують у тканини, де перетворюються у тканинні макрофаги.

Кількісний склад окремих видів лейкоцитів периферійної крові характеризує функціональний стан кровотворної системи. Зміни можуть бути зумовлені захворюваннями системи крові або реакцією кровотворного апарату на розвиток різноманітних патологічних станів. Для підрахунку лейкоцитарної формули готують мазки крові з наступним фарбуванням за Романовським-Гімзи.

Практичне завдання

1. Визначення лейкоцитарної формули

Хід роботи

1. Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло слід тримати на столі або у лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфувальне скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 45° та просувають його вправо до злиття з краплею крові. Після розділення крові по ребру шліфувального скла легким швидким рухом проводять його справа наліво до тих пір, поки не буде вичерпана вся крапля (рис.4.1). Сформований мазок не повинен доходити 1,0-1,5 см до краю скла.

Правильно виготовлений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується “щіточкою”.

2. Після приготування мазки швидко висушують на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові. Мазки крові фіксують етиловим спиртом протягом 5 хв.

3. Зафіксовані мазки зафарбовують протягом 20 хв за методом Романовського-Гімзи. В основі методики лежить здатність суміші основних (азур II) і кислих барвників (водорозчинний жовтий еозин) зафарбовувати елементи клітин крові у різні кольори і відтінки. При фарбуванні за Романовським-Гімзи ядра клітин мають колір від темно-синього до фіолетового, цитоплазма зрілих гранулоцитів забарвлюється у рожевий колір, а цитоплазма лімфоцитів, моноцитів і бластних клітин – у синій. Після зафарбовування препарати крові промивають дистильованою водою і сушать на повітрі.

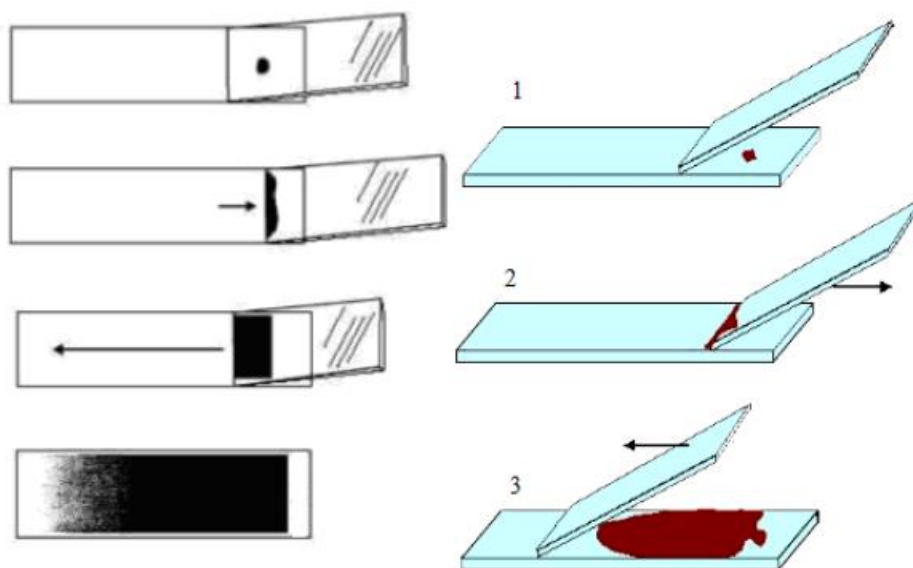


Рис. 4.1. Приготування мазка крові для визначення лейкоцитарної формули

4. Якісно зафарбований мазок розглядають під мікроскопом (окуляр×10, об’єктив×90), попередньо нанісши на скло краплю імерсійної олії. Необхідно враховувати, що клітини крові розподіляються по мазку нерівномірно, тому

для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Для уникання повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами – лінією Меандра (рис. 4.2).

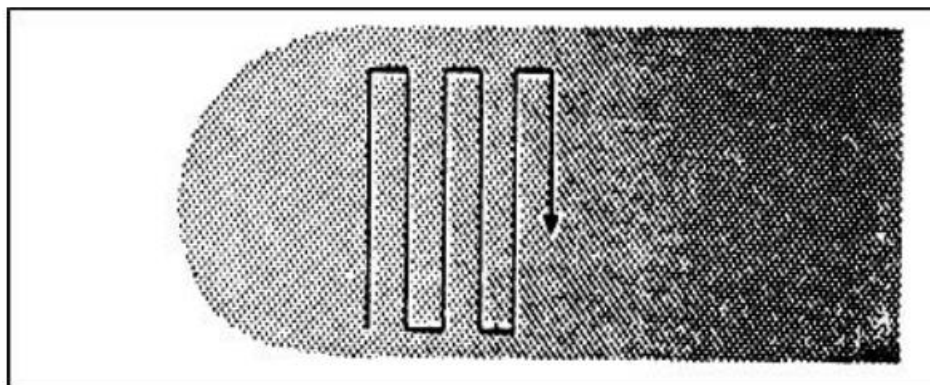


Рис. 4.2. Схема руху по мазку крові для підрахунку лейкоцитів

Починати підрахунок можна із середини зафарбованого мазка, рухаючи предметне скло зигзагами від центру до краю по всій поверхні мазка. Крупніші клітини розміщуються по краях препарату. Підраховують усі підряд клітини (всього 200 клітин), розділяючи їх в окремі популяції з урахуванням величини клітин, форми і забарвлення ядра та цитоплазми.

Отримані результати реєструють за допомогою лейкоцитарного лічильника. Визначають відсотковий вміст клітин різних популяцій у досліджуваному зразку.

Контрольні питання:

1. Розгляньте зображення клітин імунної системи, представлені на рис.4.3 (позначені літерами *a – e*). Зверніть увагу на особливості їх будови. Ідентифікуйте клітини імунної системи. Вкажіть їх назву. Опишіть особливості будови ідентифікованих Вами імуноцитів та їх функції в організмі.

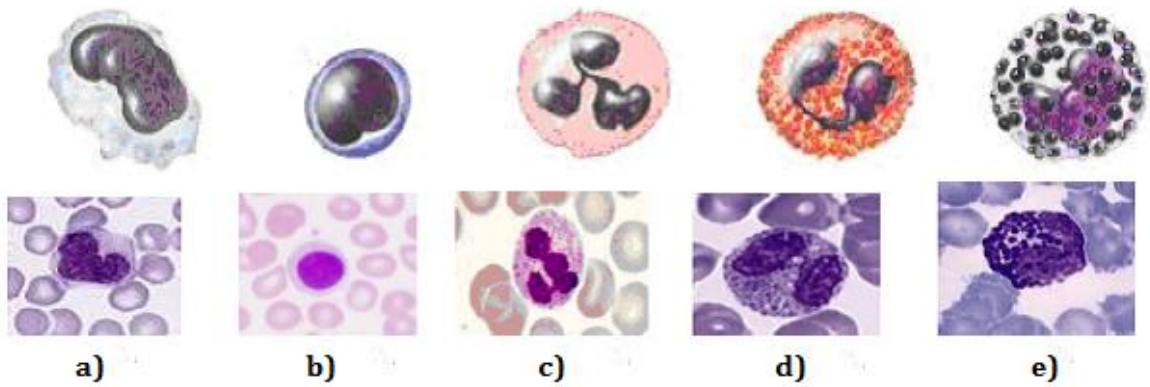


Рис. 4.3. Клітини імунної системи

Заповніть таблицю, використовуючи зображення а) – е).

| № рис. | Клітина імунної системи | Особливості будови | Функції |
|--------|-------------------------|--------------------|---------|
| a) | | | |
| b) | | | |
| c) | | | |
| d) | | | |
| e) | | | |

2. Розташуйте клітини імунної системи у ряд відповідно до відсоткового вмісту в крові (від найменшого до найбільшого). Зазначте їх відсотковий вміст у крові в нормі.



3. Назвіть основні типи клітин, що приймають участь у неспецифічній резистентності організму.

4. Опишіть основні стадії фагоцитозу.

5. Використовуючи рис. 4.4, встановіть відповідність: цифра – етап міграції лейкоциту в зону запалення.

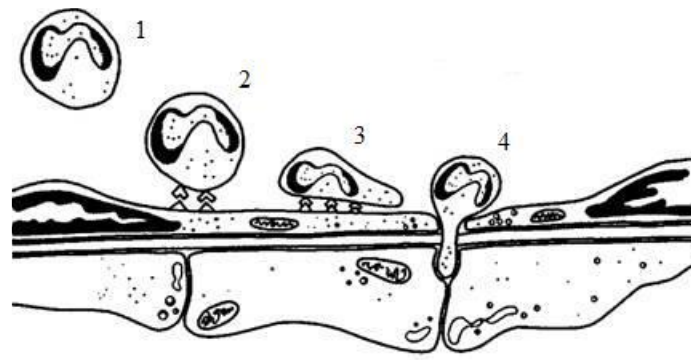


Рис.4.4 Міграція лейкоцитів

- а) діapedез
- б) ролінг
- в) адгезія
- г) активація

ПРАКТИЧНА РОБОТА 5

АДАПТИВНИЙ ІМУНІТЕТ. Т- І В-ЛІМФОЦИТИ

Мета: *вивчити субпопуляції лімфоцитів адаптивного імунітету. Отримати лімфоцентрат в градієнті щільності фікол-верографіну*

Обладнання: мікроскоп, предметне скло, піпетки, 96% спирт етиловий, сушильна шафа, центрифуги, холодильник, термостат, автоклав, мікроскоп, Фікол-400, 76 % розчин верографіну, фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), розчин Хенкса, скляні пробірки.

Теоретичні відомості

Лімфоцити – це єдині клітини організму, які здатні специфічно розпізнавати і розрізняти різні антигени і відповідати активацією на контакт з певним антигеном. Вони діляться на дві популяції, що мають різні функції і продукують різні білки.

В-лімфоцити – клітини з маркером CD20, який представлений на всіх стадіях їх розвитку. У людини В-лімфоцити дозрівають в кістковому мозку. В-лімфоцити розпізнають антигени специфічними рецепторами імуноглобулінової природи (CD19-22), які у міру дозрівання експресуються на їх мембранах. Взаємодія антигену з такими рецепторами є сигналом активації В-лімфоцитів та їх антигензалежного диференціювання в плазматичні клітини, що активно продукують і секретують специфічні для даного антигену антитіла – імуноглобуліни. При дозріванні В-лімфоцити змінюють клас імуноглобулінів, які синтезуються ними. Спочатку В-лімфоцити синтезують імуноглобуліни класу М (IgM). Окрім молекул рецепторного комплексу на поверхні В-клітин експресуються молекули гістосумісності МНС II класу, оскільки В-лімфоцити є антиген-презентуючими клітинами.

Особливістю В-лімфоцитів є те, що вони спеціалізуються на конкретних антигенах. При реакції В-лімфоцитів з антигеном, що зустрічається уперше, утворюються плазмоцити, які виділяють антитіла саме

проти цього антигену. Утворюються клони В-лімфоцитів, відповідальні за реакцію з цим конкретним антигеном. При повторній реакції розмножуються і синтезують антитіла тільки В-лімфоцити, а точніше – плазмоцити, спрямовані проти цього антигену. Інші клони В-лімфоцитів не беруть участь в реакції.

В-лімфоцити безпосередньо не приймають участь в боротьбі з антигенами. Під впливом стимулів від фагоцитів і Т-хелперів вони трансформуються в плазмоцити, які і синтезують антитіла-імуноглобуліни, які знешкоджують антигени.

Т-лімфоцити отримали свою назву у зв'язку з їх диференціюванням у тимусі. За функціями серед Т-лімфоцитів розрізняють ефекторні (CD8 цитотоксичні лімфоцити – CTL, Т-кілери) і регуляторні (CD4+ Т-хелпери-Th) субпопуляції. Т-хелпери стимулюють проліферацію і диференціювання цитотоксичних лімфоцитів, В-клітин і утворення антитіл. Тобто, Т-хелпери мають хелперну функцію (стимулюють В-лімфоцити для продукції імуноглобулінів) та індукторну функцію (стимулюють проліферацію і диференціювання цитотоксичних лімфоцитів, що відповідають на розчинні антигени проліферацією і продукцією лімфокінів).

Існує дві субпопуляції CD4+ Т-хелперів – Т-хелпери 1 і 2 типів, які не мають відмінностей за антигенною структурою, але розрізняються за набором (профілем) цитокінів, які вони здатні синтезувати у відповідь на антигенну стимуляцію, і від цього профілю залежить, який з двох основних типів імунної відповіді буде реалізований (клітинний або гуморальний).

Т-хелпери 1 типу (Th1) є активаторами клітинного імунітету, натуральних кілерів і моноцитів. Якщо наївна Т-клітина розпізнає антиген, що презентується макрофагом, то вона трансформується в Т-хелпер 1 типу. На цій клітині з'являються маркери диференціювання CD25 та CD45RB. Функція таких клітин – посилення активності макрофагів, спрямованої на знищення захопленого антигену, або приведення його в імуногенну форму. Продукуючи інтерлейкіни-2, 3, 12, ІФН- γ і ФНП- β , ГМ-КСФ, вони

викликають активацію цитотоксичних Т-лімфоцитів, натуральних кілерів, макрофагів та Т-ефектори гіперчутливості уповільненого типу. Th1 забезпечують імунітет проти вірусів, внутріклітинних бактерій і онкогенних клітин. Активність Th1 пригнічує інтерлейкін-10.

Т-хелпери 2 типу (Th2) відповідають за кооперацію з В-клітинами. Якщо Т-клітина розпізнає антиген, що розміщений на поверхні В-лімфоцитів, то це розпізнавання є сигналом до трансформації в Т-хелпери 2 типу, які забезпечують посилення продукції антитіл. На цій клітині з'являються маркери диференціювання CD25 та CD45RB. Продукуючи інтерлейкіни 4, 5, 6, 10 та 13, вони активують гуморальну імунну відповідь, В-лімфоцити й алергічне запалення. Стимулюючи продукцію плазматичними клітинами імуноглобулінів IgM, IgG4 і IgA, Th2 забезпечують імунітет проти звичайних (позаклітинних) бактерій та їх токсинів. Активація еозинофілів, тучних клітин і стимуляція синтезу імуноглобуліну Е (IgE) веде до розвитку алергії. Активність Th2 пригнічує ІФН- γ .

