

**Сківка Л.М., Рудик М.П., Швець Ю.В., Сенчило Н.В., Моложава О.С.,  
Храновська Н.М., Стасенко А.А.**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ДО  
ЛАБОРАТОРНОГО ПРАКТИКУМУ  
З ДИСЦИПЛІНИ «ІМУНОЛОГІЯ»**

Імунологія. Практикум. Сківка Л.М. та співавтори. 2022

**КИЇВ – 2022**

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
Передмова .....	5
<b>Лабораторна робота №1.</b> Організація лабораторії імунологічного профілю. /Моложава О.С., Швець Ю.В./.....	6
<b>Лабораторна робота № 2.</b> Ключові методичні підходи в імунологічній лабораторії. /Сківка Л.М., Рудик М.П./.....	12
<b>Лабораторна робота №3.</b> Дослідження органів імунної системи експериментальних тварин. /Рудик М.П./.....	19
<b>Лабораторна робота № 4.</b> Будова лімфатичної системи та лімфоїдних органів ссавців. /Рудик М.П./.....	26
<b>Лабораторна робота № 5-6.</b> Вивчення клітин імунної системи: лейкоцитарна формули крові людини. /Швець Ю.В./.....	33
<b>Лабораторна робота № 7.</b> Виділення лейкоцитів периферичної крові методом осмотичного лізису еритроцитів. /Швець Ю.В./.....	41
<b>Лабораторна робота № 8.</b> Виготовлення корпускулярних антигенів для імунізації тварин. /Сенчило Н.В./.....	44
<b>Лабораторна робота № 9.</b> Індукція імунної відповіді. Способи введення імуногенів. /Сківка Л.М./.....	49
<b>Лабораторна робота № 10.</b> Отримання імунної сироватки. /Сенчило Н.В./	54
<b>Лабораторна робота № 11.</b> Серологічні методи. Реакція аглютинації. /Сківка Л.М./.....	57
<b>Лабораторна робота № 12-13.</b> Оцінка стану природної резистентності організму. Визначення фагоцитарної активності клітин імунної системи. /Моложава О.С., Стасенко А.А./.....	66
<b>Лабораторна робота № 14.</b> Проточна цитометрія. Імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові людини. /Храновська Н.М./.....	70
ДОДАТОК 1.....	81
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	82

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- BALT (від англ. bronchus-associated lymphoid tissue) - асоційована з бронхо-легеневою тканиною лімфоїдна тканина;
- FITC (від англ. Fluorescein-5-isothiocyanate) - флуоресцеїнізотіоціанат;
- FSC (від англ. forward scatter) - сигнал прямого світлорозсіювання;
- GALT (від англ. gut-associated lymphoid tissue) - асоційована з кишечником лімфоїдна тканина;
- ІЛ - інтерлейкін;
- MALT (від англ. mucosa-associated lymphoid tissue) - асоційована зі слизовими оболонками лімфоїдна тканина;
- MHC (від англ. Major Histocompatibility Complex) - головний комплекс гістосумісності;
- NALT (від англ. nasal-associated lymphoid tissue) - асоційована зі слизовою носової порожнини лімфоїдна тканина;
- PE - фікоеритрин;
- SALT ( від англ. skin-associated lymphoid tissue) - асоційована зі шкірою лімфоїдна тканина;
- SCID (від англ. severe combined immunodeficiency) - важкий комбінований імунодефіцит;
- SSC (від англ. side scatters) - сигнал бічного світлорозсіювання;
- Аг - антиген;
- АРС - аллофікоціанін;
- Ат - антитіло;
- в/в - внутрішньовенне введення;
- в/м - внутрішньом'язове введення;
- в/с - внутрішньоселезінкове введення;
- в/ч - внутрішньочеревне введення;
- в/ш - внутрішньошкірне введення;
- ЗК - загальна кількість;
- ЗФР - забуферений фізіологічний розчин;

i/n - інтраназальне введення;  
ІФН  $\gamma$  - інтерферон  $\gamma$ ;  
МПБ - м'ясо-пептонний бульйон;  
МПК - мононуклеари периферичної крові;  
н/ш - наскірне введення;  
п/о - пероральне введення;  
п/ш - підшкірне введення;  
ПАЛМ - периартеріолярні лімфоїдні муфти;  
ПК - природні кілери;  
ПКТ- природні кілерні Т-клітини;  
ПКК - природні кілерні клітини;  
ПМЯЛ - поліморфо-ядерні лейкоцити;  
РЗК - реакція зв'язування комплементу;  
СД ( від англ. CD - clusters of differentiation) – кластер диференціювання,  
поверхневий маркер клітини;  
СКК - стовбурові кровотворні клітини;  
ТКР - Т- клітинний рецептор;  
Трег - Т- регуляторні клітини;  
Тц1 - Т-цитотоксичні клітини типу 1;  
Тх1 - Т- хелпери типу 1;  
Тх17 - Т-хелпери, що продукують ІЛ-17;  
Тх2 - Т-хелпери типу 2;  
Тц2 - Т-цитотоксичні клітини типу 2;  
ФНП  $\alpha$  - фактор некрозу пухлин  $\alpha$ ;  
ФНП  $\beta$  - фактор некрозу пухлин  $\beta$ ;  
ЦТЛ - цитотоксичні Т-лімфоцити;

## Передмова

Імунологія – сучасна наука, яка досліджує структурні особливості і механізми функціонування імунної системи організму. Імунна система людини і тварин надзвичайно складна система, яка підтримує структурний гомеостаз кожного індивідууму і здійснює свої функції за рахунок активності багаторівневої системи природної резистентності та адаптивного імунітету. Дисципліна «Імунологія» входить до переліку обов'язкових дисциплін освітньо-професійної програми «Біологія» для підготовки фахівців освітнього ступеню «Бакалавр» за спеціальністю 091 – Біологія галузі знань 09 – Біологія. Лабораторний практикум до дисципліни «Імунологія» призначений для набуття студентами, що навчаються за зазначеною освітньо-професійною програмою, базових навичок роботи у лабораторії імунологічного профілю: орієнтуватися в системі імунологічних методів досліджень; ознайомитися з принципами та методологією оцінки імунної реактивності; знати будову та вміти у лабораторних умовах ідентифікувати первинні і вторинні лімфоїдні органи у ссавців; володіти методологією виділення клітин імунної системи зі зразків біологічного матеріалу та проводити їх морфологічну і функціональну характеристику з використанням традиційних та сучасних методичних підходів; володіти основними прийомами імунізації лабораторних тварин; володіти основними принципами постановки серологічних методів.

Проведення лабораторних занять передбачено у формі навчально-дослідницької роботи, яка вимагає вміння аналізувати отримані результати і проводити їх узагальнення, що сприяє набуттю необхідних навичок дослідницької діяльності.

## **Лабораторна робота №1.**

### **Організація лабораторії імунологічного профілю.**

Лабораторії імунології створюють з метою оцінки функціонування імунної системи організму. Імунна система людини і тварин підтримує антигенно-структурний гомеостаз індивідууму і здійснює свої функції за рахунок активності багаторівневої системи природної резистентності та адаптивного імунітету. Для дослідника імунолога головним є оцінити ефективність роботи цілісної системи, саме тому вивчення функціонування імунної системи організму включає цілий комплекс методів оцінки стану різних ланок імунітету. В імунологічній лабораторії здійснюють якісне і безпечно відтворення імунологічних методів в експериментальних і клінічних дослідженнях.

В сучасному світі більшість біологічних лабораторій мають подібну структуру та обладнання. Ключова різниця полягає у тих учбових, наукових та клінічних задачах, які вирішує кожна конкретна лабораторія. Від поставлених задач далі залежить вибір об'єктів для дослідження, розробка стратегії дослідження та планування підходів статистичного обрахунку отриманих даних. Різноманіття вихідного матеріалу, методичних особливостей, багаточисельність модифікацій різних методів і проміжних процедур, різних рівнів технологій імунологічних досліджень відобразилось на особливостях структури імунологічної лабораторії. В імунологічній лабораторії можуть працювати групи співробітників, які спеціалізуються на конкретних методичних прийомах оцінки активності різних ланок імунної відповіді. Найбільш важливими напрямками досліджень є: вивчення показників гуморальної ланки імунітету (антитіл та цитокінів), клітинного імунітету, оцінка місцевого імунітету, дослідження фагоцитарної ланки та імунофенотипування клітин імунної системи, оцінка протиінфекційного та противірусного імунітету, алергодіагностика та інші.

Основними задачами, що вирішує лабораторія імунології, є наступні:

1. Своєчасна і максимально надійна оцінка імунного статусу організму;
2. Розробка норм біологічної варіації різних параметрів імунної системи (визначення референсної норми показників імунограми);
3. Розробка критеріїв контролю якості імунологічних методів дослідження;
4. Своєчасне виявлення дефектів функціонування імунної системи - імунодефіцитів;
5. Діагностика імунопатологічних станів при різних захворюваннях (алергічні, автоімунні та інш.);
6. Розробка лабораторного алгоритму імунодіагностики інфекційних захворювань;
8. Розробка схем вакцинопрофілактики і специфічної імунотерапії, оцінка поствакцинального імунітету населення;

За напрямками діяльності імунологічні лабораторії можна поділити на: учбові, науково-дослідні, біотехнологічні та клінічно-діагностичні. Вимоги до організації роботи та безпеки у цих лабораторіях будуть дещо відмінні.

Найбільш жорсткі вимоги щодо організації роботи клініко-діагностичних лабораторій. І це є зрозумілим, адже відповідальність і ризики при роботі з клінічним матеріалом є високими. Робота медичних лабораторій регламентована документами Міжнародної організації зі стандартизації (International Organization for Standardization, ISO). Сертифікація медичних лабораторій - це ISO 15189. У європейських лабораторіях дотримуються стандартних операційних процедур (Standard Operating Procedures, SOP) для аналізу будь-яких клінічних зразків. СОПи повністю затверджені, існують заходи контролю якості для забезпечення максимальної якості отриманих результатів. В Україні певні Державні санітарні норми і правила регламентують роботу лабораторій медичного профілю. В Україні роботу лабораторій медичного профілю також регламентують Державні санітарні норми і правила та наказ від 19.11.2002 № 422 "Про подальший розвиток клінічної імунології в Україні" МОЗ України. Для біотехнологічних лабораторій, що виготовляють лікарські препарати існує поняття GMP. GMP (англ. Good manufacturing practice) - Належна виробнича практика, правила, які встановлюють вимоги до організації виробництва і контролю якості лікарських засобів для медичного і ветеринарного застосування.

Приміщення базової лабораторії імунології повинні бути просторими для забезпечення безпечного проведення лабораторної роботи. Стіни, стеля, підлога повинні мати гладку, непроникну для рідин поверхню, стійку до дезінфектантів. Імунологічна лабораторія повинна бути обладнана холодильними установками з різним температурним режимом, ламінарними боксами, CO<sub>2</sub> інкубатором, центрифугами, шейкерами, термостатами, аналітичними вагами, іонометрами, мікроскопами, проточним цитофлуориметром, автоклавом, обладнанням для проведення імуноферментного аналізу, сушильними і стерилізаційними шафами, обладнанням для культивування клітин, дистилятором, мийкою, лабораторним посудом, автоматичними піпетками та інш. Робочі приміщення лабораторії повинні бути забезпечені підключенням холодної та гарячої води, електрикою. Бажано, щоб в лабораторії підтримувався постійний температурний режим (18-20<sup>0</sup>C) та вологість.