Т-лімфоцити, що несуть на своїй поверхні антигени CD8, мають супресорну (щодо В-лімфоцитів і продукції ними імуноглобулінів) і цитотоксичну активність. CD8 Т-супресори гальмують розвиток імунної відповіді як на власні, так і на чужі антигени, забезпечуючи імунологічну толерантність.

Цитотоксичні CD8 Т-лімфоцити (CD8⁺ CTL, Т-кілери) – це ефектори клітинної імунної відповіді, що забезпечують руйнування чужорідних клітин. Особливістю Т-клітинного рецептора є здатність розпізнавати чужорідний антиген тільки в комплексі з власними клітинними антигенами на поверхні допоміжних антиген-презентувальних клітин (дендритних або макрофагів). На відміну від В-лімфоцитів, здатних розпізнавати антигени в розчині і зв'язувати білкові, полісахаридні і ліпопротеїдні розчинні антигени, Т-лімфоцити можуть розпізнати тільки короткі пептидні фрагменти білкових антигенів, представлені на мембрані інших клітин в комплексі з власними антигенами головного комплексу гістосумісності. CD4 Т-лімфоцити здатні

розпізнавати антигенні пептиди в комплексі з антигенами гістосумісності МНС II класу, а CD8 Т-лімфоцити здатні розпізнавати антигенні пептиди в комплексі з антигенами гістосумісності МНС I класу.

Практичне завдання

1. Отримати лімфоконцентрат в градієнті щільності фікол-верографіну

Відділення чистої популяції лімфоцитів від інших формених елементів крові проводять різними способами: на колонках з різними наповнювачами (вата, скло, нейлон) або кульками з різних матеріалів, вкритих імуноадсорбентами; електрофоретичним, гравітаційним методами. Останній спосіб є найпростішим і найчастіше застосовується у імунологічних дослідженнях. При цьому часто використовується ізопікнічне центрифугування у середовищах, неоднорідних за щільністю. Під час центрифугування клітини розділяються у середовищі відповідно своєї щільності. Із клітин крові найбільшу щільність мають еритроцити і в порядку зменшення – поліморфноядерні клітини, моноцити, лімфоцити. При центрифугуванні в градієнті щільності (1,077-1,078 г/мл) клітини, які мають більшу щільність (еритроцити, гранулоцити), проникають всередину розчину за дії центробіжної сили і утворюють осад. Клітини (моноцити, лімфоцити), які мають ту ж або меншу щільність, ніж щільність розчину, не можуть проникнути в щільний градієнтний розчин і залишаються у верхньому його шарі.

У якості градієнта щільності для розділення клітин крові можна використовувати комерційний препарат Фікол-400 або суміш фіколу з рентгеноконтрастними речовинами з високою щільністю (урографін, верографін або ізопак).

Фікол – це синтетичний сополімер сахарози і епіхлоргідрину. В імунологічних дослідженнях використовують 6,1 % або 9 %-і розчини фіколу

з молекулярною масою 400 кДа. Для приготування розчину фіколу його розчиняють у теплій дистильованій воді.

Хід роботи

Завдання 1. Приготування градієнту щільності фікол-верографін

1. Підготовка фіколу – 4,32 г порошку фікол-400 розчиняють у 48 мл дистильованої води.
2. Підготовка верографіну – 10,14 мл 76 % розчину верографіну доводять дистильованою водою до 21 мл.
3. Підготовка градієнту щільності – розчини фіколу-400 і верографіну змішують. За допомогою аерометру вимірюють щільність отриманого розчину, що повинна складати 1,077 г/мл. Якщо щільність вища, ніж потрібно, то додають розчин фіколу-400, якщо нижча – розчин верографіну. Градієнт щільності можна зберігати протягом 30 діб при +40°C у посуді із оранжевого скла.

При відсутності фіколу-400 градієнт щільності можна приготувати лише із одного верографіну. З цією метою 10 мл 76 % верографіну змішати з 43,1 мл дистильованої води і додати 0,45 мл фосфатно-сольового буфера. Отриманий розчин верографіну має щільність 1,077 г/мл і може бути використаний як градієнт щільності.

Завдання 2. Отримання лімфоконцентрату.

1. Отриманий зразок крові розводять у співвідношенні 1:3 розчином Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ.
2. Розведену кров (3 мл) обережно нашаровують на 3 мл розчину фікол-верографіну з щільністю 1,077 г/мл. При цьому межа розділення фаз кров/градієнт не повинна бути порушена.
3. Врівноважені пробірки центрифугують протягом 35-40 хвилин при прискоренні 400 g.
4. У результаті центрифугування кров розділяється на 4 окремі фракції: перша фракція на дні пробірки містить еритроцити і уламки клітин крові;

друга фракція – це розчин фікол-верографіну; третя фракція, розміщена над градієнтом, утворена суспензією лімфоїдних клітин; четверта фракція утворена плазмою з еритроцитами.

Відбирають 2/3 (по висоті над фазою) рідини, а залишену 1/3 збирають разом з кільцем мононуклеарних клітин.

5. Зібрану суспензію переносять до центрифужної пробірки, додають надлишок (6-8 мл) розчину Хенкса без Ca^{2+} і Mg^{2+} або ФСБ і проводять два послідовних центрифугування (10 хвилин при 1500 об/хв) зі зміною відмиваючого розчину.

6. Отриманий осад ресуспензують у 0,5 мл розчину Хенкса і підраховують кількість мононуклеарних клітин за допомогою камери Горяєва.

7. Для подальших досліджень використовують суспензії виділених клітин з 95-98 % життєздатності.

8. Ідентифікуйте отримані фракції (на рисунку 5.1. позначені цифрами).

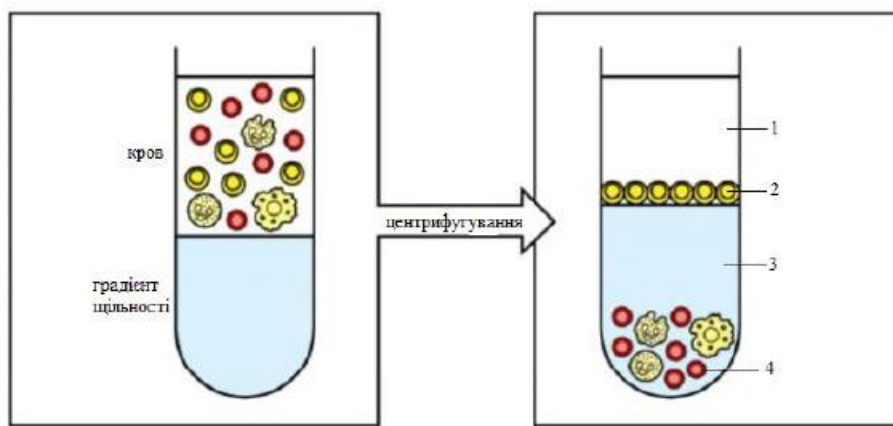


Рис. 5.1. Отримання лімфоцентрату

- 1 – _____
- 2 – _____
- 3 – _____
- 4 – _____

Контрольні питання

1. Дайте порівняльну характеристику Т- і В-лімфоцитам. Заповніть таблицю:

| Параметр | Т-лімфоцити | В-лімфоцити |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Походження | | |
| Дозрівання | | |
| Вміст у крові | | |
| Рецептор для антигену | | |
| Продукування антитіл | | |
| Участь у клітинних реакціях | | |
| Клітини пам'яті | | |
| CD-антигени | | |

2. Дайте порівняльну характеристику Т-хелперам-1 і Т-хелперам 2. Заповніть таблицю:

| Т-лімфоцити | Т-хелпери 1 | Т-хелпери 2 |
|---|--------------------|--------------------|
| Індукуючі антигени | | |
| Фактори, що посилюють дію | | |
| Цитокіни, що продукуються Т-хелперами | | |
| Реакції, у яких беруть участь Т-хелпери | | |

ПРАКТИЧНА РОБОТА 6.

НЕСПЕЦИФІЧНІ ФАКТОРИ ЗАХИСТУ ОРГАНІЗМУ

Мета: *Ознайомитись з основними клітинними і гуморальними механізмами вродженого імунітету (фагоцитоз, комплемент,). Фагоцитоз, види фагоцитуючих клітин. Стадії фагоцитозу. Завершений і незавершений фагоцитоз Комплемент, його властивості, шляхи активації. Засвоїти методи оцінки факторів вродженого імунітету організму людини.*

Теоретичні відомості

Фагоцитоз – це процес розпізнавання об’єкту фагоцитозу, його поглинання, елімінація і виведення з організму. Процес фагоцитозу можна розділити на два етапи. На першому етапі антигенвмісна структура зв’язується на поверхні мембрани фагоцитуючих клітин. На другому етапі відбувається поглинання чужорідного матеріалу і його подальше руйнування. Розрізняють два основних типи клітин фагоцитів – мононуклеарні (основні з яких моноцити/макрофаги) й полінуклеарні (в основному нейтрофіли) лейкоцити. Мононуклеарні фагоцитуючі клітини відіграють важливу роль в ініціації імунної відповіді шляхом захоплення антигену, презентації його Т-лімфоцитам і секреції цитокінів. Полінуклеарні нейтрофіли – це перша лінія захисту від проникнення в організм різноманітних бактерій, грибів і найпростіших. Фагоцитарна активність нейтрофілів, як й інших фагоцитуючих клітин, відіграє значну роль протягом всього запального процесу аж до регенерації ушкодження в тканинах. Зниження фагоцитарної функції нейтрофілів може привести до хронізації запального процесу, який з гомеостатичного може перейти в імунопатологічний, наприклад, шляхом підтримки алергічного або аутоімунного процесу за рахунок порушення фагоцитами здатності до руйнування та виведення імунних комплексів із організму. Тому визначення показників фагоцитозу має значення в комплексній оцінці і діагностиці імунodefіцитних станів при рецидивуючих

гнійно-запальних процесах, алергічних, аутоімунних захворюваннях, післяопераційних ускладненнях та ін. Найінформативнішими показниками для оцінки активності фагоцитозу вважають фагоцитарний показник та фагоцитарне число.

Ознайомлення з методом визначення активності фагоцитозу

Принцип методу: метод базується на фагоцитозі нейтрофілами часток (наприклад, дріжджів), які візуалізуються в цитоплазмі клітин у вигляді гранул синього кольору.

Реактиви та обладнання

1. Дріжджі сухі гранульовані.
2. 0,9 % NaCl.
3. $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (натрій лимоннокислий).
4. Фарба-фіксатор Май-Грюнвальда.
5. Фарба Романовського-Гімзи.
6. Масло імерсійне для мікроскопії.
7. Спирт етиловий 960.
8. Ефір.
9. Вода дистильована.
10. Дозатори медичні лабораторні з наконечниками.
11. Центрифуга лабораторна.
12. Термостат.
13. Мікроскоп бінокулярний, об'єктив ($\times 100$), окуляр ($\times 7$).
14. Лейкоцитарний лічильник.

Хід роботи

Завдання 1. Підготовка реактивів для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів з використанням дріжджів.

- 1.1. 3,8% розчин натрію лимоннокислого: наважку натрію лимоннокислого 3,8 г перенести в мірну колбу ємністю 100 мл, розчинити в дистильованій

воді та довести об'єм до мітки. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі від +4-6°C протягом одного тижня.

1.2. Робочий розчин фарби Романовського-Гімзи: робоче розведення готової фарби повинен визначати дослідник шляхом титрування; готують декілька розведень – 1, 2, 3 краплі барвника на 1 мл дистильованої води, далі фарбують мазки різними розведеннями, обирають мазок із найкращим забарвленням, чим і визначають титр барвника. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком при температурі +4-6°C протягом одного місяця.

1.3. Суміш Нікіфорова: змішати 1 об'єм спирту етилового 96° з 1 об'ємом ефіру. Розчин зберігати в флаконах з темного скла з притертим корком у прохолодному місці, віддаленому від вогню.

1.4. Підготовка предметних скелець до роботи: занурити предметні скельця у суміш Нікіфорова не менше ніж на 2 год. Оброблене предметне скло витягнути із суміші за допомогою пінцета, протерти марлею або фланеллю.

Завдання 2. Підготовка суспензії дріжджів.

Свіжі або ліофілізовані пекарські дріжджі розводять фізіологічним розчином у співвідношенні об'єм/об'єм 1:5 і витримують на киплячій водяній бані протягом 60 хв. Отриману концентровану суспензію дріжджів центрифугують при 1000 об/хв протягом 10 хв. Для приготування робочого розчину додають 0,1 мл осаду дріжджів на 10 мл фізіологічного розчину.

Завдання 3. Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів з дріжджами.

1. До 100 мкл крові, стабілізованої гепарином, додати 50 мкл робочого розчину дріжджів. Обережно перемішати.

2. Поставити в термостат на 30 хвилин (+37°C). Кожні 10 хвилин суспензію обережно перемішувати.

3. Приготувати мазок. Для цього дозатором лабораторним з верхнього шару клітин відібрати 7-8 мкл лейкоконцентрату, перенести його на предметне скло і рівномірно розподілити по поверхні скла тонким шаром за допомогою шліфувального скла.

4. Поставити пробірку на інкубацію в термостат ще на 60 хвилин (+37°C). Кожні 10 хвилин суспензію обережно перемішувати.
5. Через 60 хв приготувати мазок.
6. Мазок висушити на повітрі.
7. Провести фіксацію препаратів у етиловому спирті (96°) 15 хвилин.
8. Зафарбувати мазки за Паппенгеймом (комбіноване фарбування за Май-Грюнвальдом та Романовським-Гімзи). Для цього мазки зафіксувати фарбою-фіксатором Май-Грюнвальда протягом 40 с. Час фіксації контролювати секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі. Після цього мазки зафарбувати робочим розчином фарби Романовського-Гімзи протягом 20 хвилин. Час фарбування контролювати секундоміром. Фарбу змити дистильованою водою, мазок висушити на повітрі при кімнатній температурі.
9. Провести оцінку результатів. Визначати фагоцитарний індекс, фагоцитарне число.