У роботі будь-якої біологічної лабораторії, особливо медичного профілю (в тому числі і імунологічної), надзвичайно важливим є коректне послідовне виконання усіх етапів дослідження: преаналітичного, аналітичного та постаналітичного. Від правильного виконання кожного з етапів залежить результат дослідження. Встановлено, що до 70 % усіх помилок відбувається саме під час преаналітичного етапу. Ці помилки, як правило, пов'язані з такими похибками: невідповідний запит на тестування, похибками введення замовлення, помилкова ідентифікація пацієнта/зразка, проба, помилки забору зразка крові (гемоліз, згортання, недостатній об'єм тощо), невідповідна тара, обробка, зберігання та транспортування. Похибки аналітичного етапу є

найбільш рідкісними, але вони також трапляються і складають приблизно 10 % від загальної кількості похибок дослідження на усіх етапах. Ці похибки пов'язані з несправністю обладнання, змішуванням зразків, перешкодами (ендогенними чи екзогенними), невизначеними похибками контролю якості. Похибки постаналітичного етапу пов'язані з помилками обробки та обрахунку аналітичних даних, похибках у звітності, надмірному часі переробки даних, неправильною інтерпретацією результатів, невідповідним/неадекватним плануванням подальшого спостереження, відсутністю замовлення відповідної консультації.

Для дослідження в лабораторії імунології можна використовувати різні біоматеріали: кров, сироватка, різноманітні секрети організму, зразки оперативного матеріалу тканин та органів та інше. В більшості випадків біоматеріал, який поступає в лабораторію, може бути потенційно **інфікованим**. Тому, потрібно дотримуватись певних правил роботи, знезараження та утилізації біоматеріалу, які включають використання відповідних дезінфікуючих розчинів, контейнерів для зберігання та транспортування біоматеріалу, одноразових пакетів для збору та утилізації біоматеріалу, який пройшов дезінфекцію. В лабораторії необхідно працювати у спецодезії. Для роботи в лабораторії необхідним є мінімальний набір засобів індивідуального захисту: медичний халат, шапочка і гумові рукавички. При загрозі розбризкування біологічних рідин додатково використовують маски, окуляри, фартухи. Деякі методики потребують роботи в ламінарних боксах з дотриманням правил стерильності.

Основною метою лабораторної клінічної та експериментальної імунології є своєчасна та максимально надійна оцінка імунного статусу як біологічного критерію адаптаційних можливостей організму індивідууму, яка залежить в значній мірі також від приготування робочих реактивів.

Для досягнення якісного відтворення імунологічних методів в експериментальних і клінічних дослідженнях необхідно дотримуватись певних правил роботи в лабораторії імунологічного профілю.

### **1.1. Правила техніки безпеки при роботі в навчальній лабораторії імунологічного профілю.**

2. Під час роботи в імунологічній лабораторії кожен студент повинен знаходитися у спеціальному одязі – медичному халаті і гумових рукавичках. Довге волосся необхідно прибрати під шапочку. Заносити в приміщення лабораторії верхній одяг суворо забороняється.
3. Кожен студент повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці. Під час роботи в лабораторії слід зберігати тишу, дотримуватись порядку і чистоти. На робочих столах не повинно бути сторонніх речей (зошити, сумки та інш.).
4. У приміщенні лабораторії категорично забороняється вживати їжу та напої, використовувати косметичні засоби.
5. Біоматеріали (кров, суспензії клітин, сироватка, плазма, секрети та інш.) роздаються студентам безпосередньо інженером учбової лабораторії, викладачем або відповідальним черговим по групі.

6. На робочих столах повинна бути ємність з дезінфікуючим розчином.
7. Працювати з біоматеріалами необхідно тільки автоматичними піпетками.
8. При потраплянні біоматеріалів різного походження на спецодяг або робочу поверхню проводиться дезінфекція місця, а одяг замочується в спецтарі з дезінфікуючим розчином.
9. Одноразовий допоміжний матеріал, використані пробірки, інструмент та інші речі, які контактували з біоматеріалом, дезінфікуються у відповідності маркованої ємності з дезінфікуючим розчином.
10. У кожній групі призначаються чергові - пара студентів, які здійснюють контроль за дотриманням чистоти і порядку студентами групи на робочих місцях, допомагають з організацією занять інженеру і викладачу.
11. Усе необхідне для роботи на занятті (чашки, пробірки, піпетки) студенти мають брати зі спеціального робочого столу. Після роботи використаний скляний посуд і біологічні матеріали поміщаються у роздільні ємності і виносяться черговими у мийну кімнату.
12. Перед виконанням робіт і після завершення необхідно вимити руки з милом. Забороняється торкатися біоматеріалів (зразків крові, виділених органів лабораторних тварин) і мікробних культур руками. Робота з біоматеріалами проводиться у гумових рукавичках. Якщо контакт з кров'ю або іншими біологічними рідинами стався з порушенням цілісності шкірних покривів (укол, поріз), потерпілий повинен:
  - зняти рукавички робочою поверхнею всередину;
  - видавити кров з рани;
  - обробити ушкоджене місце (70 % спиртом, або 5 % йодом, або 3 % розчином перексиду водню або іншим дозволеним антисептиком);
  - руки вимити під проточною водою з милом;
  - на рану накласти пластир;
  - надіти напальчник;
  - при необхідності продовжити роботу в нових рукавичках;
13. За умов необхідності стерильної роботи, студенти працюють у підготовлених стерильних ламінарних боксах з увімкненим пальником. Перед запалюванням пальника необхідно упевнитися, що його корпус справний. Запалений пальник не можна переносити з місця на місце, не можна запалювати один пальник від іншого. Гасити газовий пальник потрібно шляхом перекивання вентилів в належних місцях. Гасити спиртівку потрібно, накриваючи полум'я гнота ковпачком. Забороняється: задувати полум'я, залишати без нагляду працюючий пальник або спиртівку, тримати поблизу відкритого вогню легкозаймисті матеріали і речовини.
14. При роботі з біоматеріалами необхідно користуватись інструментами (піпетками, скальпелями, голками). Інструменти, що мали контакт з

біоматеріалами, повністю занурюють у ємності з дезінфікуючи розчином.

15. При фарбуванні препаратів використовують кристалізатори з містками, що знаходяться на кожному робочому місці. Відпрацьовані предметні скельця необхідно помістити в загальний ексикатор, який в кінці заняття виноситься черговими в мийну кімнату.

16. Мікроскоп – точний оптичний прилад, що вимагає суворого дотримання наступних правил роботи з ним:

- підняти конденсор до рівня предметного столика;
- відкрити діафрагму;
- регулювати яскравість вбудованого освітлювача або висвітлити поле зору за допомогою дзеркала (при малій освітленості використовують увігнуте дзеркало, при достатній – плоске);
- на предметне скло з пофарбованим препаратом нанести краплю імерсійного масла, в яку під контролем ока обережно занурити об'єктив;
- дивлячись в окуляр, піднімати тубус макрогвинтом до появи зображення об'єкта;
- за допомогою мікрогвинта встановити чітке зображення об'єкта;
- по закінченні роботи підняти тубус, зняти препарат, видалити імерсійне масло з фронтальної лінзи об'єктиву за допомогою марлевої серветки;
- мікроскоп накрити захисним чохлам.

17. При аварії з посудом, що містить біоматеріал, або проливанні рідкого вмісту ємностей з біоматеріалом, необхідно повідомити про це викладача. Важливо негайно провести дезінфекцію контамінованих поверхонь і предметів:

- уламки скла покласти в бікс;
- на місце аварії нанести дезінфікуючий розчин, витримати 5-10 хв., протерти волого поглинаючою тканиною;
- провести антисептичну обробку контамінованих частин тіла;
- вимити руки з милом.

18. При роботі з електрообладнанням та електроприладами забороняється перевіряти наявність напруги пальцями, переносити включені прилади, що знаходяться під напругою, користуватися несправним електрообладнанням і електропроводкою.

19. Після закінчення заняття робоче місце необхідно привести в порядок, робочі рукавички занурити в дезінфікуючий розчин, ретельно вимити руки.

20. Наприкінці заняття черговий повинен провести вологе прибирання робочих поверхонь із застосуванням дезінфікуючих засобів.

21. Вихід з лабораторії імунології в спецодезії заборонений.

На початку кожного семестру викладач проводить інструктаж з техніки безпеки при роботі з біоматеріалами, пальниками і електроприладами.

Інструктаж фіксується в журналі особистим підписом студента і завіряється підписом викладача.

## **1.2. Дезінфікуючі засоби, що використовуються для роботи в лабораторії імунологічного профілю.**

До дезінфікуючих (*des* – знищення, видалення) засобів відносяться спеціальні сполуки хімічної природи, які володіють властивостями знищення патогенних мікроорганізмів. Дезінфікуючі засоби мають певний спектр антимікробної дії, що залежить від активності складових компонентів, їх концентрації та умов використання. В теперішній час широке розповсюдження отримали дезінфікуючі засоби наступних хімічних груп: галоїдовмісні, киснево-вмісні поверхнево-активні речовини (ПАР), гуанідини, альдегіди та спирти.

При роботі з дезрозчинами необхідно пам'ятати, що будь-яка з цих речовин в певній мірі є токсичною для організму людини. У зв'язку з цим, необхідно дотримуватись правил роботи з ними, а саме:

- приготування робочих розчинів треба проводити тільки у витяжних шафах;
- обробіток посуду та поверхонь проводити в рукавичках, запобігати потраплянню дезінфікуючих засобів на слизові оболонки та шкірні покриви організму людини.

Ємності для дезрозчинів повинні бути чітко промарковані і мати кришки. При маркуванні ємності треба вказати: назву дезінфікуючого розчину, його концентрацію, призначення і дату виготовлення. Розчини дезінфектантів використовуються одноразово.

**Практичне завдання:** приготувати дезінфікуючий засіб та робочі розчини для застосування в умовах навчальної імунологічної лабораторії.

### **Хід роботи.**

#### **1. Приготувати дезінфікуючий розчин «Санідез» (вміст активного хлору 1г на 1 пігулку, строк дії в розчині - 3 доби) для роботи в лабораторії.**

Дезінфікуючий розчин «Санідез» випускається у вигляді пігулок білого кольору, для дезінфекції використовують водні розчини, при розчиненні виділяється 1 г активного хлору. Розчини не ушкоджують вироби з металів, скла, гуми, полімерів. Проявляють бактерицидні, віруліцидні, фунгіцидні, туберкулоцидні, спороцидні властивості. Для роботи застосовують різні концентрації «Санідезу»: для дезінфекції поверхонь і інструментарію в концентрації 0,05 % протягом 10-15 хвилин експозиції, на поверхнях до 60 хвилин, для замочування посуду та інструментів, дезінфекція крові, сироватки, мокротиння та інших біоматеріалів в концентрації 0,2 - 0,3 % термін замочування від 240 до 360 хвилин.

## 2. Приготувати забуферений фізіологічний розчин (ЗФР) (рН 7,2-7,4).

Зважити 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,15-1,44 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2-0,24 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Розчинити солі у невеликій кількості дистильованої води та довести об'єм до 1 л. Профільтрувати розчин. Визначити рН отриманого розчину на іонометрі. Довести рН до потрібних показників за допомогою 1М розчину HCl (1 моль/л) або NaOH. Зберігати ЗФР при кімнатній температурі до використання.