Підрахунок результатів проводять за допомогою мікроскопу з використанням імерсійного об'єктиву ($\times 100$), окуляр ($\times 7$). Підрахунок проводять на 200 нейтрофілів і визначають відсоток тих клітин, які містять у своїй цитоплазмі клітини дріжджів (включення синього кольору).

Вираховують показники, які характеризують стан фагоцитозу:

Фагоцитарний показник (ФП) – відсоток нейтрофілів, які беруть участь у фагоцитозі.

Фагоцитарне число – середня кількість дріжджів, захоплених одним нейтрофілом крові. Характеризує поглинальну здатність нейтрофілів.

Норма:

Фагоцитарний показник – 50-80 %.

Фагоцитарне число – 4-9.

Питання для обговорення.

1. Чинники неспецифічного імунного захисту організму людини. Переваги і недоліки механізмів неспецифічної резистентності.

2. Клітини та рецептори вродженого імунітету. Фагоцитоз.
3. Комплемент, його компоненти. Лізоцим; його природа. Інтерферони.
4. Практичне значення визначення комплексу, лізоциму, фагоцитозу та інших показників неспецифічного захисту організму.

Контрольні питання:

1. Дайте визначення терміну фагоцитоз

а) Опишіть функції фагоцитів:

- а) _____
- б) _____
- в) _____
- г) _____
- д) _____
- ж) _____

б) Опишіть фази фагоцитозу.

Надайте пояснення термінам:

Завершений фагоцитоз –

незавершений фагоцитоз –

в) Надайте характеристику механізмам мікробіоцидності.

| Киснево залежний механізм | Киснево незалежний механізм |
|---------------------------|-----------------------------|
| | |

2. Ознайомтесь із схемою активації комплементу (рис.6.1). Надайте характеристику системі комплементу. Опишіть її функції.

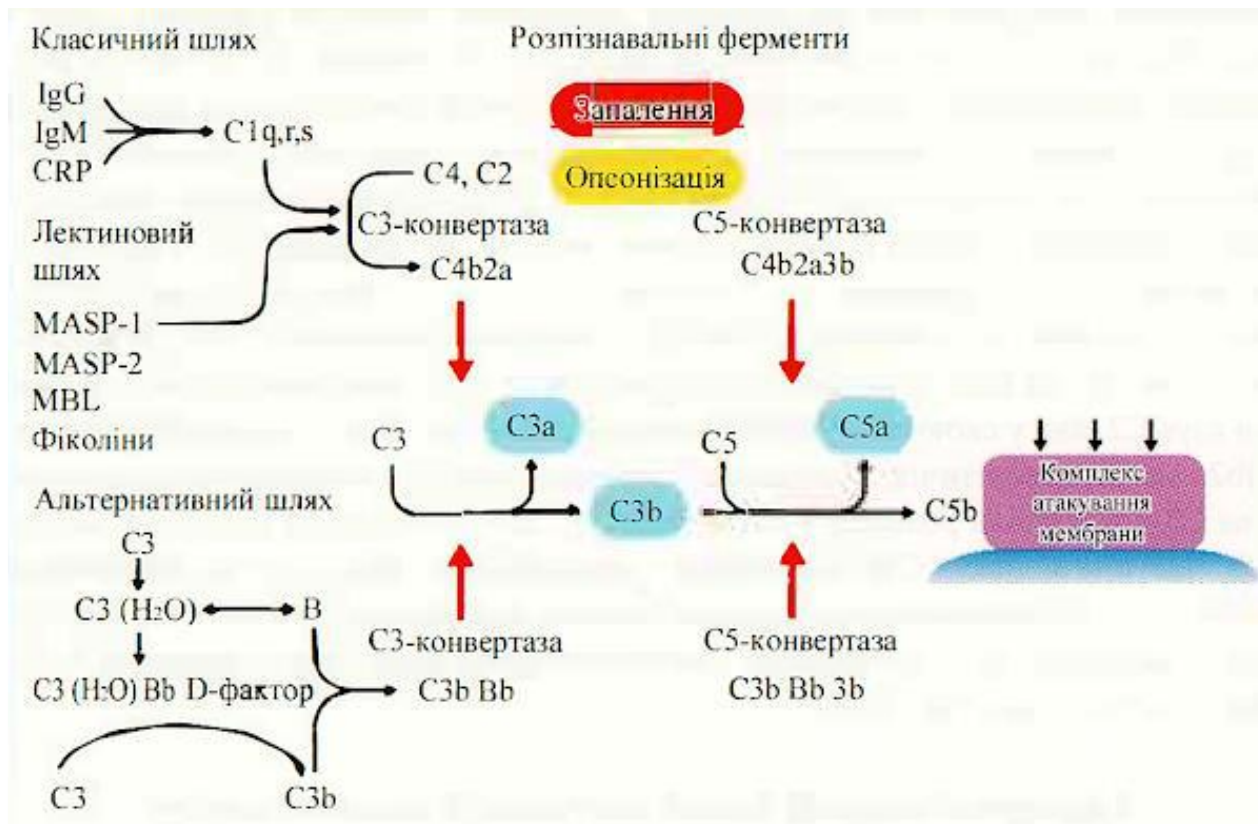


Рис.6.1 Схема активації комплементу

3. Вирішити тести та обґрунтувати надану відповідь.

| Тест | Пояснення |
|--|-----------|
| <p>1. Для прискорення загоєння рани слизової оболонки в ротовій порожнині хворому призначено препарат, який являє собою термостабільний білок, що міститься у людини в сльозах, слині, грудному молоці матері, а також його можна виявити в свіжознесеному курячому яйці. Відомо, що він являє собою фактор природної резистентності організму і має назву:</p> <p>A. Лізоцим B. Комплемент C. Інтерферон D. Інтерлейкін E. Іманін</p> | |

| | |
|--|--|
| <p>2. При визначенні фагоцитарної активності лейкоцитів, через 2 години від моменту проведення дослідження, кожен лейкоцит захопив в середньому по 9 мікроорганізмів. Через 7 годин в кожному лейкоциті виявлено не більше 5-ти мікроорганізмів. Яке фагоцитарне число?</p> <p>A. 9 B. 7 C. 16 D. 2 E. 1,3</p> | |
| <p>3. У хворого з клінічними ознаками первинного імунодефіциту виявлено порушення функції антигенної презентації імунокомпетентним клітинам. Дефект структур яких клітин є можливим?</p> <p>A. Т-лімфоцити B. В-лімфоцити C. Фібробласти D. Макрофаги, моноцити E. 0-лімфоцити</p> | |

ПРАКТИЧНА РОБОТА 7

БУДОВА ТА ФУНКЦІЇ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

Мета: *Вивчити основні властивості імуноглобулінів. Етапи синтезу антитіл. Валентність, спорідненість, авідність антитіл. Взаємодія антитіл з антигенами.*

Теоретичні відомості

Авідність – ступінь міцності зв'язування антитіл з антигеном, зумовлений як афінністю взаємодії між епітопом й паратопом, так і валентністю антитіл і антигену.

Аглотинація – агрегація (склеювання) у великі конгломерати і випадання в осад з однорідної суспензії нерозчинних часточок або клітин – бактерій, або еритроцитів за наявності електроліту, зумовлена адсорбцією антитіл на поверхні корпускулярного антигену.

Аглютиніни – антитіла, здатні склеювати корпускулярні антигени (бактерії, еритроцити) і зумовлювати їх аглютинацію. Вони належать до імуноглобулінів класів G і M.

Ад'ювант – речовина, яка неспецифічно стимулює імунну відповідь на антиген; фактори різного походження та складу, що стимулюють діяльність імунної системи.

Активний центр антитіл (паратоп, антигенна детермінанта, рецепторна зона) – ділянка молекули антитіла, яка є структурою, комплементарною детермінантній групі антигену (епітопу).

Антитіла – глобулярні білки (глікопротеїни) класу імуноглобулінів, що здатні до специфічного зв'язування з антигеном й утворюються в організмі у відповідь на введення в нього чужорідних речовин. Основними продуцентами антитіл є плазматичні клітини, що утворюються внаслідок гуморальної імунної відповіді на гомологічний антиген. У людини виділяють 5 класів імуноглобулінів: G, M, A, D, E.

Антитіла моноклональні – структурно- й функціонально гомогенні імуноглобуліни, синтезовані одним клоном плазмоцитів.

Варіабельна ділянка – частина легких і важких ланцюгів імуноглобулінів, яка характеризується значною мінливістю вмісту амінокислот.

Імунний комплекс – продукт реакції антиген-антитіло, який у своєму складі може містити компоненти системи комплементу.

Імуноглобуліни – антитіла, складні білки-глікопротеїни, які специфічно зв'язуються з чужорідними речовинами – антигенами; основні ефектори гуморального імунітету. Містяться в глобуліновій фракції сироватки крові, лімфі (циркулюючі антитіла), молозиві, слині (секреторні антитіла) та на поверхні клітин (зв'язані з мембраною антитіла)

Імуноглобулін А – імуноглобулін, що знаходиться в моно-, ди-, полімерній формі у сироватці крові (10-15 % усіх імуноглобулінів), секреторних рідинах, а також на поверхні слизової оболонки. Синтезується плазматичними клітинами скупчень лімфоїдної тканини під слизовою оболонкою, а також у селезінці та лімфатичних вузлах і відіграє особливу роль у забезпеченні місцевого захисту від вірусних інфекцій. Розрізняють сироватковий і секреторний імуноглобулін А.

Імуноглобулін М – найбільш ранній імуноглобулін (5-10 % усіх Ig). IgM першим синтезується в організмі плоду, а також при первинній імунній відповіді. У сироватці крові людини знаходиться у формі пентамера. IgM-пентамер складається із п'яти основних одиниць, пов'язаних між собою дисульфідними містками. IgM знаходиться на поверхні клітини і виконує функцію рецептора. Високий вміст IgM до певного антигену свідчить про гострий перебіг інфекції. IgM зумовлює аглютинацію та преципітацію, зв'язує комплемент. IgM зумовлює імунітет проти кишкових інфекцій.

Імуноглобулін G – 70-80 % усіх Ig. Це єдиний клас імуноглобулінів, що проникає через плаценту і забезпечує захист від інфекційних хвороб у перші тижні життя дитини. Максимальна кількість IgG виробляється при

вторинній імунній відповіді. Високий вміст у сироватці крові хворого свідчить про період реконвалесценції (одужання). Нейтралізує віруси, токсини, зв'язує комплемент, активує фагоцити. 52 % IgG міститься в сироватці крові, а 48 % – у тканинних рідинах організму.

Імуноглобулін Е – імуноглобулін, що знаходиться в сироватці крові у незначних концентраціях (0,002 % усіх Ig). При алергічних захворюваннях рівень його підвищується. IgE зв'язується з Fc-рецепторами мастоцитів і базофільних гранулоцитів і при повторній взаємодії з антигеном спричиняє їх дегрануляцію з вивільненням гістаміну.

Імуноглобулін D – імуноглобулін, який у нормі знаходиться в сироватці людини в незначній концентрації (0,2 % усіх Ig). Разом із IgM є основним мембранним рецептором В-лімфоцитів. За будовою схожий на IgG, але через плаценту не проникає. Не зв'язує комплемент

Fab-фрагмент – фрагмент, що утворюється у процесі руйнування молекули імуноглобуліну папаїном; має одну ділянку зв'язування антигену, тобто може його зв'язувати, але не може його преципітувати.

Fc-фрагмент – фрагмент, що утворюється при руйнуванні молекули імуноглобуліну папаїном; з антитілом не зв'язується, але опосередковує ефекторні реакції (фіксація комплементу, опсонізація, об'єднання з моноцитами і проникнення крізь плаценту).

Питання для обговорення:

1. Етапи синтезу антитіл.
2. Валентність, спорідненість, авідність антитіл.
3. Взаємодія антитіл з антигенами.
4. Імунні комплекси.
5. Особливості будови антитіл різних класів.
6. Фізико-хімічні параметри та біологічні властивості фрагментів молекули імуноглобулінів, отриманих під час розщеплення нативної молекули різними ферментами.

7. Механізми підтримання стабільності молекули антитіла.
8. Будова константних та варіабельних фрагментів молекули антитіла.
9. Механізми антигенної різноманітності молекул антитіл.
10. Процеси, що відбуваються під час перебудови генів легких і важких ланцюгів імуноглобулінів. У якій послідовності відбувається переключення синтезу антитіл різних класів?
11. Механізми, що забезпечують різноманітність антитіл у людини.
12. Підходи до класифікації антигенів.

Контрольні питання:

1. Вкажіть, структура яких імуноглобулінів зображена на рисунку 7.1.

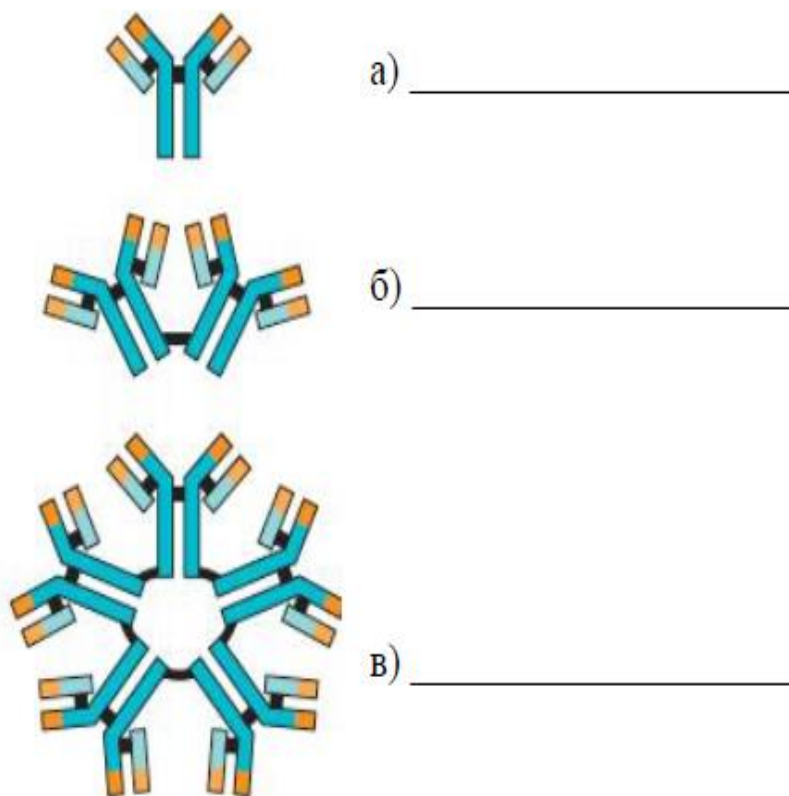


Рис. 7.1 Структура імуноглобулінів

2. Дайте порівняльну характеристику імуноглобулінів різних класів.
Заповніть таблицю:

| Властивості імуноглобулінів | Ig G | Ig M | Ig A | Ig D | Ig E |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Мол.маса, тис. дальтон | | | | | |
| Кількість мономерів | | | | | |
| Вміст у сироватці, мг/мл | | | | | |
| Здатність проходити через плаценту | | | | | |
| Зв'язування й активація комплементу класичним шляхом | | | | | |
| Нейтралізація токсинів | | | | | |
| Виконують роль опосонінів | | | | | |
| Вміст вуглеводів, % | | | | | |
| Валентність | | | | | |

3. Вкажіть, які структурні фрагменти молекули імуноглобуліну зображені на рисунку 7.2 під цифрами 1-6.