## 3. Приготувати розчин Олсвера (для збереження суспензії еритроцитів).

Зважити 24,6 г глюкози, 9,6 г цитрату натрію, 5,04 г хлориду натрію, розчинити в 1200 мл дистильованої води. Стерилізувати розчин фільтруванням. Для консервації еритроцитів барану 1 частину крові перемішують з 1 частиною розчину Олсвера; еритроцитів людини - 5 частин крові з 1 частиною розчину Олсвера. Еритроцити зберігаються в розчині без додаткових консервантів 8-12 діб.

**Матеріали і обладнання:** NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, HCl (1 моль/л), NaOH, глюкоза, цитрат натрію, дистильована вода, іонометр, ваги, колби, піпетки, воронки, скляні палички, фільтрувальний папір.

### Висновок:

---

---

### Запитання для самоконтролю:

1. Які основні задачі вирішує імунологічна лабораторія?
2. Яке обладнання необхідне для організації лабораторії імунології?
3. Які методи самозахисту використовують при роботі в лабораторії?
4. Опишіть основні правила роботи в лабораторії імунології.
5. Які дезінфікуючі засоби вам відомі?

## Лабораторна робота № 2.

### Ключові методичні підходи в імунологічній лабораторії.

Профіль діяльності як наукової, так і клінічної імунологічної лабораторії, передбачає комплексне дослідження кількісних і функціональних показників *іmunної реактивності* (здатності організму відповідати іmunною реакцією на антигенний подразник). Розрізняють *загальну* і *специфічну* іmunну реактивність. *Загальна* іmunна реактивність – це потенційна здатність організму відповідати на будь-який антигенний подразник. *Специфічна* іmunна реактивність – це здатність організму відповідати на антиген виробленням антитіл або комплексом клітинних реакцій, специфічних по відношенню до цього антигену.

Для оцінки як загальної, так і специфічної імунної реактивності досліджуються кількісні і функціональні характеристики *чинників (факторів) імунного захисту* – рушійної сили імунної реакції. За станом дієздатності *конститутивні* чинники імунного захисту - ті, що знаходяться у дієздатному стані, незалежно від наявності подразника (антимікробні білки і пептиди, такі, як лізоцим, у складі біологічних рідин тощо) та *індуктивні* - ті, що активуються (набувають дієздатності) лише за умови появи подразника (антиген специфічні антитіла тощо). За природою чинники імунної реактивності поділяються на *клітинні* та *гуморальні*. До клітинних чинників належать ефекторні клітини вродженого (моноцити, макрофаги, дендритні клітини, нейтрофіли, еозинофіли, мастоцити (тучні клітини), базофіли, природні кілерні клітини) та адаптивного (Т- і В-клітини) імунітету. До гуморальних чинників належать ейкозаноїди (похідні арахідонової кислоти: простагландини, тромбосани і лейкотрієни), антимікробні білки та пептиди, білки системи комплементу, цитокіни). Результатом комплексного аналізу кількісних і функціональних показників імунної реактивності для оцінки стану імунної системи є *імунограма*. Структура імунограми включає три групи досліджень імунної реактивності:

1. Показники, що характеризують природну резистентність організму (вроджений імунітет);
2. Показники, що характеризують Т-клітинний адаптивний (специфічний) імунітет;
3. Показники, що характеризують В-клітинний адаптивний (специфічний) імунітет.

Кожна група досліджень, у свою чергу, поділяється на *скринінгові тести* (призначені для виявлення вірогідної наявності порушень імунної реактивності) та *уточнюючі тести* (призначені для поглибленого вивчення виявлених порушень імунної реактивності). Як скринінгові, так і уточнюючі дослідження імунної реактивності включають оцінку кількісних і функціональних показників. Наприклад, у перелік **скринінгових тестів для оцінки природної резистентності** входить дослідження відносної кількості фагоцитуючих нейтрофілів у периферичній крові (*кількісний показник клітинного чинника*), дослідження абсолютної і відносної кількості природних кілерних клітин у периферичній крові (*кількісний показник клітинного чинника*), дослідження гемолітичної активності комплементу (*функціональний показник гуморального чинника імунної реактивності*). До переліку **уточнюючих тестів для оцінки природної резистентності** входить дослідження цитотоксичної активності природних кілерних клітин (*функціональний показник клітинного чинника імунної реактивності*), дослідження цитотоксичної активності нейтрофілів периферичної крові (*функціональний показник клітинного чинника імунної реактивності*), дослідження кількісного вмісту у сироватці крові компонентів системи комплементу (*кількісний показник гуморального чинника імунної реактивності*). Перелік **скринінгових тестів для оцінки специфічного імунітету** включає дослідження абсолютної та відносної загальної кількості Т-лімфоцитів (CD3+ клітини), або Т-лімфоцитів різних субпопуляцій (наприклад, CD3+CD8+ цитотоксичних Т-клітин), абсолютної та відносної кількості В-

лімфоцитів (CD3-CD19+, CD3-CD20+ клітин), дослідження сироваткового рівня імуноглобулінів різних ізотипів (класів) без аналізу їх антигенної специфічності. Перелік **уточнюючих тестів для оцінки специфічного імунітету** включає більш детальне дослідження субпопуляційного складу Т- та В-клітин периферійної крові, дослідження проліферативної активності Т- та В-лімфоцитів та продукції ними цитокінів *in vitro*, сироваткові рівні антиген-специфічних імуноглобулінів тощо.

Для дослідження перелічених показників імунної реактивності у лабораторії імунологічного профілю застосовується широкий спектр методичних підходів, котрі включають як *імунологічні методи досліджень* (дослідження, що ґрунтуються на реакції антиген:антитіло), так і інші методи лабораторних досліджень (морфологічні, цитологічні, фізико-хімічні та багато інших). До імунологічних методів досліджень належать: класичні серологічні методи (засновані на реакціях аглютинації корпускулярних антигенів та преципітації розчинних антигенів); проточна цитометрія для оцінки кількісних характеристик клітин імунної системи у периферійній крові (імунофенотипування), іншій біологічній рідині або тканинному гомогенаті, а також для оцінки синтезу цитокінів тощо; імуноферментний (імунофлуоресцентний, радіоімунний) та імунохроматографічний аналіз для оцінки наявності та концентрації імуноглобулінів у сироватці крові, слині або інших біологічних рідинах; імуноцито- та імуногістохімічні методи для дослідження експресії антигенів на поверхні клітин та у структурі тканин з метою виявлення інфільтрації тканини лейкоцитами інших популяцій, малігнізації лейкоцитів тощо.

Для дослідження кількісних та функціональних характеристик (показників) імунної реактивності використовують зразки біологічного матеріалу. Основним біологічним матеріалом для дослідження *системної імунної реактивності* (імунної реактивності організму в цілому) є периферійна кров. Матеріалом для дослідження *локальної або місцевої імунної реактивності* (імунної реактивності окремої ділянки, тканини або органу) може бути тканинний гомогенат, слина, грудне молоко, бронхо-альвеолярний змив (лаваж) тощо. При цьому дослідження кількісних показників імунної реактивності, як правило, проводять у непроцесованому (такому, що не піддавався будь-якій обробці) біологічному матеріалі. Для оцінки функціональних характеристик чинників клітинної імунної реактивності у більшості випадків (але не завжди) матеріалом для дослідження є виділені клітини імунної системи. Оцінка їх функціональних показників проводиться в умовах *in vitro*. Для виділення клітин імунної системи зі зразків біологічного матеріалу користуються препаративними гідродинамічними фізико-хімічними методами, до яких належить седиментація (осадження) з використанням центрифуг (центрифугування). Метод центрифугування застосовують для виділення клітин імунної системи з периферійної крові, інших біологічних рідин, а також для фракціонування тканинних гомогенатів на окремі популяції (субпопуляції) клітин.

Фракціонування суміші клітин крові з метою виділення клітин імунної системи за допомогою центрифугування базується на різній швидкості

седиментації часточок в залежності від їх щільності, форми і розмірів. Швидкість седиментації залежить від відцентрового прискорення ( $G$ ), яке прямопропорційне кутовій швидкості ротора центрифуги ( $\omega$ ) і відстані між часточкою та віссю обертання ротора ( $r$ ):  $G = \omega^2 \times r$ .

Розрізняють препаративне (з метою виділення/розділення компонентів складної суміші) й аналітичне (з метою виділення та аналізу компонентів складної суміші) центрифугування. В імунологічних дослідженнях препаративне центрифугування найчастіше застосовують для виділення досліджуваних клітин (наприклад мононуклеарних лейкоцитів з периферійної крові), субклітинних структур (наприклад, хромосом з клітинних лізатів) та окремих біополімерів (наприклад, імуноглобулінів). Основними видами препаративного центрифугування є диференційне центрифугування, зонально-швидкісне, ізопікнічне (рівноважне). Диференційне (роздільне) центрифугування базується на поетапному збільшенні відцентрового прискорення з відділенням осадів, що утворюються на кожному з етапів. Диференційне центрифугування дозволяє отримати лише збагачені фракції субклітинних компонентів. Зонально-швидкісне центрифугування базується на використанні розчинів (золів) сполук (наприклад, концентрований розчин сахарози, розчин фіколу або золь дрібнодисперсних часточок полівінілпірролідону), котрі формують лінійний або східчастий градієнт густини, на який нашаровується фракціонована суміш з наступним одноетапним центрифугуванням. При цьому частки (наприклад, клітини) різних розмірів зосереджуються розмежованими (зональними), дискретними шарами або смугами. Ізопікнічне центрифугування базується на розподілі компонентів фракціонованої суміші згідно їх щільності у лінійному самоутворюваному градієнті густини. Формування градієнта густини і розподіл компонентів суміші в ізопікнічному центрифугуванні відбуваються практично одночасно. Цей тип центрифугування потребує тривалого часу (24-48 год тощо).

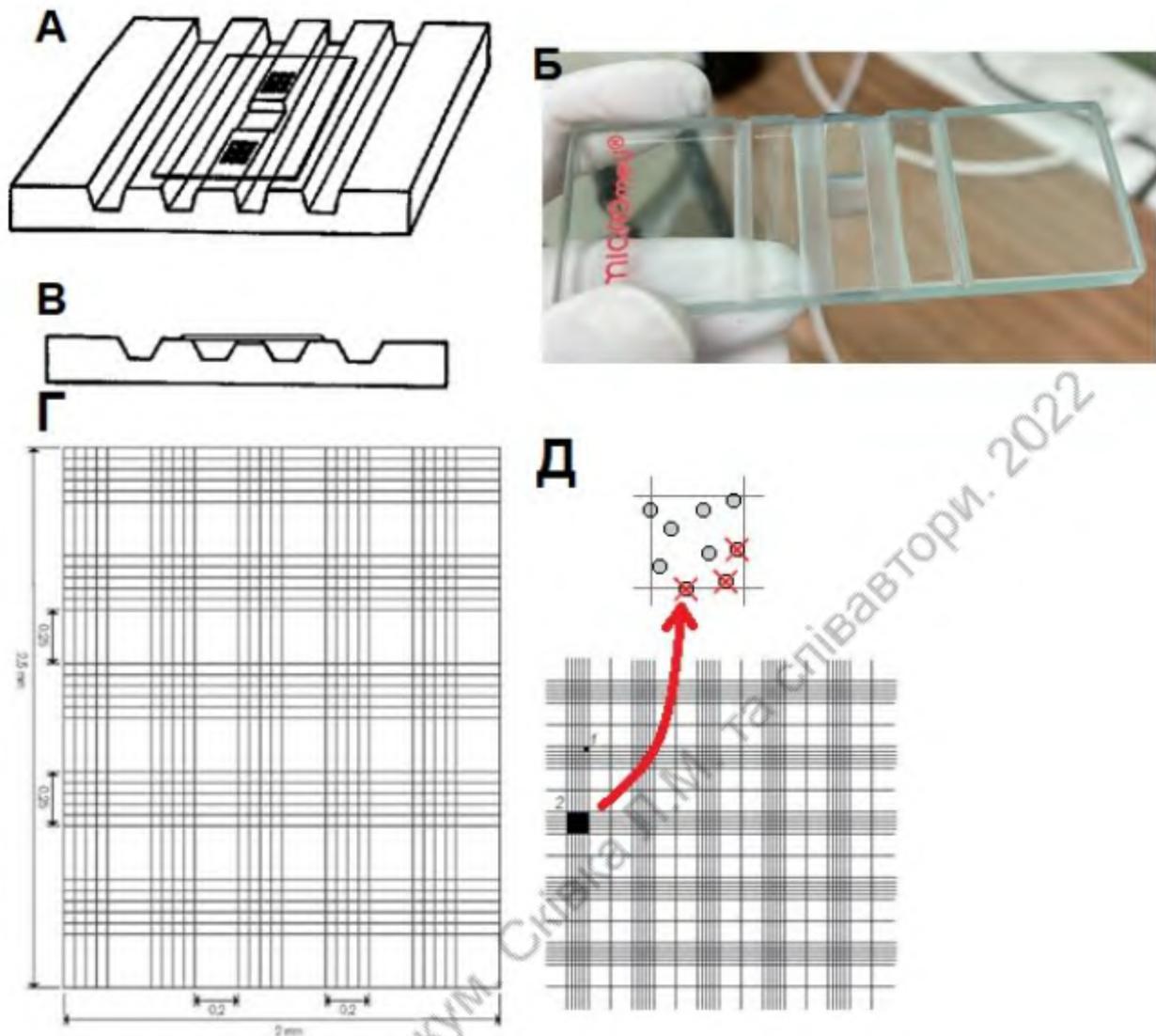
Аналітичне центрифугування використовується для розділення емульсій та тонко дисперсних суспензій при вивченні седиментаційних властивостей макромолекул або інших очищених препаратів клітинних органел. Для цього використовують ультрацентрифуги, які дозволяють розвивати відцентрове прискорення 500000 g і більше.

Центрифуги розрізняють за розміром (малі і середні настільні та великі підлогові), за типом ротору (з кутовим ротором або горизонтальним), за швидкістю (швидкісні, препаративні, ультрацентрифуги). Центрифуги загального призначення розвивають граничну швидкість з відносним відцентровим прискоренням до 6000g і дозволяють центрифугувати великі об'єми розчинів. Перед центрифугуванням пробірки разом з їх вмістом та разом зі стаканами, в яких вони розміщуються, зрівноважуються за масою з точністю  $\pm 0,25$  г. Основними складовими частинами центрифуги є ротор і електродвигун, що його обертає. Розрізняють кутові і горизонтальні ротори з підвісними стаканами. Їх виготовляють з алюмінієвих або титанових сплавів. Кутові ротори зроблені у вигляді суцільнометалевої конусоподібної насадки з

комірками для пробірок, які розташовані у роторі під кутом (20-30°) до осі обертання. Як правило, кутові ротори призначені для осадження матеріалу при диференційному центрифугуванні і для фракціонування часток при ізопікнічному центрифугуванні.

В імунологічних дослідженнях існує необхідність приготування стандартизованих клітинних суспензій для можливості порівняння кількісних і функціональних показників між варіантами досліду (наприклад, між контрольними і дослідними тваринами або між здоровими і хворими людьми). Стандартизована клітинна суспензія – це суспензія з визначеною кількістю (концентрацією) клітин. Стандартизацію суспензії евкаріотичних клітин проводять шляхом визначення концентрації клітин з використанням камери Горяєва або автоматичних лічильників клітин (цитометрів). Камера Горяєва, у першу чергу, призначена для підрахунку формених елементів крові та компонентів клітинних суспензій. Камера має вигляд спеціального цільного предметного скла із поглибленням у центрі, що має точно визначену глибину - 0,1 мм (рис.2.1). На дні камери нанесено 2 сітки Горяєва, вони розмежовані поперечною канавкою. Збоку від сіток розташовані скляні прямокутні пластини, до яких притирається шліфоване покривне скло. Жолобки, що оточують робочу поверхню камери, призначені для відведення надлишкової рідини. Камера Горяєва - це точний вимірювальний пристрій, що потребує дбайливого поводження. Камера складається з 225 великих квадратів, з яких 25 розділені на 16 малих квадратів. Площа великого квадрату –  $1/25 \text{ мм}^2$ , малого квадрату –  $1/400 \text{ мм}^2$ . Об'єм рідини над великим квадратом складає  $4 \times 10^{-3} \text{ мл}$ , а над малим –  $0,25 \times 10^{-3} \text{ мл}$ .

**Технічні характеристики камери Горяєва:** сітка камери Горяєва складається з 225 великих квадратів, з яких 25 розділені на 16 малих квадратів. Розміри малого квадрата камери Горяєва -  $0,05 \times 0,05 \text{ мм}$ . Розміри великого квадрата камери Горяєва -  $0,2 \times 0,2 \text{ мм}$ . Глибина камери - 0,1 мм. Об'єм рідини під 1 малим квадратом -  $0,00025 \text{ мм}^3 \text{ (мкл)} = 1/4000 \text{ мм}^3 \text{ (мкл)}$ . Об'єм рідини під 1 великим квадратом -  $0,004 \text{ мм}^3 \text{ (мкл)} = 1/250 \text{ мм}^3 \text{ (мкл)}$ . Об'єм камери Горяєва -  $0,9 \text{ мм}^3 \text{ (мкл)}$ .



**Рис. 2.1.** Вигляд камери Горяєва зверху (А, Б) та збоку (В); Г: технічні характеристики камери Горяєва; Д: ілюстрація правила Єгорова (вгорі), великий (2) та малий (1) квадрати сітки камери.

**Практичне завдання:** приготувати стандартизовану суспензію дріжджових клітин.

### Хід роботи

1. **Визначити відносне прискорення центрифуги для проведення центрифугування у заданому режимі.** За допомогою лінійки виміряти відстань (см) від осі обертання ротора до середини стовпчика рідини у пробірці (коли тримач перебуває у положенні центрифугування). Розрахувати за допомогою номограми (рис. 2) відносне прискорення центрифуги (rcf, від англ. relative centrifuge force, вимірюється в g) за різної швидкості обертання ротора (n, rpm – від англ. revolutions per minute - обертів/хвилину). Для цього за допомогою лінійки необхідно сполучити значення радіусу (шкала А зліва) та швидкості (шкала С справа), та на центральній шкалі В між ними знайти значення відносного прискорення.

2. **Отримати очищену суспензію дріжджових клітин.** У пробірку з добовою культурою *Saccharomyces cerevisiae*, що виросла на скошеній поверхні хлібного агару, внести за допомогою піпетки (автоматичного дозатора) 5 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) і обережно обертати її між долонями до повного змиву з поверхні середовища біомаси мікроорганізмів. Перенести суспензію мікроорганізмів за допомогою піпетки (автоматичного дозатора) в окрему пробірку та осадити клітини центрифугуванням при 3 тис. об/хв впродовж 10 хв. Надосадову рідину (супернатант) злити в ексікатор з дезінфікуючим розчином. До осаду додати 5 мл ЗФР, ресуспендувати осад шляхом піпетування, провести повторне відмивання клітин шляхом центрифугування суспензії в аналогічному режимі. За необхідності (у випадку, коли каламутність надосаду свідчить про наявність у складі суспензії клітинного дебрису та інших домішок) провести відмивання клітин тричі. Після останнього відмивання осад ресуспендувати у 5 мл ЗФР.

3. **Провести стандартизацію клітинної суспензії.** Зібрати камеру Горяєва: чистим покривним скельцем накрити предметне скло камери і щільно його притерти по краях. Категорично забороняється притискати предметне скельце в центрі над сіткою, оскільки це може призвести до розтріскування скельця та псування камери. Показником правильної підготовки камери до роботи є поява інтерференційних кілець з країв покривного скельця.

Обережно заповнити камеру суспензією дріжджових клітин, попередньо розведеною у 10-200 разів (залежно від результату візуальної оцінки щільності суспензії) ЗФР. Для цього внести краплину розведеної суспензії між боковими краями покривного скельця, що прилягають до сітки камери. Рідина заповнює простір камери під впливом капілярних сил. Після заповнення камери клітини короткий час (1-2 хв) осідають.

Провести мікроскопічний підрахунок клітин у камері Горяєва при збільшенні об'єктиву x20 або x40. Підрахувати клітини у 25 великих квадратах. Клітини, що потрапляють на ребра квадратів, рахують тільки з двох боків, наприклад, зліва і зверху (правило Єгорова, рис. 1. Д).

Розрахувати загальну кількість клітин у суспензії. Враховуючи, що глибина стандартної камери – 0,1 мм, а площа великого квадрата дорівнює 0,04 мм<sup>2</sup>, об'єм суміші над великим квадратом становить 0,004 мм<sup>3</sup>, а над 25 великими квадратами – 0,1 мм<sup>3</sup>. Тому, якщо підраховано у 25 великих квадратах кількість клітин помножити на 10<sup>4</sup> – отримаємо кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії, внесеної в камеру. Отриману цифру треба також помножити на розведення. Якщо розведення суспензії було здійснене у 100 разів, то отримана цифра відповідатиме концентрації клітин, вираженій у мільйонах в мілілітрі (10<sup>6</sup>/мл).

$K = A \times P \times 10^4$ , де  $K$  – кількість клітин в 1 мл досліджуваної суспензії,  $A$  – підрахована кількість клітин у 25 великих квадратах,  $P$  – розведення суспензії клітин.

Якщо кількість клітин в камері Горяєва є дуже великою можна використати наступну формулу:

$X = (a \times b) / (c \times d)$ , де  $X$  — число клітин в 1 мкл суспензії,  $a$  — число підрахованих клітин;  $b$  — розведення суспензії;  $c$  — об'єм одного великого квадрата ( $4,0 \times 10^{-3}$  мкл);  $d$  — число великих квадратів, в яких проводився підрахунок.

**Матеріали і обладнання:** добова культура *Saccharomyces cerevisiae*, пробірки, забуферений фізіологічний розчин (ЗФР), стерильні піпетки (автоматичні дозатори зі стерильними наконечниками), камери Горяєва, світлопольний мікроскоп, лабораторна центрифуга.

**Висновок:**

---

---

**Запитання для самоконтролю:**

1. З якою метою використовують метод седиментації в імунологічних дослідженнях?
2. Вкажіть різновиди центрифугування та принципи їх застосування.
3. З яких структурних частин складається камера Горяєва та які її технічні характеристики?
4. З якою метою застосовують камеру Горяєва в імунологічних дослідженнях.
5. Опишіть основні етапи підготовки камери Горяєва до роботи та принцип розрахунку клітин з її допомогою.