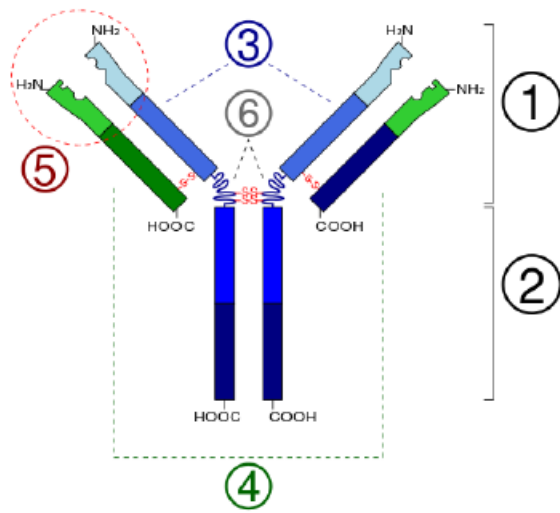


Рис.7.2 Структурні фрагменти молекули імуноглобуліну

- 1 – _____
- 2 – _____
- 3 – _____
- 4 – _____
- 5 – _____
- 6 – _____

ПРАКТИЧНА РОБОТА 8

МЕТОДИ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Мета: *засвоїти основні принципи проведення неконкурентних та конкурентних імуноаналізів на прикладі імуноферментного аналізу (ІФА).*

Теоретичні відомості

Імуноаналізами називають такі методи якісного та кількісного визначення розчинних речовин, в основі яких лежить взаємодія антигенів з антитілом (тобто імунологічне розпізнавання), яке візуалізується за допомогою спеціальної мітки, заздалегідь кон'югованої або з антитілом, або з антигеном. Методи імунного аналізу широко увійшли в медичну практику. У всіх областях сучасної медицини використовується імунний аналіз, переважно, з діагностичною та аналітичною цілями. Особливо важливо, що вони дають можливість ідентифікувати біологічні компоненти (гормони, ферменти, нейропептиди, продукти імунної системи, антигени, тощо) в низьких і дуже низьких концентраціях. Всі продукти, проти яких можливе отримання антитіл, виявляються цими методами. Імунний аналіз ґрунтується на взаємодії антигену (АГ) і антитіла (АТ) з використанням різних варіантів мічення одного з компонентів (фермент, радіонуклід, флуоресцентний барвник та інші). Оцінка реакції проводиться автоматично на спеціальній апаратурі, що дозволяє стандартизувати ці методи. В залежності від типу мітки та умов виконання тесту імунний аналіз позначається як імуноферментний (ІФА), радіоімунний (РІА), імунофлуоресцентний та інші.

При постановці реакцій в один або декілька етапів вони позначаються як прямі або непрямі. Має значення середовище, в якому проводиться реакція. Якщо реакція проводиться з реагентами, фіксованими на поверхні, то тест позначається як твердофазний, наприклад ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Перші розробки імуноаналізів були у так званих гомогенних варіантах, або без розділення компонентів, тобто у розчині. Але незабаром стали використовувати тверду фазу, аналізи стали називати твердофазними або з розділенням компонентів.

Технологічно твердофазні аналізи зручніші за гомогенні, і в даний час використовують переважно твердофазні варіанти методик ІФА. На тверду фазу сорбують або антиген, або антитіло. У якості такої фази використовують наступні матеріали: пластмасу у вигляді стандартно штампованих мікропанелей (96 або 60 лунок), для постановки одиничних проб у пробірках; пористі матеріали типу нітроцелюлози у вигляді наповнювачів в об'ємі або у вигляді плоских листів чи смужок. У пористих матеріалах частина реагентів фіксовано сорбована, інша частина дифундує по порах.

Метод базується на специфічному зв'язуванні АТ з АГ, при цьому один з компонентів кон'югований з ферментом. В результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, кількість якого можна визначити фотометрично (рис. 8.1).

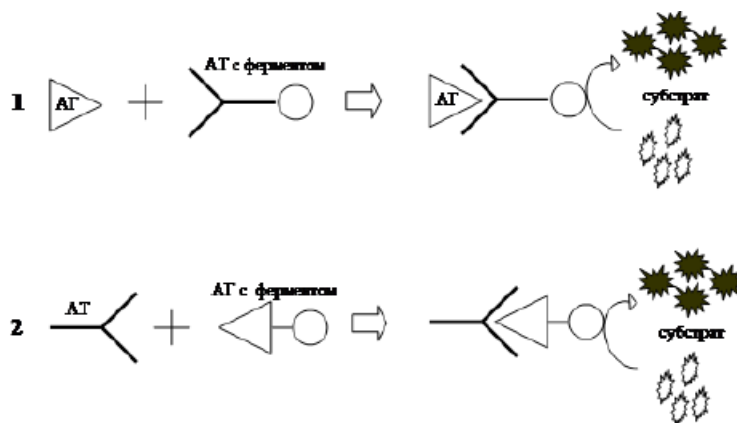


Рис. 8.1. Основний принцип ІФА. 1) Для виявлення антигенів. 2) Для виявлення антитіл.

Будь-який варіант ІФА містить **3 обов'язкові стадії**: 1) стадія впізнавання тестованої сполуки специфічним до неї антитілом, що призводить до утворення імунного комплексу; 2) стадія формування зв'язку

кон'югату з імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування;
3) стадія перетворення ферментної мітки в реєстрований сигнал.

2.1. Класифікація ІФА. В основу класифікації методів ІФА покладено кілька підходів:

I. За типом реагентів, присутніх на першій стадії ІФА, розрізняють **конкурентний і неконкурентний методи.**

А) У конкурентному ІФА на першій стадії в системі присутні одночасно аналізована сполука і її аналог, мічений ферментом і конкуруючий за центри специфічного зв'язування з нею.

Б) Для неконкурентних методів характерна присутність в системі на першій стадії тільки аналізованої сполуки і специфічних до неї центрів зв'язування.

II. Всі методи ІФА поділяють на гомогенні та гетерогенні.

Якщо всі три стадії ІФА проходять в розчині і між основними стадіями немає додаткових етапів відмивання (відділення імунних комплексів, які утворюються від компонентів, що не прореагували), – метод належить до групи гомогенних.

Для гетерогенних методів характерне проведення аналізу в двофазній системі за участю твердої фази – носія, і обов'язковою є стадія відмивання. Гетерогенні методи, в яких формування імунних комплексів на першій стадії протікає на твердій фазі, називають твердофазними методами.

III. Прямі імуноаналізи

Прямими називають імуноаналізи, у яких мітку приєднують або до заданого антигену, або до специфічного проти заданого антигену антитіла безпосередньо. Прямий варіант використовують у гомогенних системах і деяких гетерогенних: у конкурентному, інгібіторному, сандвіч-ІФА та імуноферментнометричному аналізі.

IV. За принципом визначення тестованої речовини:

А) Пряме визначення концентрації речовини (антигену чи антитіла) за кількістю центрів зв'язування, які з ним провзаємодіяли. У цьому випадку

ферментна мітка буде знаходитися в утвореному специфічному комплексі АГ-АТ. Концентрація речовини, яка визначається буде прямо пропорційною до зареєстрованого сигналу.

2.2. Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА.

I. Мітки. Ферментні мітки мають потужну каталітичну дію, одна молекула ферменту може реагувати з великою кількістю молекул субстрату. Таким чином, фермент, присутній у незначних кількостях, може виявити і кількісно визначити продукти, які утворились у реакції, яка цим ферментом каталізується. Найбільше застосування знайшли пероксидаза хрому (ПХ), лужна фосфотаза (ЛФ) і β -D-галактозидаза. Всі три стабільні і каталізують високочутливі реакції.

II. Субстрати. Найчастіше використовують хромогенні субстрати, які, руйнуючись, утворюють забарвлену речовину. Перспективним є використання високоенергетичних субстратів – флуоресцентних, хемілюмінесцентних. Застосування таких субстратів дозволяє теоретично підвищити чутливість ІФА на два порядки.

III. Антигени та антитіла. АГ і АТ, які використовують в ІФА, повинні бути добре очищеними і високоактивними. Крім того, АГ повинні володіти високою антигенністю, оптимальною щільністю і кількістю антигенних детермінант, чужорідністю і гомогенністю. Одним з найважливіших реагентів в ІФА є антитіла. Чутливість ІФА залежить від концентрації, активності та специфічності задіяних антитіл. Ці антитіла можуть бути полі- або моноклональними, різного класу (IgG або IgM) і підкласу (IgG1, IgG2). Чутливість і специфічність методу підвищується при використанні моноклональних антитіл. У цьому випадку з'являється можливість виявляти низькі концентрації АГ (АТ) у досліджуваних зразках.

IV. Утворення кон'югату. Кон'югат – це антиген або антитіло, мічені ферментної міткою. Утворення кон'югату – один з важливих етапів проведення ІФА. При формуванні кон'югату підбирають оптимальний метод введення ферментної мітки, щоб обидва компоненти кон'югату зберігали

свою біологічну активність: фермент – здатність взаємодіяти з субстратом, а антиген або антитіло – антигенність або антигензв'язуючу активність, відповідно. Наявність міченого, високоочищеного антигену дозволяє використовувати **конкурентні методи**. У цьому випадку на кінцевому етапі можна вимірювати активність кон'югату, не пов'язаного з іммобілізованими антитілами, що дозволяє уникнути процедури відмивання і робить аналіз більш зручним. Однак антигени різноманітні за своїми фізико-хімічними властивостями і будовою, а значить, неможливо розробити загальні механізми для отримання кон'югату з антигеном. У цьому випадку одержання кон'югату антигену з ферментом представляє собою окрему складну задачу. Приготування мічених антитіл для ІФА методично більш доступне.

V. Тверда фаза. В якості твердої фази для проведення ІФА можна застосовувати різні матеріали: полістирол, полівінілхлорид, поліпропілен та інші речовини. Твердою фазою можуть служити стінки пробірки, 96-ямоквий та ін. планшети, кульки, намистини, а також нітроцелюлозні й інші мембрани, які активно сорбують білки. Іммобілізація антигену або антитіл на твердій фазі можлива трьома шляхами: пасивна адсорбція, заснована на сильних гідрофобних взаємодіях між білками і синтетичної поверхнею; ковалентне прикріплення до твердої фази; імунохімічне та ін. (нековалентне і неадсорбційне приєднання). Антиген, іммобілізований імунохімічно, у 10 разів активніший, ніж пасивно адсорбований антиген.

2.3. Варіанти постановки ІФА.

В даний час використовується величезна кількість всіляких різновидів і модифікацій ІФА. Широке розповсюдження одержали різні варіанти твердофазного ІФА (ELISA) (рис. 8.2).

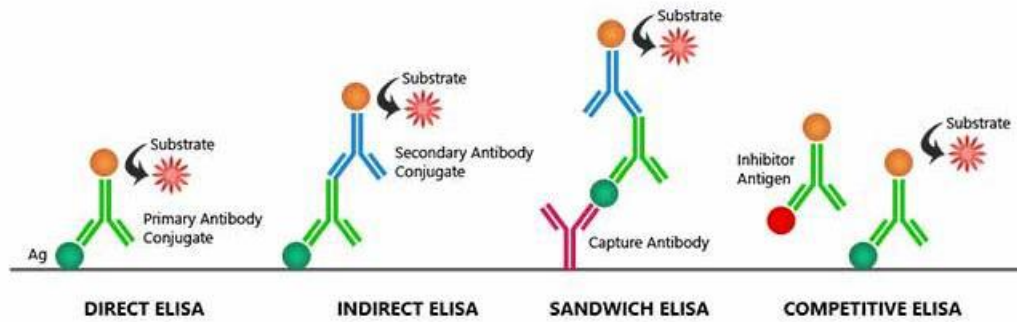


Рис. 8.2. Різновиди твердофазних ІФА

Основні принципи твердофазного ІФА, незалежно від модифікації, полягають в наступному:

1. На 1 етапі реакції адсорбують антигени або антитіла на твердій фазі. При цьому всі не пов'язані з твердою фазою реагенти легко видаляються відмиванням.
2. У сенсibiliзованих лунках інкубують досліджуваний зразок. У лунках з позитивним контролем – стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.
3. При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії з субстратом. Інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, вираженість фарбування можна оцінити візуально або за оптичною щільністю.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу – процедура відмивання від незв'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі і трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб

може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу – вошера, або вручну – багатоканальною піпеткою.

Прямий ІФА.

1. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла (досліджуваний матеріал). АГ істотно відрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїнів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, іммобілізований на твердій фазі, – це клітини та інші корпускулярні антигени. В якості контролю використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься антиген, і негативним контрольним зразком, де свідомо не міститься досліджуваний антиген.

2. В лунки вносять мічені ферментом антитіла або антигени (кон'югат), інкубують. Зв'язування кон'югату з твердою фазою буде відбуватися лише у випадку комплементарності обох компонентів системи. Після інкубації лунки відмивають, видаляючи, таким чином, не зв'язану частину кон'югату.