### **Лабораторна робота №3.**

#### **Дослідження органів імунної системи експериментальних тварин**

Для проведення досліджень в галузі імунології, наприклад отримання імунних сироваток, найчастіше використовують таких тварин, як кролі, мурчаки, щурі та миші. Інбредні миші є найбільш зручним об'єктом для фундаментальних досліджень. *Інбредні тварини* — це тварини, що отримані шляхом інбридингу (in breed — розводити, виводити породу), тобто шляхом послідовних близько родинних схрещень з метою одержання гомозиготного та генетично ідентичного потомства. Серед потомків для подальших схрещень спочатку обирають особин за ознаками зовнішньої подібності, у наступних поколіннях тварин тестують на співпадіння груп крові та приживлення шкірних трансплантатів. Через 20

покоління і більше такої селекції отримують мишей з високим ступенем гомозиготності, що позначаються як чиста лінія, в межах якої всі тварини генетично майже ідентичні (наприклад, як однойцеві близнюки у людини). Головна мета виведення чистих ліній мишей і досліджень на них – отримання можливості багатократного повтору експериментів на генетично ідентичних організмах, тобто забезпечення відтворення результатів досліджень, що виключено при використанні нелінійних тварин. Також при виборі виду експериментальних тварин керуються економічними питаннями. Зокрема, миші є зручним об'єктом для імунології, адже отримання нового покоління тварин відбувається досить швидко (строк вагітності складає 21 добу, від однієї самиці народжується 5-8 особин), а собівартість утримання дорослих особин у порівнянні з такою інших ссавців є найменшою. Також важливо, що структура та функція імунної системи миші та людини багато в чому схожі. Крім того, виведення чистих ліній у мишей не завжди призводить до виродження, деякі лінії мають гарні показники здоров'я та виживання. Шляхом цілеспрямованого відбору тих чи інших властивостей були створені різні лінії мишей з точно заданими характеристиками, що дозволяє вибирати особин, необхідних для досягнення конкретних наукових цілей. В розплідниках, що займаються розведенням тварин, підтримувані лінії мають паспорт, вони систематизовані у відповідних базах даних і доступні для широкого застосування.

Найбільш відомі лінії мишей, які обираються для експериментальної роботи в імунології наступні: А (з високим рівнем спонтанних пухлин молочної залози), АК (з високим рівнем лейкемії), С (BALB/с, чутливі до радіації), СВА (з імунодефіцитами, пов'язаними з Х-хромосою), С3 (мають високий рівень спонтанних пухлин молочної залози), С57BL/6 (дуже агресивні та чутливі до радіації), L (чутливі до експериментального аутоімунного енцефаліту), D (чутливі до пневмококової інфекції), NZB (з високим рівнем аутоімунних захворювань гемолітичної анемії та нефриту), NZW (з аутоімунним системним червоним вовчаком) тощо. Також існують лінії тварин з генетичними дефектами, що пов'язані з факторами імунної системи. SCID (англ. severe combined immunodeficiency) – миші, у яких розвивається важкий імунодефіцит в результаті мутації в генах RAG, що відповідають за перегрупування генів імуноглобулінів та Т-клітинного рецептора. У таких тварин практично відсутні Т- та В-лімфоцити, вони здатні виживати лише в безмікробному середовищі. Ці миші не відторгають ксеногенні тканини, тому їм можна використовувати для приживлення різних ліній клітин людини. Лінія мишей Nude особлива тим, що тварини цієї лінії повністю втрачають волосяний покрив, вони мають спонтанну мутацію, в

результаті якої в них зникає тимус. Мутантний ген перенесений кільком лініям, наприклад Balb/c, CBA/Ca, C57Bl/10ScSn та ін. C57Bl/6-bg/bg (англ. beige – бежевий) – миші з бежевим забарвленням хутра, які характеризуються зниженою активністю природних кілерних клітин (ПКК) і наявністю фагоцитів з пошкодженням лізосомальних структур. AKR – миші з білим хутром, у 90% яких у віці 6-8 місяців розвиваються спонтанні тимоми та лейкози. W/W<sup>v</sup> – миші з дефіцитом тучних клітин (мастоцитів) в слизових оболонках. Виведені лінії мишей з аутоімунною патологією: NZB (англ. New Zeland Black) – з аутоімунною гемолітичною анемією, MRL – миші з червоним вовчаком та ревматоїдним артритом, гломерулонефритом, C57Bl/KS-db/db – схильні до ожиріння, з діабетом, NOD (англ. non-obese diabetic mouse) – миші з діабетом без ожиріння, EAGM (англ. experimental autoimmune myasthenia gravis) – миші з аутоімунною міастенією гравіс, EAE (англ. experimental autoimmune encephalitis) та EAT (англ. experimental autoimmune thyroiditis) – миші з аутоімунним енцефалітом та тиреоїдитом, відповідно.

Крім власне чистих ліній мишей, генетики навчилися виводити так званих *конгенних* мишей. Це такі лінії, що відрізняються одна від іншої невеликою ділянкою геному (інколи навіть одним геном). В основі отримання конгенних ліній лежить генетичний прийом зворотного схрещення – отримання потомства в ряду поколінь від схрещення гетерозиготи (потомків гомозиготних батьків, генетично різних між собою) з одним з вихідних гомозиготних батьків.

Імунна система ссавців має складну будову і загалом складається з лімфоїдних органів та тканин, лімфатичних судин та клітин імунної системи, що складають структуру лімфоїдних органів та рухаються за крово- чи лімфотоком. Органи імунної системи ссавців поділяють на *центральні* (первинні) і *периферійні* (вторинні). В центральних лімфоїдних органах відбувається утворення мієлоїдних та лімфоїдних клітин, їх антигеннезалежне диференціювання та дозрівання. До центральних органів відносять кістковий мозок, тимус, сумку Фабриція (у птахів). Т-лімфоцити утворюються, набувають антигенної специфічності, дозрівають, проходять селекцію у тимусі, В-лімфоцити – у кістковому мозку та бурсі Фабриція. У периферійних лімфоїдних органах відбувається антигензалежне диференціювання лімфоцитів, власне, розвиток імунної відповіді. До периферійних лімфоїдних органів відносять лімфовузли, селезінку, лімфоїдну тканину, асоційовану зі слизовими (MALT - mucosa-associated lymphoid tissue, яка включає NALT (nasal-associated lymphoid tissue), BALT (bronchus-associated lymphoid tissue), GALT (gut-associated lymphoid tissue), та асоційовану зі шкірою (SALT - skin-associated lymphoid tissue). Різні периферійні лімфоїдні органи

одночасно містять як Т- так і В-лімфоцити, проте кількість клітин різних популяцій може варіювати. Наприклад, у лімфовузлах за кількістю переважають Т-клітини, тому ці органи є осередками розвитку, в першу чергу, клітинної відповіді. У селезінці і мигдаликах переважають В-лімфоцити, тому ці органи спеціалізуються на розвитку, в першу чергу, гуморальної імунної відповіді. Звісно, переважання у органі лімфоцитів певної популяції не виключає можливості розвитку імунної відповіді альтернативного типу – клітинної чи гуморальної. Відносна кількість (%) лімфоцитів різних популяцій у органах імунної системи людини наведено у таблиці 3.1. Крім лімфоцитів у всіх органах імунної системи локалізуються також інші популяції клітин мієлоїдного походження (макрофаги, дендритні клітини, гранулоцити), що виконують допоміжну роль у процесах розвитку імунних реакцій.

Після дозрівання лімфоцити мігрують з центральних лімфоїдних органів у периферійні, де відбувається розвиток імунної відповіді, а саме: розпізнавання антигену, формування і розвиток популяцій специфічних до антигену лімфоцитів, а також формування імунної пам'яті до антигену. Тому при розвитку первинної або вторинної імунної відповіді кількість лімфоцитів у певних периферійних лімфоїдних органах, наприклад, регіонарних лімфовузлах, може значно збільшуватись.

**Таблиця 3.1**

**Клітинний склад лімфоїдних органів людини (Ярилин А.А. Основи иммунологии, 1999, М. «Медицина»).**

Органи і тканинні рідини	% лімфоцитів від загальної кількості клітин*	% від загальної кількості лімфоцитів в організмі	В-клітини, %	Т-клітини, %	CD4+ - клітини, %	CD8+ - клітини, %	Клітини, що діляться
Кістковий мозок	10-15	8-10	10-12	1-4	2,6	2,3	25-30
Тимус	95-98	10-12		96-98	8-10	4-6	20-25
Селезінка	80-85	20-25	40-50	25-35	20-25	10-12	5-7
Лімфатичні вузли	90-95	15-20	35-40	55-65	30-40	15-20	2-4
Мигдалики	85-90		40-55	25-30	Н.д.	Н.д.	5-10
Групові лімфатичні фолікули	90-95	20-25**	30-40	25-30	Н.д.	Н.д.	5-8
Кров	20-35	0,5	13-18	60-70	35-50	20-25	< 5

\* Показник розрахований для мишей, \*\* Дані для лімфоїдної тканини травного тракту в цілому, Н.д. – немає даних.

Аналіз морфометричних (розмір, маса) показників лімфоїдних органів є важливим елементом оцінки стану імунної системи у людини і тварин. Морфометричним показником для характеристики лімфоїдних органів у людини є, як правило, їх розмір. Наприклад: тимомегалія (збільшення розміру тимусу) спостерігається у випадку тимоми чи лімфоми (неоплазія тимусу); інволюція тимусу відбувається протягом старіння організму, але може спостерігатися її прискорення внаслідок пливу стресу, радіаційного опромінення, порушення гормонального статусу, впливу токсичних речовин.

Спленомегалія відбувається при деяких інфекціях (мононуклеоз, малярія, туберкульоз), запальних аутоімунних захворюваннях (ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак), неопласничних захворюваннях (лейкоз, лімфома); зменшення розміру селезінки може спостерігатися при серповидно-клітинній анемії, целиакії, виразковому коліті. Збільшення розмірів лімфовузлів відбувається при інфекційних та пухлинних процесах; вікова інволюція лімфоїдних тканин включає зменшення розміру лімфовузлів, але їх атрофія прискорюється при ВІЛ-інфекції. Морфометричними показниками лімфоїдних органів, які досліджуються у тварин, є їх розмір, маса та органні індекси (відношення маси органу до маси тіла тварини). Для проведення імунологічних досліджень з використанням лабораторних тварин часто буває необхідним отримання лімфоцитів з різних лімфоїдних органів. При цьому розраховують абсолютну та відносну кількість ядромісних клітин в органі, клітинний індекс (відношення абсолютної кількості клітин в органі до маси органу). Морфометричні та клітинні показники лімфоїдних органів лабораторних тварин досліджують при вивченні імунної відповіді при різній патології та в ході токсикологічних досліджень.

**Практичне завдання:** ознайомитись з розташуванням лімфоїдних органів та розрахувати вагові індекси тимусу, селезінки, лімфовузлів лабораторної миші.

### Хід роботи

1. **Ознайомитись з розташуванням лімфоїдних органів лабораторної миші.** Визначити загальну масу тіла евтаназованої миші. Мишу зафіксувати на препарувальному столику спиною донизу. Шкіру черевця обробити 70% розчином етилового спирту, розрізати шкіру за середньою лінією вздовж усього тіла. Шкіру обережно відсепарувати і зафіксувати препарувальними голками. Обережно, щоб не пошкодити внутрішні органи, зробити надрізи передньої черевної стінки та зафіксувати препарувальними голками. Зробити надрізи реберних кісток біля грудини з обох боків, підняти грудину пінцетом. Розглянути

та позначити на рисунку 3.1 розміщення первинних та вторинних органів та тканин лімфоїдної системи: тимус, кістковий мозок, селезінку, лімфовузли, SALT, BALT, GALT.

## 2. Розрахувати вагові показники органів лабораторної миші.

А) Тимус локалізований між грудиною і серцем у вигляді двох пелюсток молочно-білого кольору. Тимус обережно пінцетом та за допомогою ножиць від'єднати від навколишніх тканин. Помістити тимус у чашку Петрі з ЗФР.

Б) Селезінка – продовгуватий темно-червоний орган, оточений сполучнотканинною капсулою – знаходиться праворуч (з позиції дослідника) від шлунку за його великою кривиною, поза кишечником. Селезінку від'єднати від навколишніх тканин за допомогою пінцету та ножиць. Помістити селезінку у чашку Петрі з ЗФР.

В) Пахвинні лімфовузли знаходять на відгорнутій в ділянці пахвини шкірі та у місці перетину магістральних кровоносних судин. Пахвові лімфовузли знаходять під пахвами тварини у ділянці перетину магістральних кровоносних судин. Лімфовузли брижі слід шукати на брижі (сполучнотканинні тяжі, що підтримують кишечник). Лімфовузли від'єднати від навколишніх тканин за допомогою пінцету та ножиць. Помістити лімфовузли у чашку Петрі з ЗФР.

Зважити органи на торсійних вагах. Розрахувати вагові індекси виділених органів: відношення маси органу до загальної маси тіла тварини.

Г) Кістковий мозок виділити із стегнової кістки. Для цього задню лапку миші ретельно обробити розчином спирту, зробити надріз шкіри на рівні колінного суглоба, від'єднати шкіру від колінного суглоба до тазового поясу. Ножицями надрізати м'язи біля колінного суглоба і оголити кістку. Скальпелем відсунути м'язи до стегна. У ділянці кульшового суглоба ножицями відділити стегнову кістку від тулуба та з іншого боку відділити стегнову кістку від колінного суглоба. Помістити кістку в чашку Петрі з середовищем 199. Відрізати епіфізи з двох боків ножицями, за допомогою шприца із ЗФР вимити з кістково-мозкового каналу вміст у пробірку.



**Рис.3.1. Органи та тканини лімфоїдної системи миші.**

**Матеріали і обладнання:** миші віком 2,5-3 місяці, вагою 25-30 г, препарувальні столики, голки, розчин етилового спирту 70%, вата, ножиці та пінцети для препарування, шприци, охолоджене середовище 199, ЗФР, чашки Петрі, центрифужні пробірки, піпетки, торсійні ваги.

**Висновок:**

---



---

**Запитання для самоконтролю:**

1. Назвіть органи та тканини імунної системи.
2. Які органи лімфоїдної системи називають центральними і чому?
3. Які органи лімфоїдної системи називають периферійними і чому?
4. Де у миші знаходиться тимус, селезінка, лімфатичні вузли?
5. Які органи миші спеціалізуються на забезпеченні антиген-залежного дозрівання В-лімфоцитів?

## Лабораторна робота № 4.

### Будова лімфатичної системи та лімфоїдних органів ссавців

Лімфа утворюється в результаті надходження тканинної рідини у лімфатичні судини. У лімфу потрапляють продукти обміну речовин, гормони та ферменти. У різних органах лімфа має неоднаковий склад, наприклад, у кишечнику у неї потрапляють продукти розщеплення харчових речовин (лімфа містить тут хіломікрони – жирові часточки, і називається хілум). Лімфатична система - це сукупність судин, по яким рухається лімфа, з розташованими по їх ходу лімфатичними вузлами. Лімфатичні судини починаються на периферії, а напрям току лімфи по них, в цілому, є паралельним руху крові у венозних судинах. Найбільші лімфатичні судини впадають у вени і таким чином лімфа потрапляє у кровоносне русло. Функціями лімфатичної системи є дренажна, транспортна, захисна і кровотворна.

Лімфатична система людини складається з кількох ланок: 1. лімфатичних капілярів; 2. лімфатичних судин; 3. лімфатичних вузлів; 4. лімфатичних сплетінь; 5. лімфатичних стовбурів; 6. лімфатичних протоків.

Лімфатичні капіляри починаються сліпо у тканинах, їх діаметр в кілька разів перевищує діаметр кровоносних капілярів. Стінка лімфатичного капіляра побудована з одного шару ендотелію, до яких прикріплені фіксуючі філаменти, що зв'язують стінки капіляра з колагеновими волокнами оточуючої сполучної тканини. Лімфатичні капіляри присутні майже у всіх тканинах і органах тіла, за виключенням речовини мозку, оболонки мозку, паренхіми селезінки, поверхневого епітелію, хряща, очного яблука, внутрішнього вуха, твердих тканин зуба, плаценти. З лімфатичних капілярів лімфа потрапляє до більших відвідних судин, які знаходяться, як правило, поруч з артеріями та венами. У стінці лімфатичних судин з'являються гладенько-м'язові волокна, скорочення яких проштовхують лімфу по судинному руслу. Також односпрямованому руху лімфи сприяє наявність клапанного апарату судин, наявність градієнту тиску в судинах, рухи мускулатури та дихальні рухи, скорочення лімфатичних вузлів та пульсація сусідніх кровоносних судин.

Лімфа, що відтікає з різних органів, проходить послідовно через кілька лімфатичних вузлів. За своєю локалізацією лімфатичні вузли розділяють на пристінкові (розміщуються на стінках тулуба) та нутрощеві (розміщуються поруч з внутрішніми органами), поверхневі та глибокі. *Регіонарними* називають лімфатичні вузли, що приймають лімфу з кількох органів, наприклад шлунка і яєчника. В таких вузлах змішується лімфа різного складу. Найбільші скупчення

лімфатичних вузлів знаходяться у людини в пахвовій ділянці, в поперековій ділянці по ходу черевної аорти та нижньої порожнистої вени, на брижі тонкої кишки, в середостінні, на шиї по ходу внутрішньої яремної вени і в пахвинній ямці. Приносні (аферентні) судини несуть лімфу до лімфатичного вузла та потрапляють до органу з його опуклої сторони, а виносні (еферентні) судини відводять лімфу із вузла та беруть початок у заглибленні органу, що має назву ворота. Лімфатичні судини, що збирають лімфу з кількох органів або ділянок тіла, утворюють лімфатичні сплетіння. Зі сплетінь формуються *лімфатичні стовбури*, що є колекторами лімфи, яка відтікає від значної ділянки тіла. Лімфатичні стовбури зливаються в *лімфатичні протоки*, що впадають у вени. Розрізняють *грудну протоку*, що відкривається у лівий венозний кут (утворений яремною та підключичною венами), та *праву лімфатичну протоку*, що впадає у правий венозний кут.

Грудна протока бере початок у верхньому відділі черевної порожнини, в заочеревинному просторі. Її корінням є правий та лівий *поперекові лімфатичні стовбури*, що несуть лімфу з усієї нижньої половини тіла. На початку грудної протоки знаходиться розширення – *молочна цистерна*, яка функціонує подібно до пасивного лімфатичного серця та під час процесу дихання сприяє просуванню лімфи по грудному протоку. Довжина грудної протоки у дорослої людини - 30-41 см, діаметр – біля 3 мм. У шийному відділі в грудну протоку впадають лімфатичні стовбури: лівий *яремний стовбур*, що приносить лімфу від лівої половини голови та шиї, лівий *bronхо-середостінний стовбур*, що збирає лімфу від лівої частини органів грудної клітки, та лівий *підключичний стовбур*, по якому рухається лімфа з лівої верхньої кінцівки та плечового поясу. Таким чином, в грудну протоку потрапляє лімфа з нижньої половини та лівого верхнього квадранта тіла.

Права лімфатична є короткою судиною, що утворюється від злиття правої яремної, бронхо-середостінної та підключичної стовбурів, що є аналогічними до таких на лівому боці. Права лімфатична протока збирає лімфу з правої наддіафрагмальної частини організму.

Паренхіма органів імунної системи утворена лімфоїдною тканиною, яка є морфо-функціональним комплексом лімфоцитів, плазматичних клітин, макрофагів та інших клітин, що знаходяться в петлях ретикулярної тканини. Первинні органи імунної системи - кістковий мозок та тимус – містять спеціалізоване мікрооточення для утворення та дозрівання клітин імунної системи. Найбільш незрілі та недиференційовані клітини, які швидко проліферують знаходяться дистантно від центру органу: у кістковому мозку – ближче до кортикального шару кістки, у тимусі – в підкапсулярній зоні. По мірі

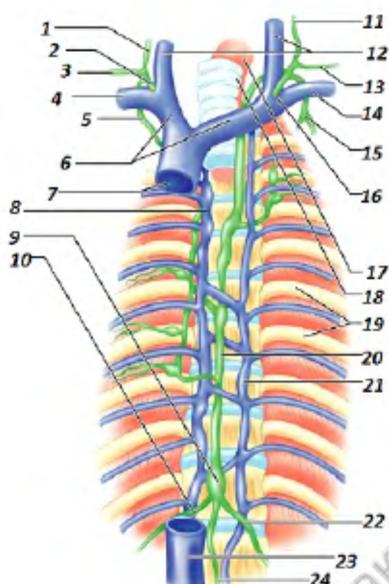
дозрівання клітини рухаються до зон виходу з центральних органів: до синусів - у кістковому мозку, та до медули і кортико-медулярного з'єднання – у тимусі. Через кровоносні судини клітини залишають первинні органи та заселяють вторинні лімфоїдні тканини. Кістковий мозок поділяють на червоний кістковий мозок, який у дорослої людини розміщується у порожнині губчастої речовини плоских та коротких кісток, епіфізах довгих кісток, і жовтий кістковий мозок, що заповнює кістково-мозкову порожнину діафізів довгих кісток. Складається червоний кістковий мозок з ретикулярної тканини, а також гемопоетичних елементів та допоміжних клітин, що знаходяться в її петлях. В ньому містяться стовбурові кровотворні клітини (СКК) – попередники всіх клітин крові та лімфи. Жовтий кістковий мозок є в основному жировою тканиною, яка заміщує ретикулярну. Строму тимусу формують клітини епітеліального походження, які формують мікрооточення для дозрівання Т-лімфоцитів, що мігрували з кісткового мозку. Також в тимусі, як допоміжні клітини функціонують дендритні клітини та макрофаги.

Вторинні органи імунної системи містять тимус-залежні зони: у лімфатичних вузлах – це паракортикальна зона, а в селезінці - периартеріолярні лімфоїдні муфти (ПАЛМ) білої пульпи, у лімфоїдних тканинах слизової оболонки – міжфолікулярний простір. В-лімфоцити у вторинних тканинах розміщуються у бурсо-залежних зонах, якими є лімфоїдні фолікули, що розміщуються в кортексі лімфатичних вузлів та в білій пульпі селезінки. Фолікули поділяють на первинні та вторинні. Первинні фолікули не містять зародкових центрів і складаються із наївних В-л у стані спокою. Вторинні фолікули формуються з первинних, до яких мігрують активовані антигеном та Т-хелперами В-лімфоцити, тут вони проліферують та утворюють центри розмноження. Також у фолікулах розміщуються фолікулярні дендритні клітини і макрофаги. На гістологічних препаратах бластні клітини, що активно проліферують у центрах розмноження, забарвлюються слабше, тому центральна частина вторинного фолікула є світлішою. Особливістю структури селезінки, яка вилучає антигени з крові, є наявність білої та червоної пульпи та крайової зони, через яку відбувається активна міграція клітин імунної системи. Вторинні лімфоїдні тканини служать для того, щоб затримувати антигени (патогенні мікроорганізми та чужорідні речовини), які рухаються в організмі через кров (селезінка), лімфатичну систему (лімфатичні вузли), слизові оболонки (MALT – асоційована зі слизовими оболонками лімфоїдна тканина), та шкіру (SALT - асоційована зі шкірою лімфоїдна тканина), та генерувати імунну відповідь на них.