3. Потім у лунки вносять субстрат, специфічний до ферменту, інкубують. Після досягнення оптимального рівня фарбування в лунках з позитивним контролем, ферментативну реакцію зупиняють.

5. Облік реакції. Спочатку результати реакції враховують візуально. Для більш точного обліку результатів інтенсивність фарбування оцінюють на ІФА-рідері з відповідним світлофільтром. За результатами проведеного аналізу будують графік залежності оптичної щільності від концентрації.

Непрямий ІФА. Цей варіант ІФА використовують зазвичай для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують з зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.) Специфічні антитіла, що зв'язалося з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату (рис. 8.3).



Рис. 8.3. Схематичне зображення непрямого ІФА

Реакція методично проста. Основні етапи непрямого ІФА для визначення антитіл:

- 1) Антиген адсорбують на твердій фазі, потім відмивають від незв'язаних компонентів.
- 2) Блокують вільні місця зв'язування. Відмивають.
- 3) В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують і потім проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять проби з позитивним і негативним контролюми.
4. Додають антиглобулінової кон'югат, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.
5. Вносять субстрат, інкубують. Після досягнення оптимального рівня фарбування в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють.
6. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-рідері.

За оптимальних умов проведення аналізу цей метод високоспецифічний і чутливий. Він дозволяє виявляти нанограмові кількості антитіл у сироватках досліджуваних хворих.

«Сендвіч» - варіант ІФА для виявлення антигенів.

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати кілька епітопів, здатних зв'язувати антитіла. При проведенні

цього варіанту ІФА високоспецифічні полі- або моноклональні АТ, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після процедури відмивання в лунки вносять мічені ферментом антитіла (кон'югат) до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції (рис. 8.4).



Рис. 8.4. Схематичне зображення сендвіч-ІФА.

Основні етапи аналізу:

1. На твердій фазі мобілізують АТ.
2. У лунки панелі вносять досліджуваний зразок, паралельно ставлять позитивний контрольний зразок і негативний контрольний зразок у різних розведеннях. Інкубують і відмивають.
3. В лунки вносять мічені ферментом АТ – кон'югат. Після інкубації проводять відмивання.
4. Вносять субстрат, інкубують. Реакцію зупиняють при досягненні оптимального фарбування в лунках з позитивним контролем.
5. Облік результатів здійснюють на ІФА-рідері.

Основною перевагою методу є висока чутливість, що перевершує можливості інших схем ІФА.

Конкурентний ІФА. Цей варіант аналізу заснований на конкуренції мічених (кон'югат) і немічених (досліджуваних) антитіл за зв'язування з антигеном, адсорбованим на твердій фазі. Кількість ферменту, який приєднався до твердої фази, зменшиться пропорційно вмісту в суміші вільних антитіл. Для визначення антигену використовується той же варіант,

але в цьому випадку досліджуваний антиген конкурує з міченим, стандартним антигеном за зв'язування з антитілами, іммобілізованими на поверхні твердої фази. Конкурентний метод вимагає мінімальної кількості операцій, незначних витрат реагентів і легко може побут автоматизований. Цей варіант ІФА застосовується для визначення різних сполук, таких як імуноглобуліни людини, раково-ембріональний антиген, інсулін та ін. Він дозволяє виявляти антитіла до діагностично значимих епітопів інфекційних агентів.

Основні етапи аналізу для виявлення антигену:

1. На твердій фазі мобілізують специфічні для досліджуваного антигену моноклональні антитіла.
2. У лунки панелей вносять у відомій концентрації антиген, мічений ферментом, і досліджуваний зразок. Проводять інкубацію та відмивання. Паралельно в сусідніх лунках ставлять позитивний і негативний контролі.
3. Додають субстрат, інкубують, зупиняють реакцію при розвитку оптимального фарбування в лунках з позитивним контролем.
4. Облік реакції здійснюють на ІФА-рідері. У цьому випадку кількість антигену в досліджуваному зразку обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі.

Інгібіторний ІФА. У цьому варіанті ІФА антиген, присутній у досліджуваному зразку, зв'язується з моноклональними антитілами, міченими ферментної міткою, та інгібує їх взаємодію зі стандартним антигеном, іммобілізованим на твердій фазі. Присутність у зразку навіть слідових кількостей специфічного до кон'югату антигену буде пригнічувати зв'язування мічених антитіл з іммобілізованим антигеном. Ступінь інгібування прямо пропорційна вмісту антигену у розчині.

Концентрація досліджуваного антигену обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі. ІФА може використовуватися не тільки для визначення розчинного антигену чи антитіла, але і клітин, що виробляють різні білки.

Контрольні питання

1. Ознайомтесь з основними методами імунологічних досліджень. Складіть схему, яка відображала б основний принцип ІФА.
2. Складіть схеми прямого та непрямого ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження. Схематично зобразіть сендвіч ІФА, конкурентний ІФА, інгібіторний ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження.
3. Тестові завдання (вирішити та обґрунтувати надану відповідь).

| Тест | Пояснення |
|--|-----------|
| <p>1. У пологовому будинку спалах кору. Материнські антитіла якого класу можуть забезпечити несприйнятливості новонародженого до вірусу кору?</p> <p>A. Ig G B. Ig M C. Ig A D. Ig D E. Ig E</p> | |
| <p>2. Гуморальний імунний захист відіграє важливу роль при багатьох інфекційних захворюваннях. Яка дія не є властивою для антитіл?</p> <p>A. Опсонізуюча B. Активація комплементу C. Фагоцитуюча D. Нейтралізуюча E. Активація клітинної цитотоксичності</p> | |
| <p>3. Імунна система за допомогою клітинних та гуморальних механізмів забезпечує розпізнавання, зв'язування та руйнацію антигенів. Основними класами імуноглобулінів крові, що реалізують гуморальну імунну відповідь на вторгнення чужорідного антигену, є:</p> <p>A. Ig A та Ig E B. Ig D та Ig A C. Ig G та Ig M D. Ig A та IgM E. Ig E та Ig D</p> | |

| | |
|---|--|
| <p>4. У хворого діагностовано ГРВІ. У сироватці крові знайдено імуноглобуліни класу М. Який період інфекційного процесу в даному випадку</p> <p>А. Гострий період. В. Продромальний період. С. Інкубаційний період. D. Реконвалесценція. Е. Мікробоносійство.</p> | |
|---|--|

ПРАКТИЧНА РОБОТА 9

АНТИГЕНИ ТА ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Мета: Вивчити основні властивості антигенів Повноцінні і неповноцінні антигени. Аутоантигени. Групові антигени еритроцитів людини. Ознайомитись з реакціями визначення груп крові (системи АВ0) за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток.

Теоретичні відомості

Антигени – це біополімери, що входять до складу структурних елементів клітин або відокремлені від них, які здатні зумовлювати імунні реакції: синтез антитіл, активацію клітинного імунітету, підвищену чутливість, імунну пам'ять або імунологічну толерантність.

Повні антигени – сполуки, що здатні самостійно індукувати синтез специфічних антитіл і взаємодіяти з ними *in vitro* та *in vivo*.

Неповні антигени (заптени) – це субстанції, які не здатні самостійно викликати імунну відповідь, однак набувають цієї здатності після кон'югації з високомолекулярними, наприклад білковими, молекулами або в суміші з деякими речовинами.

Антигенність – це здатність антигену зв'язуватися з антитілом.

Імуногенність – це здатність антигену викликати імунну відповідь.

Антигенність визначається переважно хімічним складом і структурою антигену.

Імуногенність, крім того, зумовлена індивідуальною імунологічною реактивністю організму, а також його видовою належністю.

Класифікація антигенів:

Аутоантигени: Органоспецифічні антигени (щитовидна залоза, кришталик, сім'яники, клітини ЦНС) – аутоімунні захворювання.

Ідіотипічні антигени: Імуноглобулін-специфічні антигени антитіл, синтезованих одним клоном В-клітин) – регулювання синтезу антитіл, переключення класів імуноглобулінів.

Алоантигени (ізоантигени): Антигени гістосумісності, груп крові особин одного біологічного виду – реакції трансплантаційного імунітету, гемолітична хвороба новонароджених.

Ендогенні та ксеногенні антигени: ниркові та серцеві антигени, що реагують перехресно з антигенами бета гемолітичного стрептокока – роль у патогенезі гломерулонефриту, колагенозів.

Антигени різного походження: Мікроби, продукти харчування, пилок рослин, лікарські засоби, тощо.

Питання для обговорення.

1. Гуморальна та клітинна складові адаптивного імунітету.
2. Антигени бактерій.
3. Первинна і вторинна імунна відповідь.
4. Групові антигени еритроцитів людини.
5. Ознайомитись з реакціями визначення груп крові (системи АВ0) за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток.

Реакції визначення груп крові (системи АВ0) за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток.

Обладнання і матеріали: пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички нітрилові, нирковидні лотки, моноклональні реагенти анти-А, анти-В, анти-АВ, стандартні сироватки I, II, III, IV груп двох серій, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

Визначення групи крові за допомогою різних лабораторних реагентів – стандартний метод досліджень. Інформація про групу крові вкрай важлива, особливо в тих випадках, коли людині потрібна екстрена допомога. Перед хірургічним втручанням обов'язково визначається тип індивідуальних антигенних характеристик людини. Та ж процедура є обов'язковою для військовослужбовців (інформація вказується на формі), для жінок перед пологами і та ін.

Групи крові у людини – це система антигенів еритроцитів, яка представлена олігосахаридними структурами, зв'язаними з білками оболонки еритроцитів, котрі здатні викликати утворення специфічних антитіл і вступати з ними в реакцію. Антигенна структура еритроцитів (фенотип) є генетично визначеною (генотип). Характерною властивістю групових антигенів є їх здатність до стимуляції продукції відповідних до них антитіл у людей, які не мають цього антигену. В трансфузіологічній серології відрізняються два типи групових антитіл: природні та імунні.

Відомо багато систем еритроцитарних антигенів. Однак практичне значення мають система АВ0 та система Rh, оскільки вони найчастіше є причиною важких посттрансфузійних ускладнень і їх необхідно, в першу чергу, враховувати при гемотрансфузіях.

Система АВ0 представлена двома груповими антигенами А і В (аглютиногенами) та груповим олігосахаридом H, останній знаходиться на еритроцитах групи 0 і не має антигенної детермінанти. У межах антигену А спостерігається антигенна диференціація на підгрупи А1, А2 та інші. Різновиди антигену В з'являються дуже рідко. У сироватці крові людей без відповідного антигену наявні природні (постійні, регулярні) антитіла класу IgM до групових антигенів А і В: анти-А (α (альфа)) та анти-В (β (бета)). Таким чином, різні співвідношення групових антигенів еритроцитів та алоантитіл (ізоаглютинінів) сироватки крові дають чотири групи крові: 0 $\alpha\beta$, (II)A β з підгрупами A1 β та A2 β , (III)B α , (IV)AB0 з підгрупами A1B0 та A2B0.

Імунні антитіла анти-А чи анти-В, найчастіше класу IgG, з'являються в результаті переливань групово несумісної крові або внаслідок імунізації матері груповими антигенами плода. Природні та імунні групові антитіла відрізняються рядом фізико-хімічних і біологічних властивостей, з яких найбільше значення мають здатність проходити через плаценту, оптимальна температура та оптимальне середовище реакції з антигенами, теплова чутливість.

Визначення груп крові за системою АВ0 ґрунтується на феномені аглютинації з використанням двох методичних підходів:

1. На еритроцитах визначають наявність антигенів А, В за допомогою:
 - а) стандартних сироваток із специфічними ізоаглютинінами;
 - б) моноклональних антитіл (МКА);
2. У сироватці визначають наявність ізоаглютининів α (альфа) та β (бета) за допомогою стандартних еритроцитів відомої групи крові.

Хід роботи

Робота 1. Визначення групи крові за допомогою цоліклонів (моноклональних антитіл)

Визначення груп крові цоліклонами – порівняно новий метод дослідження. Для здійснення лабораторного дослідження не потрібно багато часу, достатня наявність всіх необхідних хімічних речовин (цоліклони) і простого обладнання (рис. 9.1).



Рис. 9.1. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Цоліклони по суті є одним з видів імуноглобулінів (IgM). Це моноклональні антитіла, які були утворені за допомогою генної інженерії. Цоліклони отримані в результаті впливу сироватки на стерильних

лабораторних мишей. Утворюється скупчення рідини в черевній порожнині гризуна, яка містить ці антитіла.

Визначення груп крові за допомогою цоліклонів вимагає попередньої підготовки і дій відповідно до встановленого алгоритму. Температура повітря у приміщенні повинна бути не нижчою від 18°C і не вищою за 25°C, інакше результат дослідження не може вважатися достовірним. У приміщенні не повинно бути пилу, тварин, комах та інших факторів, які можуть фізично вплинути на процес проведення дослідження. Також проведення лабораторного аналізу вимагає хорошого освітлення приміщення. Під час використання цоліклонів важливо тримати флакони щільно закритими і не допускати пересихання реагентів, інакше здатність антитіл до активних дій помітно знижується.

У сучасній лабораторній діагностиці використовується три види стандартних цоліклонів для визначення групи крові і резус фактора. Реагент типу «Анти-А» забарвлений в червоний колір, також пофарбований і флакон, ковпачок або етикетка флакона. Тип «Анти-В» забарвлюється синім, а «Анти-АВ» не позначається кольоровим маркером.

Моноклональні реагенти містить моноклональні антитіла класу IgM в титрі $\geq 1:32$.

Реагенти потрібно дістати з холодильника і витримати за кімнатної температури 15 хв.

Для визначення групи крові на планшкетку наносять по одній великій краплі (100 мкл) моноклональних реагентів різних типів (А, В і АВ). Кожен з них має бути підписаний. Кожен тип цоліклонів має наноситись окремою стерильною піпеткою.

Поруч з реагентами поміщається по 1 краплі (50 мкл) крові пацієнта або еритроцитів.

Стерильною паличкою реагенти змішують з біологічним зразком.

Спостерігати за ходом реакції з моноклональними реагентами візуально при легкому погойдуванні пластини або планшету протягом 3–5 хв.

Аглотинація еритроцитів зазвичай настає у перші 3–5 с, але спостереження слід вести протягом 5 хвилин, бо можливий більш повільний початок аглютинації з еритроцитами, якщо вони містять слабкі різновиди антигенів.

Як зрозуміти результат

Результат реакції в кожній краплі може бути позитивним або негативним. Позитивний результат виражається в аглютинації (склеюванні) еритроцитів. Аглотинацію видно неозброєним оком у вигляді дрібних червоних агрегатів, що швидко зливаються у великі пластівці або в один великий аглютинат (рис. 9.2–9.4).

- Відсутність будь-якої реакції склеювання у всіх зразках означає, що в клітинах еритроцитів пацієнта немає аглютиногена досліджуваного типу. Зразок крові зараховується до I групи (тип 0).
- Якщо еритроцитарні клітини пацієнта вступили в реакцію з реагентами типу «Анти-А» і «Анти-АВ», то у пацієнта II група крові (тип А).
- Помітна аглютинація зразка досліджуваної крові з реагентами типу «Анти-АВ» і «Анти-В» означає, що пацієнт має III групу крові (тип В).
- Якщо кров пацієнта вступила в реакцію з усіма реагентами, то досліджуваний зразок належить до IV групи (тип АВ).

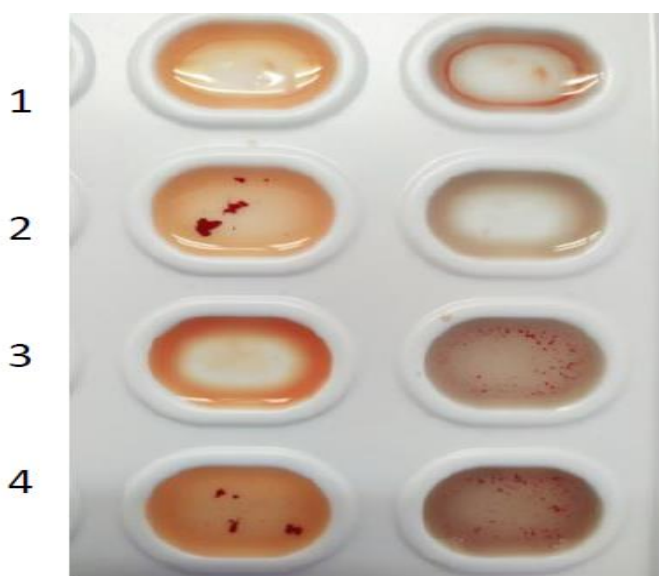


Рис. 9.2 Аглотинація еритроцитів різних груп крові за допомогою моноклональних реагентів анти-А та анти-В.

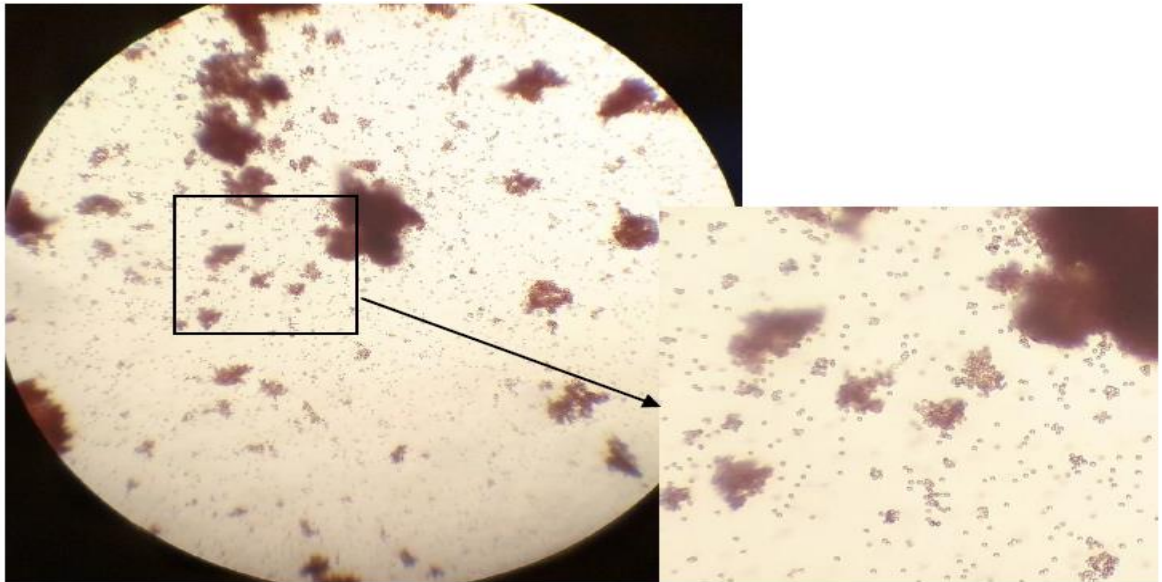


Рис. 9.3. Аглотинація еритроцитів моноклональним реагентом анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

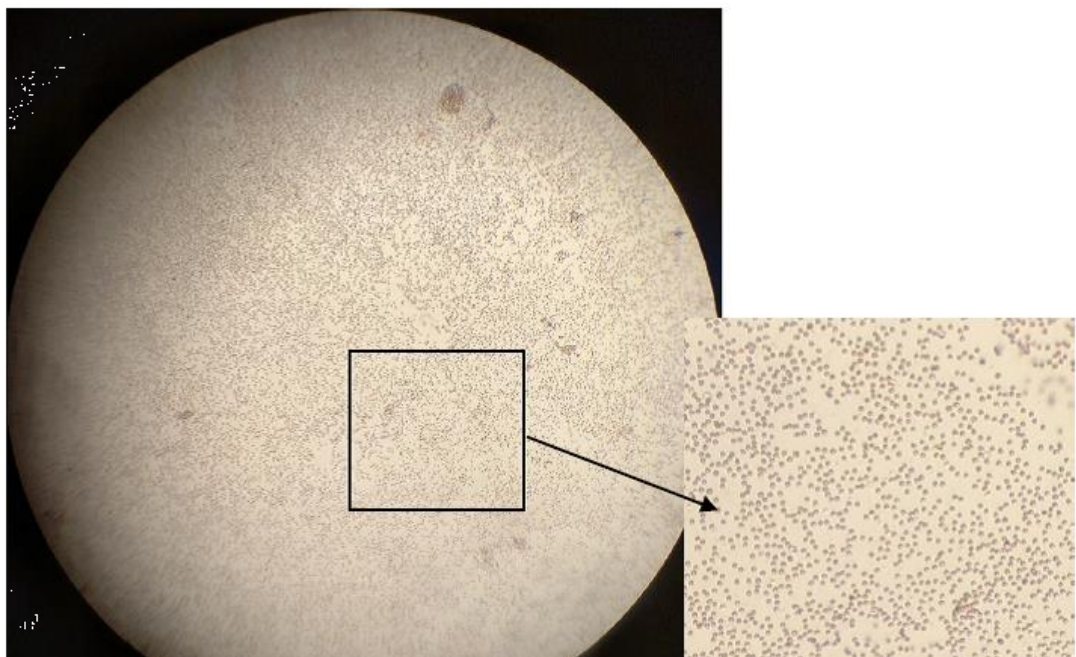


Рис. 9.4. Відсутність аглютинації еритроцитів при невідповідності антигенів еритроцитів та моноклонального реагента анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

При позитивному результаті реакції аглютинації з усіма моноклональними реагентами необхідно виключити спонтанну неспецифічну аглютинацію досліджуваних еритроцитів. Для цього необхідно змішати на площині 1 краплю досліджуваної крові (еритроцитів) з 1 краплею

фізіологічного розчину. Кров можна віднести до IV групи тільки за відсутності аглютинації еритроцитів у фізіологічному розчині.

Остаточно групова приналежність крові досліджуваного зразка за системою АВ0 встановлюється за результатами перехресного визначення антигенів А і В на еритроцитах і ізогемаглютининів в сироватці крові за допомогою стандартних еритроцитів.

Робота 2. Визначення групи крові за допомогою стандартних сироваток

Визначення групи крові проводять у добре освітленому приміщенні при температурі від +15 до +20°C (рис. 9.5).



Рис. 9.5. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Сироватку наносять на пластину повздовжніми рядами: I крапля – 0 (I), II крапля – А (II), III крапля – В (III). У кожену краплю додають еритроцити досліджуваної крові. Так поступають з двома серіями сироваток. Краплини перемішують скляною паличкою, погойдуючи, спостерігають 5 хвилин (рис. 9.6).



Рис. 9.6. Аглотинація еритроцитів різних груп крові за допомогою стандартних сироваток. Примітка: у правому нижньому кутку – контрольне дослідження зі стандартною сироваткою АВ (IV) групи крові.

Як зрозуміти результат

1. Якщо у всіх трьох краплях аглютинація не наступила – досліджувана кров 0 (I) групи.
2. Якщо сироватки 0 (I) і В (III) дали аглютинацію, то досліджувана кров А (II) групи.
3. Якщо дали аглютинацію сироватки групи 0 (I) і А (II), то досліджувана кров В (III) групи.
4. Якщо сироватки всіх трьох груп дали аглютинацію, то проводимо додаткове контрольне дослідження зі стандартною сироваткою АВ (IV).
5. Якщо через 10 хвилин у четвертій краплі не настала аглютинація, то досліджувана кров належить до АВ (IV) групи.

Наявність аглютинації у четвертій краплі свідчить про неспецифічну аглютинацію і дану кров необхідно досліджувати з відмитими еритроцитами.

Завдання. Виконайте визначення групи досліджуваної крові / еритроцитів.

Використовуючи отримані відомості, заповніть таблицю.

| № з/п | Результат реакції зі стандартними сироватками групи | | | Досліджувана кров належить до групи |
|-------|---|--------|---------|-------------------------------------|
| | 0 (I) | A (II) | B (III) | |
| 1 | | | | 0 (I) |
| 2 | | | | A (II) |
| 3 | | | | B (III) |
| 4 | | | | AB (IV) |

Контрольні питання:

1. Дайте визначення поняттю «антиген» та охарактеризуйте основні властивості антигенів.

Антиген - _____

2. Охарактеризуйте основні антигени бактерій.

ПРАКТИЧНА РОБОТА 10

ГОЛОВНИЙ КОМПЛЕКС ГІСТОСУМІСНОСТІ

Мета: вивчити будову генів МНС I, II їх основні функції

Теоретичні відомості

Головний комплекс гістосумісності (ГКГ) є стрижневим у фундаментальній і прикладній імунології. Роль молекул ГКГ надзвичайно важлива. Набір цих молекул для кожної людини абсолютно індивідуальний. Перші роботи, що свідчать про існування у ссавців генів, які детермінують вираженість трансплантаційної реакції відторгнення, з'явилися понад 50 років тому, із початком активного пересаджування органів. Згодом ця група генів одержала назву «головний комплекс гістосумісності» (major histocompatibility complex – МНС). Самою назвою було підкреслено їх визначальну роль у розвитку трансплантаційного імунітету. У людини цей комплекс генів одержав назву системи HLA (human leukocyte antigen). Таким чином, аббревіатури ГКГ, МНС і HLA для людини є синонімами позначення головного комплексу гістосумісності.

Дослідження генетичної структури і біологічної ролі ГКГ дозволили визначити принаймні дві основні його функції, що мають загальнобіологічне значення. До них належать:

- роль трансплантаційних антигенів у міжклітинних взаємодіях під час реалізації імунної відповіді;
- функція HLA-регіону, пов'язана з імунологічною реактивністю організму в цілому.

Встановлено, що гени HLA-системи розташовані на короткому плечі 6-ї хромосоми. Усіх їх поділено на три групи: гени гістосумісності класу I, класу II і класу III.

Гени системи HLA-класу I включають локуси B, C, E, A, G, F (у напрямку до теломери). Частина з них – локуси B, C та A – відносять до так званих класичних, що кодують традиційні трансплантаційні антигени. Що

стосується нещодавно відкритих локусів E, G, F, то біологічна функція їх самих і їх продуктів уточнюється.

Ступінь вираженості антигенів системи HLA як I-го, так і II-го класу – непостійний і залежить від впливу, насамперед, так званих ендогенних факторів модифікації імунної відповіді, до яких відносять інтерлейкіни, інтерферони, простагландини тощо.

Однією з найважливіших характеристик генів системи HLA є їх різноманітність і поліморфізм, тобто існування в межах кожного локусу великої кількості різних специфічностей HLA-генів (або множинних алельних варіантів), що відрізняються між собою за амінокислотними послідовностями, які кодуються варіабельною ділянкою ДНК, що визначає їх поліморфізм.

Гени системи HLA класу II розташовані безпосередньо поблизу централери і включають декілька локусів, частину з яких – DR, DP, DQ – можна віднести до «класичних», трансплантаційних або таких, що беруть безпосередню участь у презентації чужорідного антигену під час його розпізнавання; інші виконують хоч і надзвичайно важливу, але все ж допоміжну функцію.

Питання для обговорення:

1. Розкажіть про історію відкриття головного комплексу гістосумісності.
2. Гени MHC яких організмів є найбільш вивченими?
3. Як називається комплекс генів MHC у миші і як він побудований?
4. Як називається комплекс генів MHC у людини і як він побудований?
5. В чому полягає полігенність та поліморфність генів MHC і як вони досягаються?
6. Охарактеризуйте продукти генів MHC.
7. Порівняйте полігенність та поліморфність білків MHC та імуноглобулінів.
8. Яке значення з точки зору медицини мають продукти генів MHC?
9. Як експресовано гени MHC в організмі?
10. Як побудовано продукт генів MHC I?