**Практичне завдання:** розглянути постійні препарати органів лімфоїдної системи ссавців та позначити на схемах лімфатичні судини та основні структурні елементи лімфоїдних органів.

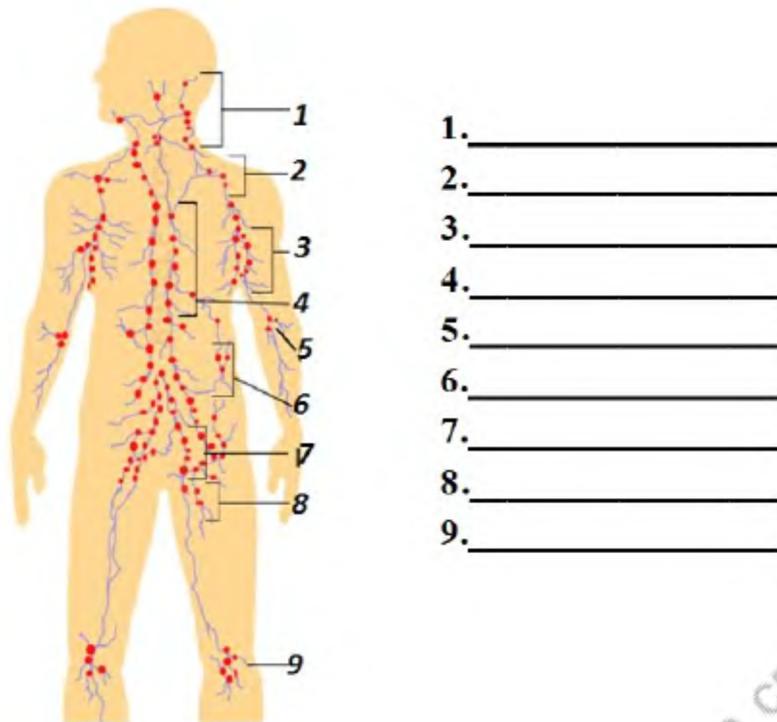
### Хід роботи

**1. Вивчити будову лімфатичної системи.** Розглянути та позначити на схемі структурні елементи систем правої лімфатичної протоки та грудної протоки людини: праві та ліві яремні стовбури, підключичні стовбури, бронхо-середостінні, поперекові, кишковий стовбур, молочну цистерну, правий та лівий венозні кути (Рис. 4.1). Позначити розміщення основних груп лімфатичних вузлів в організмі людини: шийні лімфовузли, надключичні, пахвові, середостінні, надблокові, брижові, тазові, пахвинні, підколінні (Рис. 4.2).



- |           |           |
|-----------|-----------|
| 1. _____  | 13. _____ |
| 2. _____  | 14. _____ |
| 3. _____  | 15. _____ |
| 4. _____  | 16. _____ |
| 5. _____  | 17. _____ |
| 6. _____  | 18. _____ |
| 7. _____  | 19. _____ |
| 8. _____  | 20. _____ |
| 9. _____  | 21. _____ |
| 10. _____ | 22. _____ |
| 11. _____ | 23. _____ |
| 12. _____ | 24. _____ |

**Рис. 4.1.** Схема будови систем правої та грудної лімфатичних проток людини.



1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_
8. \_\_\_\_\_
9. \_\_\_\_\_

**Рис. 4.2. Основні місця розташування груп лімфовузлів у організмі людини.**

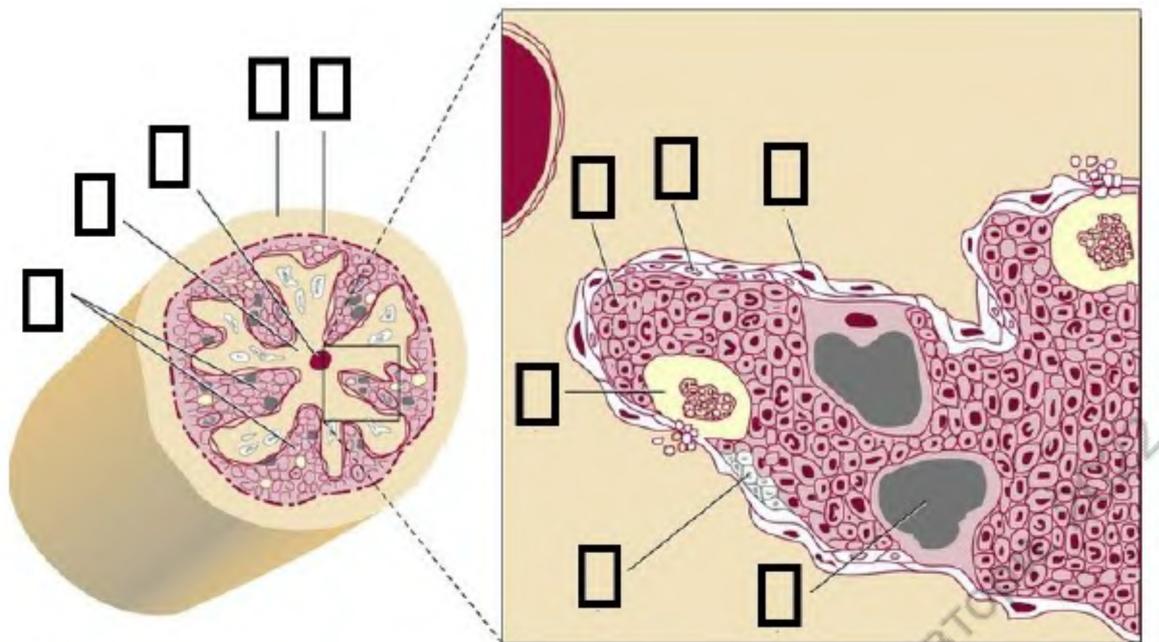
**2. Вивчити будову органів лімфоїдної системи.** Позначити на схемах структурні елементи центральних органів імунної системи: тимусу та кісткового мозку, та периферійних органів імунної системи: лімфовузла та селезінки. Розглянути постійні препарати тимусу, селезінки та лімфовузлів миші та щура, використовуючи різні об'єктиви зі збільшенням  $\times 10$  та  $\times 40$ , замалювати гістологічні препарати та позначити:

а) гемапоетичний тяж, центральний синус, центральну артерію, ендост, компакту речовину кістки, мегакаріоцит, еритробластний острівець, гранулоцит, адипоцит, ендотеліальну клітину, адвентиційну клітину *кісткового мозку* (рис.4.3).

б) дольку, капсулу та трабекули, кортекс та медулу, тільця Гассаля, судини *тимусу* (рис.4.4);

в) капсулу та трабекули, білу та червону пульпу, крайову зону, первинний та вторинний фолікул, судини *селезінки* (рис.4.5).

г) капсулу з трабекулами, кортекс, паракортекс та медулу, первинний та вторинний фолікул, аферентні та еферентні лімфатичні, та кровоносні судини *лімфовузла* (рис. 4.6).



- |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|
| 1. гемопоетичний тяж         | 6. мегакаріоцит              |
| 2. центральний синус         | 7. еритробластний острівцець |
| 3. центральна артерія        | 8. гранулоцит                |
| 4. ендост                    | 9. адипоцит                  |
| 5. компактна речовина кістки | 10. ендотеліальна клітина    |
|                              | 11. адвентиційна клітина     |

Рис. 4.3. Будова кісткового мозку ссавців (схема).

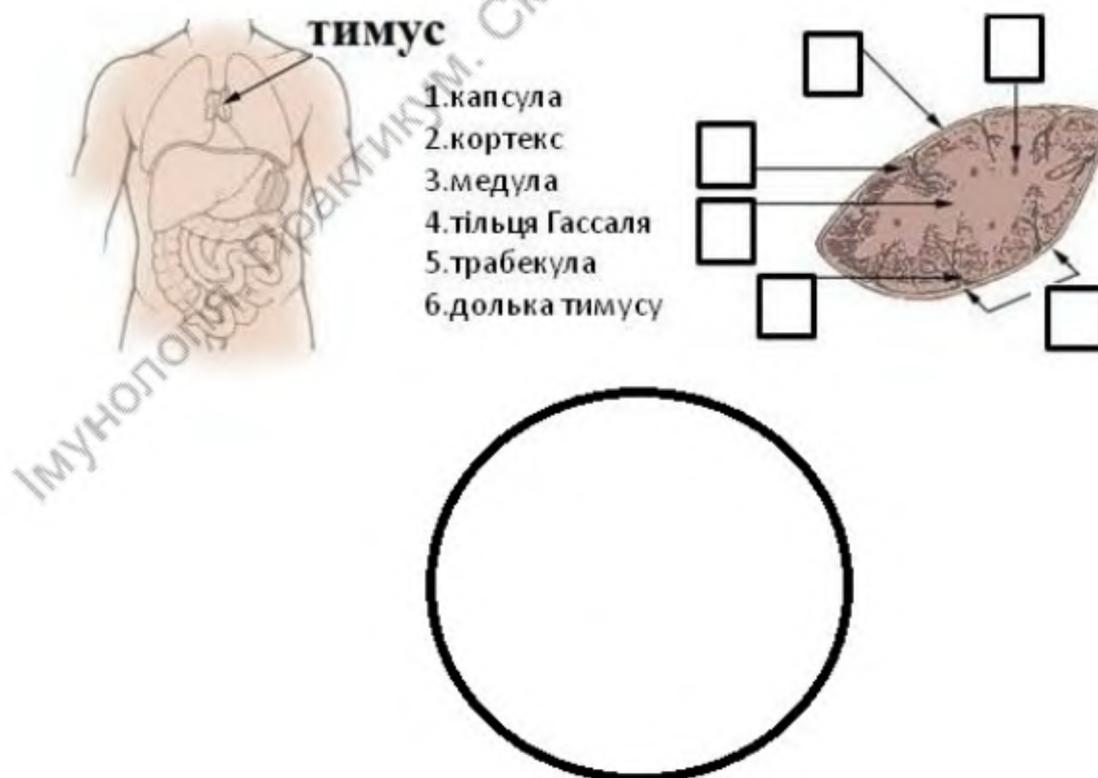


Рис. 4.4. Будова тимусу ссавців (схема) та гістологічний препарат (забарвлення - гематоксилін-еозин, збільшення об'єктиву x40).