11. Як побудовано продукт генів МНС II?
12. Розкажіть про форму порожнини, що зв'язує антигенний пептид, у білку МНС I і як її було досліджено.
13. Розкажіть про форму порожнини, що зв'язує антигенний пептид, у білку МНС II і як її було досліджено.
14. З білками яких МНС має бути представленим антиген для клітинної та гуморальної імунної відповіді?
15. Що таке процесинг антигену? Який розмір пептидів має бути для МНС I та МНС II?
16. Як імунна система приймає рішення про представлення антигену з МНС I чи МНС II? Розкажати про досліди Моррісона та Брейсієла.
17. Де відбувається зв'язування антигену з білками МНС?
18. Як відбувається біосинтез білків МНС I?
19. Як відбувається біосинтез білків МНС II?
20. Які можуть бути виключення при представленні антигенів?
21. Які інші функції, крім представлення антигенних пептидів Т-лімфоцитам, виконують молекули МНС?

Контрольні питання:

1. Назвіть компоненти, залучені у процесинг антигенів за участі молекул МНС I класу (на рисунку 10.1 позначені цифрами).

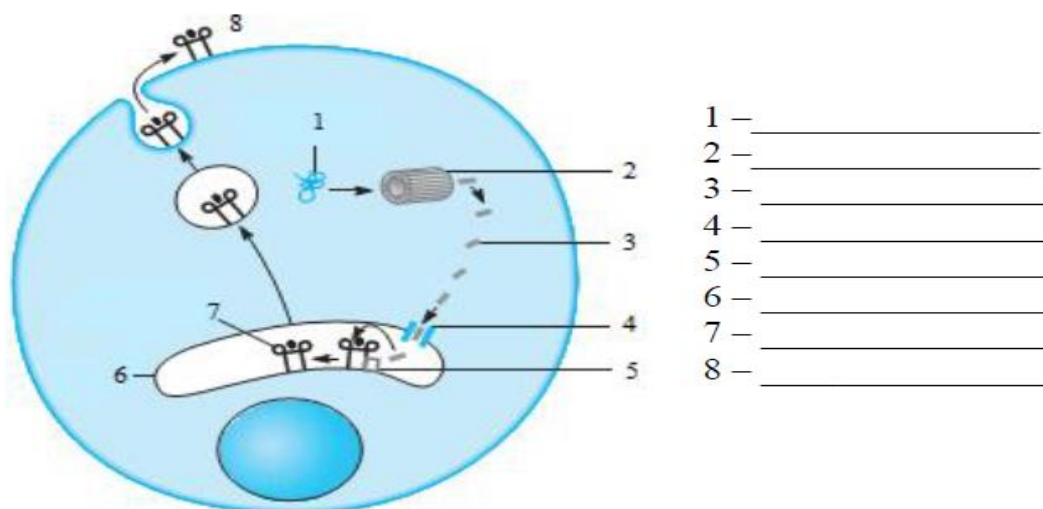
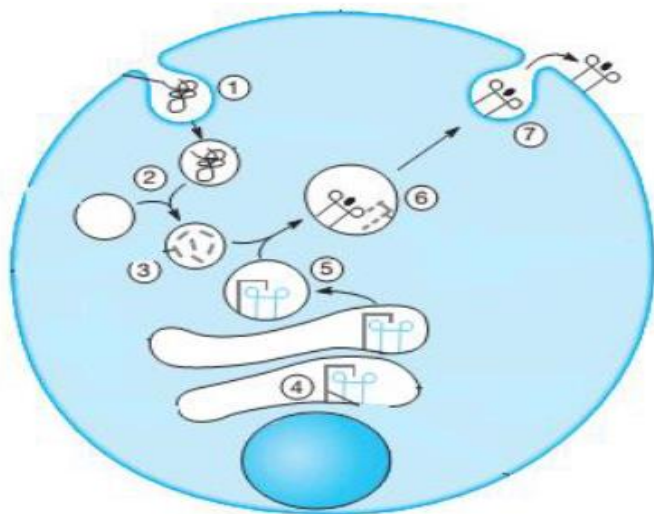


Рис. 10.1 Процесинг антигенів за участі молекул МНС I класу

2. Назвіть компоненти, залучені у процесинг антигенів за участі молекул МНС II класу (на рисунку 10.2 позначені цифрами).



- 1 – _____
- 2 – _____
- 3 – _____
- 4 – _____
- 5 – _____
- 6 – _____
- 7 – _____

Рис. 10.2 Процесинг антигенів за участі молекул МНС II класу

3. Заповніть таблицю

| | МНС I | МНС II |
|---|--------------|---------------|
| Особливості будови | | |
| Функції | | |
| Клітини, на яких знаходяться | | |
| Місце синтезу | | |
| Представлення антигенів (яким клітинам) | | |

ПРАКТИЧНА РОБОТА 11

БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ЦИТОКІНІВ. ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИН

Мета: *засвоїти основні біологічні властивості цитокінів. Ознайомитись з методом визначення цитокінів на прикладі фактора некрозу пухлин альфа.*

Теоретичні відомості

Цитокіни – протеїни або глікопротеїди з невеликою молекулярною масою, які продукуються еукаріотичними клітинами. Секретуються, головним чином, клітинами крові та імунокомпетентних органів. Для здійснення своїх функцій цитокіни зв'язуються зі специфічними рецепторами, які існують постійно або з'являються при активації клітин на їх мембрані. Клітина-мішень, „самостійно” регулюючи експресію того чи іншого рецептора на своїй мембрані, мають здатність контролювати дію цитокінів. Цитокіни відрізняються і чисельністю, і різноманітністю структури, і ще багатьма властивостями і від нейромедіаторів, і від гормонів внутрішньої секреції. На відміну від контактних взаємодій клітин мембранними молекулами, взаємодії за допомогою цитокінів більш динамічні й оперативні завдяки певним особливостям синтезу, секреції та рецепції цитокінів. У нормі цитокіни практично не потрапляють у системну циркуляцію і діють локально в тканинах у місці їх синтезу, що відрізняє їх від гормонів внутрішньої секреції.

Особливості цитокінової регуляції:

Цитокіни як „есперанто” в міжклітинному спілкуванні. Однойменні цитокіни продукуються клітинами різної тканинної диференціації. Рецептори для однойменних цитокінів експресовані на клітинах різної тканинної диференціації. Отже, клітини різних тканин „спілкуються” одна з одною і „можуть бути почутими” одна одною. Саме за допомогою цитокінів, у першу

чергу, система лімфоцитарного імунітету „зрощена” з іншими біологічними системами резистентності до інфекцій і зі всім організмом загалом.

Цитокіни в переважній більшості випадків – це близькодіючі медіатори локальних взаємодій клітин у вогнищах тих чи інших процесів у тканинах, навіть пари клітин. Залежно від відомих параметрів іррадіації ефектів цитокінів виділяють аутокринні ефекти (на саму клітину, що секретувала цитокіни) і паракринні ефекти (на клітини, розміщені поряд). Є й ендокринні ефекти, тобто дистантні, їх ще називають системними, оскільки при цьому цитокін досягає клітини-мішені, циркулюючи у крові. Але ендокринні ефекти виявлені лише для чотирьох цитокінів (TNF- α , IL-1, IL-6, M-CSF) і не у здорових організмів, а при важкій системній патології типу септичного шоку.

Цитокіни не депонуються у клітинах, а синтезуються імпульсно „на запит”. Єдиний відомий виняток – депонування невеликих кількостей TNF- α у гранулах тучних клітин.

Для цитокінів характерна взаємодія за типом „передай іншому”: вплив одного цитокіна на клітину викликає продукцію цією клітиною інших цитокінів. Це явище називають цитокіновим каскадом.

Цитокіни поділяються на декілька „родин”: інтерлейкіни, інтерферони, фактори некрозу пухлин, трансформуючі фактори росту, хемокіни, власне фактори росту та ін.

Ростові фактори. Гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (ГМ-КСФ) продукується багатьма типами клітин, стимулює активність і проліферацію гранулоцитарно-макрофагальних попередників.

Гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (Г-КСФ) стимулює подальше дозрівання гранулоцитів.

Макрофагальний колонієстимулюючий фактор (М-КСФ) стимулює дозрівання та активність моноцитів і макрофагів.

Еритропоетин виконує тільки функцію регуляції еритропоезу.

Трансформуючий фактор росту β викликає неадгезивний ріст фібробластів, інгібує активність деяких цитокінів: IL-2 (інтерлейкін-2), TNF- α (фактор некрозу пухлин альфа).

Хемокіни – це цитокіни спеціального призначення: вони приваблюють у вогнище запалення лімфоцити і інші клітини із циркулюючої крові. Молекули хемокінів невеликі, складаються із 66–76 амінокислотних залишків. Вони мають здатність зв'язуватися з молекулами міжклітинного матриксу, з одного боку, і зворотно зв'язувати свої молекули-ліганди на мембрані клітини-мішені – з другого. На цей час ідентифіковано не менше 40 хемокінів.

Є два фактори некрозу пухлин: TNF- α та TNF- β . ФНП α продукується здебільшого моноцитами-макрофагами, а TNF- β – Т-лімфоцитами, стимульованими різноманітними антигенами та мітогенами. Фактори є глікопротеїнами з молекулярною масою 17,4 кДа (TNF- α) – 20–25 кДа (TNF- β). Діють вони на один і той самий рецептор, викликаючи однакові ефекти, зокрема руйнують пухлинні та інфіковані вірусами і паразитами клітини з розвитком геморагічного некрозу тканин та загальної кахексії організму.

Ступінь їх активності неоднаковий. Більш виражена вона у TNF- α , що може бути пов'язано зі швидкістю його утворення. Так, у максимальній кількості він накопичується вже через 2–3 год після стимуляції антигенами, а TNF- β – лише на 2–3 доби. За спектром клітин-мішеней та біологічними ефектами TNF близькі до IL -1 та IL -6. Крім трансформованих клітин на них реагують майже всі клітини, що беруть участь у запальних процесах. Зокрема, TNF підсилюють експресію молекул, що сприяють адгезії на ендотелії, впливають на хемотаксис фагоцитів, обумовлюють синтез білків гострої фази запалення. У розвитку імунної відповіді вони беруть участь як кофактори ростових цитокінів, індукуючи проліферацію В- та Т-лімфоцитів, підсилюють антитілоутворення, пригнічують гіперчутливість уповільненого типу, перешкоджають формуванню імунологічної толерантності. Значний інтерес викликають дані про те, що TNF- α беруть участь у формуванні

лімфовузлів та псерових бляшок, а також у формуванні зародкових центрів під час імунної відповіді.

Обладнання, прилади та матеріали: імуноферментна тест-система: планшета полістиролова з імобілізованими мишачими моноклональними антитілами до людського TNF- α , біотин-кон'югат (анти-TNF- α поліклональні антитіла), концентрат промиваючого буферного розчину (фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з 1 % Твіну 20), стандартний зразок людського TNF- α , кон'югат стрептовідин-пероксидаза хрому, розчин субстрату (тетраметилбензидин), зупиняючий розчин (1 М ортофосфорна кислота), автоматичні мікропіпетки, пробірки, імуноферментний аналізатор або фотометр, зразки сироватки крові людини.

Порядок виконання

Підготовка реагентів

Перед постановкою дослідження набір витримують за кімнатної температури упродовж 30 хв.

1. Готують необхідну кількість промиваючого буферного розчину, для чого розводять його в 20 разів дистильованою водою.

При випаданні солі в осад концентрат необхідно нагріти за температури 30–40°C до повного розчинення осаду. Приготовлений розчин використовують для розведення сироватки, кон'югату та промивання планшети. Отриманий розчин стабільний упродовж 30 діб за умови його зберігання за температури 2–25 °C.

2. За кількістю досліджуваних та стандартних зразків, а також зразка для порівняння визначити кількість стрипів, необхідних для аналізу. Кожен досліджуваний, стандартний зразок та зразок для порівняння тестують у двох повторях. Зайві стрипи на планшеті видаляють. У табл. 1 наведено приклад розміщення зразків на стрипах планшети.

3. В окремих пробірках готують серійні розведення стандартного розчину людського TNF- α у промиваючому буферному розчині відповідно до табл. 1.

Таблиця 1

Розміщення зразків на стрипах планшети

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| A | Стандарт 1 (500,0 пг/мл) | Стандарт 1 (500,0 пг/мл) | Зразок 1 | Зразок 1 |
| B | Стандарт 2 (250,0 пг/мл) | Стандарт 2 (250,0 пг/мл) | Зразок 2 | Зразок 2 |
| C | Стандарт 3 (125,0 пг/мл) | Стандарт 3 (125,0 пг/мл) | Зразок 3 | Зразок 3 |
| D | Стандарт 4 (62,5 пг/мл) | Стандарт 4 (62,5 пг/мл) | Зразок 4 | Зразок 4 |
| E | Стандарт 5 (31,3 пг/мл) | Стандарт 5 (31,3 пг/мл) | Зразок 5 | Зразок 5 |
| F | Стандарт 6 (15,6 пг/мл) | Стандарт 6 (15,6 пг/мл) | Зразок 6 | Зразок 6 |
| G | Стандарт 7 (7,8 пг/мл) | Стандарт 7 (7,8 пг/мл) | Зразок 7 | Зразок 7 |
| H | Зразок для порівняння | Зразок для порівняння | Зразок 8 | Зразок 8 |

4. Робочі розчини біотин-кон'югату та кон'югату стрептавідин-пероксидази готують за інструкцією виробника.

Проведення дослідження

1. В усі лунки наливають 100 мкл дистильованої води.
2. У відповідні лунки планшети додають 50 мкл досліджуваних зразків сироватки крові та відповідних розведень стандартних розчинів людського TNF- α у двох повторах. У лунки, позначені «зразок для порівняння», наливають 50 мкл дистильованої води.
3. В усі лунки додають 100 мкл біотин-кон'югату та 100 мкл кон'югату стрептавідин-пероксидази. Вміст лунок перемішують шляхом переміщення колоподібними рухами планшети на плоскій поверхні.
3. Планшету накривають кришкою або плівкою та інкубують за кімнатної температури упродовж 3 год, періодично струшуючи.
4. Відкривають планшету та видаляють вміст усіх лунок, струшуючи планшету над раковиною. Промивають планшету 6 разів, додаючи в усі лунки 400 мкл промиваючого буферного розчину. За допомогою

фільтрувального паперу обережно з планшети видаляють надлишок буферного розчину.

5. В усі лунки додають 100 мкл розчину субстрату.

6. Планшету інкубують у захищеному від світла місці упродовж 10 хв.

7. В усі лунки додають 100 мкл зупиняючого розчину.

8. Не більше як через 5 хв вимірюють оптичну густину на імуноферментному аналізаторі або фотометрі за довжини хвилі 450 нм.

Обробка експериментальних даних

Підрахувати середнє з двох значень оптичної густини для кожного стандартного та досліджуваного зразків. Значення повторних вимірювань не повинні відрізнятися більше ніж на 20 %. За отриманими даними побудувати калібрувальну криву залежності оптичної густини від концентрації TNF- α . Визначити концентрацію TNF- α у досліджуваних зразках сироватки крові.

Аналіз отриманих результатів

Вміст TNF- α порівнюють між собою та з даними нормального вмісту даного цитокіну в сироватці крові.

Питання для обговорення:

1. Що таке цитокіни?
2. Що собою становить інтерлейкін-2?
3. Яку функцію виконує інтерлейкін-2?
4. Дайте визначення понять „цитокіни”, „хемокіни”.
5. Перерахуйте, які властивості притаманні цитокінам
6. Які особливості будови та властивості TNF- α і TNF- β ?
7. Які головні функції TNF- α і TNF- β ?
8. Які методи, крім імуноферментного аналізу, можуть бути використані для кількісного визначення TNF- α ?
9. Які переваги та недоліки використання імуноферментного аналізу для визначення TNF- α ?
10. Дайте визначення терміну "інтерферон". Опишіть механізм його противірусної дії і назвіть методи отримання.

Контрольні питання :

1. Проаналізуйте аутокринні, паракринні та ендокринні ефекти цитокінів. Поясніть, у чому полягає біологічний ефект цитокінів.
2. Наведіть приклади інтерлейкінів. Поясніть, яка роль їм відведена в організмі.
3. Яка біологічна дія інтерферонів? Які функції виконують фактори некрозу пухлини?

ПРАКТИЧНА РОБОТА 12

АЛЕРГІЧНІ РЕАКЦІЇ.

Мета: *засвоїти основні типи алергічних реакцій, методи їх діагностики*

Теоретичні відомості

Алергени – чужорідні речовини органічного та неорганічного походження.

Алергізація – перехід від нормальної до підвищеної чутливості до алергену у відповідь на потрапляння його в організм.

Алергія – форма імунної відповіді, що виявляється у підвищеній чутливості організму до різних антигенів (алергенів); при алергії організм відповідає на специфічний алерген надмірною реакцією, що супроводжується ушкодженням його власних тканин унаслідок набряку та запалення, спазму або розслаблення гладкої мускулатури, порушення мікроциркуляції та гемодинаміки.

Алергологічна діагностика – це діагностика, яка дає змогу встановити вид алергену, тип алергічної реакції, форму алергічного захворювання та джерело, що сприяє сенсibiliзації.

Анафілаксія – антигенспецифічна імунна реакція, опосередкована переважно IgE, за якої з тканин організму вивільняється гістамін, унаслідок чого виникає місцева або загальна алергічна реакція.

Імуноферментне визначення загального імуноглобуліну E.

Кількісне визначення вмісту загального IgE у сироватці, плазмі крові або інших біологічних рідинах проводять при діагностиці стану гуморальної ланки імунітету, імунодефіцитних станах, паразитарних захворюваннях, парапротейнеміях і алергічних захворюваннях. Концентрація IgE у сироватці крові поступово зростає з моменту народження до підліткового віку. У дорослих людей концентрація IgE у нормі може сягати 100 МО/мл.

Продукція IgE має важливе значення у протигельмінтному імунітеті. При аскаридозі спостерігається 15-20-кратне підвищення концентрації IgE.

Окрім того, підвищення концентрації IgE спостерігається при алергічних реакціях. Визначення загального IgE має важливе прогностичне значення. Його вміст на 95 % перевищує вікову норму у 75 % дітей, у яких батьки мали алергічні захворювання. Виявлення високих концентрацій загального IgE у сироватці крові є важливим діагностичним критерієм, що дозволяє диференціювати алергічні захворювання серед інших патологій, які клінічно проявляються астмою, частими захворюваннями дихальних шляхів, хронічними ринітами і дерматитами.

На сьогодні відомі кілька методів визначення загального IgE: конкурентний, радіоімунний, сендвіч-тест на основі моно- та поліклональних антитіл, імунохроматографія. Найширше використовується метод імуоферментного аналізу визначення IgE.

При проведенні сендвіч-варіанту твердофазного імуоферментного аналізу використовуються два моноклональних антитіла з різною епітопною специфічністю до IgE. Одне із них іммобілізовано на твердій фазі (внутрішня поверхня лунок), друге – кон'юговане з пероксидазою хрому (рис.12.1).

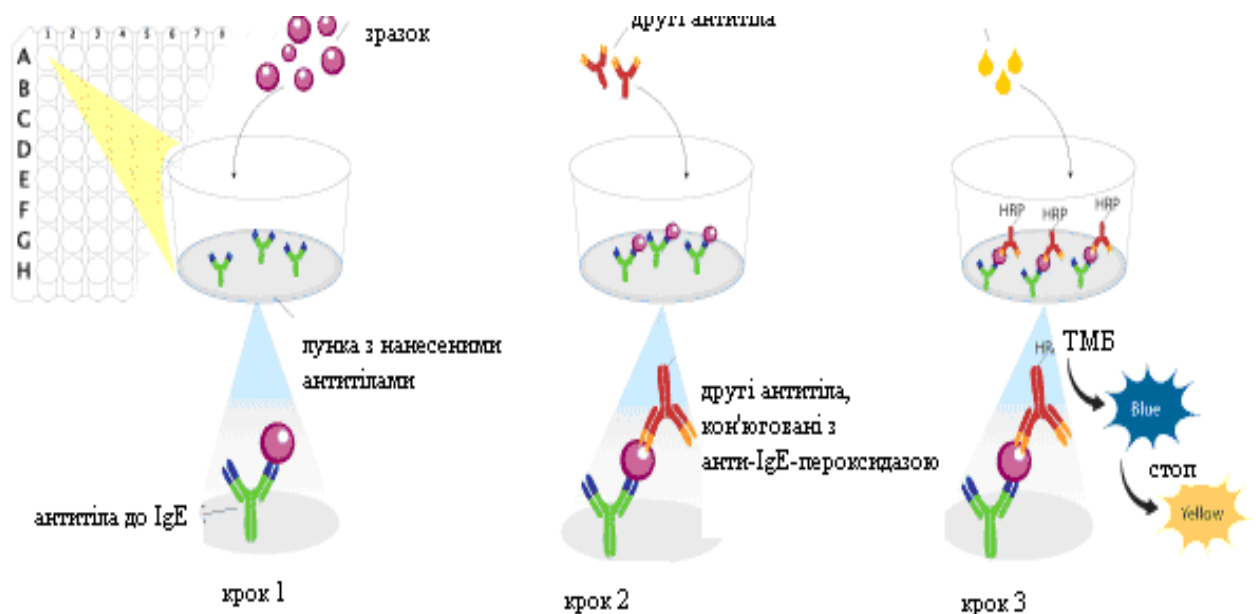


Рис. 12.1. Загальна схема сендвіч-варіанту твердофазного імуоферментного аналізу

В лунках, при додаванні досліджуваного зразку і кон'югату анти-IgE-пероксидаза, під час інкубації одночасно відбувається іммобілізація IgE, що міститься у досліджуваному зразку, і зв'язування утвореного комплексу з кон'югатом. Незв'язані компоненти видаляють промивкою. Кількість зв'язаного кон'югату прямо пропорційна кількості IgE у досліджуваному зразку.

Під час інкубації у розчині тетраметилбензидину (ТМБ) відбувається забарвлення розчину у лунках. Ступінь забарвлення прямо пропорційний концентрації IgE в аналізованих пробах. Після вимірювання оптичної густини розчину у лунках на основі калібрувального графіку розраховується концентрація IgE у досліджуваних зразках.

Для роботи використовується набір "ІФА-загальний IgE".

Реактиви та обладнання

1. Комплект з дванадцяти восьмилункових стрипів у рамці з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до загального IgE.
2. Калібрувальні проби (0; 10; 50; 100; 250; 500 МО/мл IgE).
3. Кон'югат анти- IgE-пероксидаза.
4. Водно-сольовий розчин для розведення зразків сироватки крові (розведення сироватки у 20 разів проводиться у випадку, якщо концентрація загального IgE сягає значень понад 500 МО/мл).
5. Концентрований водно-сольовий розчин для промивки лунок (перед використанням розвести у 20 разів).
6. Розчин тетраметилбензидину.
7. 1 н HCl (стоп-реагент).
8. Контрольна сироватка з відомим вмістом загального IgE.
9. Спектрофотометр ($\lambda = 450$ нм).

Хід роботи

1. У лунки 1-6 внести по 20 мкл відповідних калібрувальних проб, у лунку 7 внести 20 мкл контрольної сироватки, у лунку 8 внести 20 мкл досліджуваної сироватки.
2. У всі лунки внести по 150 мкл кон'югату. Інкубувати проби протягом 1,5 години при температурі 37°C (при постійному перемішуванні на шейкері).
3. Після інкубації видалити вміст лунок у контейнер з дезінфікуючим розчином (6 % розчин пероксиду водню), промити лунки 5 разів, додаючи по 300 мкл промивного розчину. Після останньої промивки необхідно на кілька секунд залишити стрипи з лунками у перевернутому вигляді на фільтрувальному папері для видалення залишків рідини.
4. Внести у всі лунки по 100 мкл розчину ТМБ. Інкубувати стрипи при кімнатній температурі протягом 15-30 хв до появи забарвлення.
5. У всі лунки внести по 100 мкл стоп-реагенту для зупинки ферментативної реакції, перемішати 1-2 хв на шейкері при кімнатній температурі.
6. Виміряти оптичну густину усіх проб при 450 нм (оптичний контроль – 100 мкл ТМБ + 100 мкл стоп-реагенту). Вимірювання провести протягом 20 хв після зупинки ферментативної реакції.
7. Висновок

Питання для обговорення.

1. Алергічні реакції, їх класифікація за Джелом і Кумбсом, методи їх попередження і лікування.
2. Правила постановки і обліку шкірних алергічних реакцій, їх діагностична цінність.
3. Принципи десенсибілізації та її види.

Контрольне питання:

1. Охарактеризуйте типи алергічних реакцій за класифікацією Джела і Кумбса.

2. Яка мета використання шкірно-алергічних проб

3. Тестові завдання (вирішити та обґрунтувати надану відповідь).

| Тест | Пояснення |
|---|-----------|
| <p>1. У хворого з періодичними нападами задухи, які виникають при вдиханні різних ароматичних речовин, діагностовано atopічну бронхіальну астму. Діагностовано збільшення IgE. Для якого типу реакцій це характерно:</p> <ul style="list-style-type: none">A. Цитотоксичні реакціїB. Імунокомплексні реакціїC. Анафілактичні реакціїD. ГСТE. Аутоімунні реакції | |
| <p>2. У хворої М. спостерігається локальна реакція на укуси бджоли, що виникла в перші хвилини після укусу. За яким типом реакції гіперчутливості вона проходить?</p> <ul style="list-style-type: none">A. АнафілактичнийB. ЦитотоксичнийC. ІмунокомплекснийD. Уповільненого типуE. Ідіотип-антиідіотип | |
| <p>3. У пацієнта з бронхіальною астмою за допомогою шкірних алергічних проб встановлено сенсibiliзацію алергеном тополиного пуху. Який фактор імунної системи відіграє вирішальну роль в розвитку цього імунopatологічного стану?</p> <ul style="list-style-type: none">A. IgE.B. IgD.C. IgM.D. Сенсibiliзовані Т-лімфоцити. | |
| <p>4. Жінка 54 років звернулася до лікаря зі скаргами на непереносимість курячих яєць, що з'явилася нещодавно. Антигістамінні препарати, що їй призначив лікар призводили до деякого покращення стану хворої. Які антитіла могли сприяти розвитку цієї реакції?</p> <ul style="list-style-type: none">A. Ig AB. Ig DC. Ig ED. Ig GE. Ig M | |

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Імунологія та алергологія. Навчальний посібник для самостійної роботи студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» [Електронний ресурс]: навчальний посібник для студ. спеціальності 163 «Біомедична інженерія» / КПІ ім. Ігоря Сікорського: уклад. О.Я. Беспалова. – Електронні текстові дані (1 файл: 1,38 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. – 51 с.
2. Клінічна імунологія та алергологія: навчальний посібник (ВНЗ III—IV р. а.) / В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, А.М. Гаврилюк та ін. – Медицина, 2017. – 254 с.
3. Імунологічні методи : метод. вказівки до проведення лаб. занять з курсу «Імунологія» / Т. О. Філіпова, Т. В. Гудзенко, М. Б. Галкін, О. Ю. Зінченко, Г. В. Ямборко, М. Ю. Русакова. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. Мечникова, 2018. – 90 с.
4. Вершигора А. Ю., Пастер Є. У., Колибо Д. В., Позур В. К., Віхоть М. Є., Михальський Л. О., Швець Ю. В., Холодна Л. С., Моложава О. С. Імунологія /За заг. ред. Є. У. Пастер/. – Київ: Вища школа, 2005. – 599 с.
5. Якобисяк М. Імунологія / Пер. з польської за ред. проф. В. В. Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.
6. Клінічна та лабораторна імунологія. Національний підручник//За загальною редакцією доктора медичних наук, професора Кузнецової Л. В; доктора медичних наук, професора Фролова В. М.; доктора медичних наук, професора Бабаджана В. Д. – К. ООО «Поліграф плюс», 2012. – 922с.
7. Імунологія: підручник / Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко та ін.; за ред. Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко. –Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. – 265 с.
8. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д. Р., Ройт А. Иммунология. Пер. с англ. – М.: Логосфера, 2007. – 568 с.

9. Скок М. В. Основи імунології. – Київ: Фітосоціологічний центр, 2002. – 151 с.
10. Janeway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology. 5th ed.- New York and London: Garland Publishing.- 2001. – 732 p.
11. Chapel H., Haeney M., Misbah S., Snowden N. Clinical Immunology. Oxford:Blackwell // Science Ltd. – 2009. – 352 p.