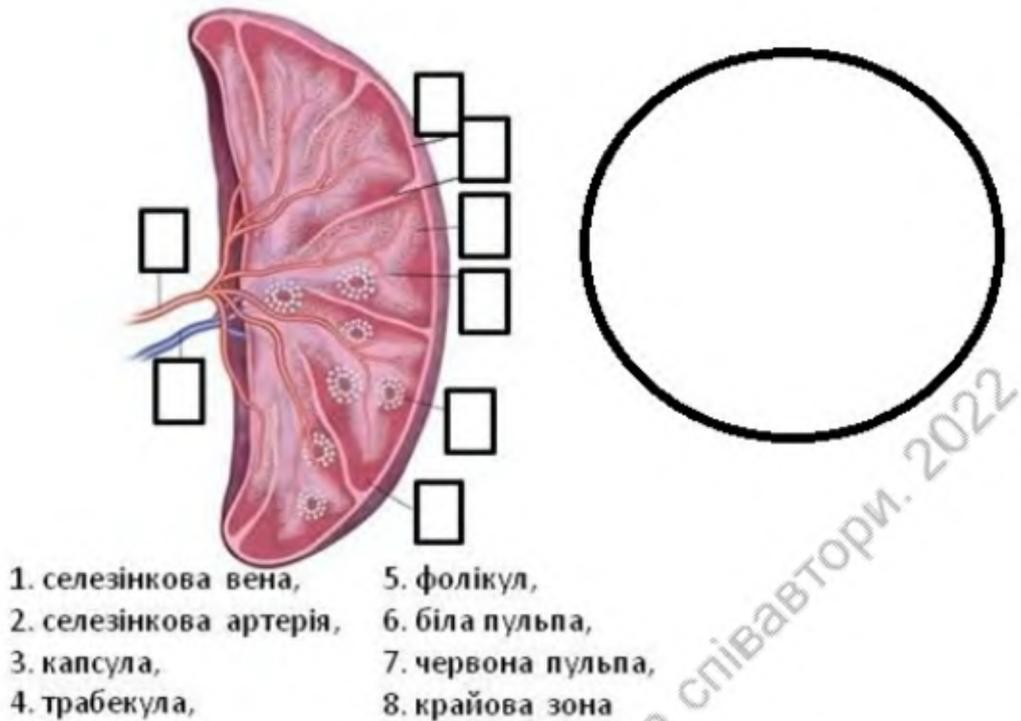


Рис. 4.5. Будова селезінки ссавців (схема) та гістологічний препарат (забарвлення - гематоксилін-еозин, збільшення об'єктиву x40).



Рис. 4.6. Будова лімфатичного вузла ссавців (схема) та гістологічний препарат (забарвлення - гематоксилін-еозин, збільшення об'єктиву x40).

**Матеріали і обладнання:** анатомічні атласи та схеми, постійні препарати органів лімфоїдної системи гризунів, світловий мікроскоп.

**Висновок:**

---

---

**Запитання для самоконтролю:**

1. Як відбувається утворення лімфи та який її склад?
2. Назвіть основні стовбури та протоки лімфатичної системи.
3. Опишіть структуру первинних органів імунної системи?
4. Назвіть місця локалізації найбільших агрегатів лімфовузлів у організми, як це пов'язано з їх функціями.
5. Назвіть Т- та В-залежні зони паренхіми лімфовузла та селезінки.

**Лабораторна робота № 5-6.**

**Вивчення клітин імунної системи: лейкоцитарна формули крові людини.**

Для дослідження клітин імунної системи найчастіше використовують зразки периферичної крові. Це достатньо доступний і простий спосіб визначити клітинний склад крові для моніторингу імунних процесів, що відбуваються в організмі. У здорової людини формені елементи крові знаходяться у певному кількісному співвідношенні, яке прийнято називати гемограмою, чи формулою крові.

Лейкоцитарна формула крові є важливою складовою гемограми людини і відображає вміст основних популяцій лейкоцитів людини. Дослідження лейкоцитарної формули має велике значення для діагностики гематологічних, інфекційних, онкологічних захворювань, а також для оцінки важкості стану і ефективності терапії, що проводиться. В той же час, зміни лейкоцитарної формули не є специфічними. Вони можуть мати подібний характер при різних захворюваннях, чи навпаки, - можуть зустрічатися неподібні зміни при одній і тій самій патології у різних хворих. Взагалі, зміни лейкоцитарної формули можуть свідчити про реактивність імунної системи в межах того чи іншого фізіологічного або патологічного стану у певного індивіда.

Відомо, що в крові людини загальна кількість лейкоцитів приблизно в 760 разів менше кількості еритроцитів. В нормі в 1 мкл крові дорослої людини

міститься від 4 000 до 9 000 лейкоцитів. У новонародженого кількість лейкоцитів дорівнює 12 000-15 000 клітин в 1 мкл, до 5 років вона знижується до 10000, а з 10 років встановлюється на тому ж рівні, що й у дорослих.

Кількість лейкоцитів в крові людини коливається впродовж доби, сягаючи максимуму в вечірні години. Збільшення кількості лейкоцитів в крові називається **лейкоцитозом**, зменшення – **лейкопенією**. Зміни кількості лейкоцитів мають значення лише тоді, коли вони значні і реєструються повторно.

Лейкоцитоз може спостерігатися у здорових людей в залежності від певних фізіологічних чинників, наприклад, прийому їжі, особливо багатой на білок (при „травному” лейкоцитозі кількість лейкоцитів не перевищує 10000 – 12000 клітин в 1 мкл крові і через 3-4 години повертається до норми), м'язової роботи („міогенний” лейкоцитоз може іноді сягати 20000), прийому гарячих і холодних ванн, вагітності, сильних емоцій (симпатико-вегетативні впливи) тощо. В усіх цих випадках лейкоцитоз є перерозподільним, тобто виникає внаслідок судинних реакцій з перенесенням лейкоцитів з кров'яних депо. Лейкоцитоз може виникати при введенні деяких фармакологічних препаратів, наприклад, адреналіну (така реакція носить тимчасовий характер), а також гормонів АКТГ і кортикостероїдів (загальна кількість лейкоцитів підвищується до 15000 – 20000 клітин, що пояснюється мієлотропною дією вказаних гормонів та проявляється у прискореному дозріванні кістково-мозкових клітин і виходом в кров зрілих лейкоцитів).

В основі лейкоцитозу можуть бути різні патофізіологічні механізми, пов'язані з продукцією, дозріванням і виселенням лейкоцитів з кровотворних органів, а також з їх перерозподілом в кров'яному руслі. Усі ці фактори можуть комбінуватися чи виявлятися окремо.

Розрізняють **абсолютний і відносний (перерозподільний) лейкоцитоз**.

**Лейкоцитоз** характерний для таких патологічних станів:

1) **гострих і хронічних лейкозів**, лейкоемічних їх варіантів (число лейкоцитів в 1 мкл крові може підвищуватися до 500000 – 600000 клітин і більше за рахунок вивільнення з органів кровотворення патологічно незрілих клітин);

2) **гострих інфекційних** (за виключенням черевного тифу, бруцельозу, більшості вірусних інфекцій) і **запальних захворюваннях** (кількість лейкоцитів може сягати 20000 – 30000 клітин, іноді вище, наприклад при крупозній пневмонії, ексудативному плевриті, перикардиті), **різних гнійних процесах** – сепсисі, бешисі, менінгіті, перитоніті. Причиною лейкоцитозу є стимуляція лейкопоетичної функції кровотворних органів в результаті дії специфічних збудників і факторів запалення. Подібна реакція носить тимчасовий

функціональний характер і зникає разом з ліквідацією інфекційного агента і вогнища запалення.

3) **інфаркт міокарду** (кількість лейкоцитів не більше 20000 клітин), **поширені опіки, злоякісні пухлини**, особливо в стадії розпаду, уремії (кількість лейкоцитів може збільшуватись до 30000 клітин в 1 мкл крові). В таких випадках лейкоцитоз є наслідком реактивного збудження лейкопоезу у відповідь на розпад тканин і ендогенну інтоксикацію;

4) **дія екзогенних токсичних речовин** – миш'яковистого водню, нітробензолу, чадного газу, а також **дія іонізуючої радіації** в першій її стадії (лейкоцитоз може бути різного ступеня вираженості, але не більше 20000 клітин);

5) **значних крововтрат** – поранень, внутрішніх кровотеч (кількість лейкоцитів не перевищує 12000 – 15000 клітин. В патогенезі „постгеморагічного” лейкоцитозу має значення мобілізуючий вплив на кістковий мозок гіпоксемії).

6) **шокових, післяопераційних станів, за епілепсії** (подібні лейкоцитози відносяться до кроворозподільних, нейро-гуморальних).

Виникнення лейкопеній, як і лейкоцитозів, може бути пов'язане з порушенням (гальмуванням, пригніченням) утворення, дозрівання і виселення лейкоцитів з органів кровотворення, а також з їх перерозподілом в кров'яному руслі.

Схильність до лейкопенії (постійної чи циклічної) відмічається у деяких здорових людей і носить нерідко спадково-родинний характер, але може залежати від нейро-вегетативних (парасимпатичних) впливів і впливів зовнішнього середовища (наприклад, сонячного опромінення). Зниження кількості лейкоцитів відмічається також при голодуванні, зниженні загального тону, під час глибокого сну тощо.

**Лейкопенія** характерна для таких станів:

1) **бактеріальних інфекцій** – черевного тифу, бруцельозу, тривалого септичного ендокардиту, вірусних захворювань (грип, кір, краснуха, хвороба Боткіна). Кількість лейкоцитів може знижуватись до 3000 клітин в 1 мкл крові, іноді нижче і залежить від пригнічуючого впливу на лейкопоез деяких токсинів.

2) **спленомегалій** з картиною гіперспленізму („гіперспленізм” – функціональне поняття, яке відображає гальмівний вплив збільшеної і надмірно функціонуючої селезінки на кістково-мозкове кровотворення).

3) **системного червоного вовчака** (кількість лейкоцитів в активну фазу хвороби коливається від 4000 до 2000 клітин в 1 мкл крові) і деяких інших аутоімунних станів (лейкопенія, пов'язана з утворенням антитіл до власних лейкоцитів).

4) **різних типів агранулоцитозу** (клініко-гематологічний синдром, який характеризується зникненням нейтрофільних гранулоцитів з крові): медикаментозних, які можуть виникати у зв'язку із застосуванням (тривалим, а іноді тимчасовим і у невеликих дозах) пірамідону, новарсенолу, сульфаніламідів, синтоміцину і інших хіміопрепаратів, а також за використання цитостатичних засобів – ембіхіну, допану, колхіцину, 6-меркаптопурину, міелосана і інших, токсичних (при дії бензолу, іонізуючої радіації) і аліментано-токсичних, пов'язаних з вживанням в їжу зіпсованих пліснявими грибами злаків.

5) **гіпопластичних і апластичних станів системи кровотворення** – вроджених і набутих (променева хвороба, бензолна інтоксикація, ускладнення цитостатичної терапії) форм, що характеризуються жировим переродженням кісткового мозку з частковою (гіпоплазією) чи тотальною (аплазією) зменшенням кровотворення, відображенням чого є панцитопенія в периферичній крові;

6) **деяких гемобластозів** – алейкемічних варіантів гострого лейкозу тощо. (зменшення продукції клітин крові при них пов'язане з пригніченням нормальних пагонів кровотворення пухлинно-проліферативним процесом).

Останні три групи лейкопеній бувають найбільш вираженими, число лейкоцитів знижується до 1000 – 800 клітин в 1 мкл крові і нижче. За виключенням лікарських (алергічних), подібні лейкопенії відносяться до органічних (на відміну від функціональних – інфекційних і спленогенних, за яких кістковий мозок за своїм клітинним складом повноцінний, але функціонально пригнічений).

За розвитку різних патологічних станів зазвичай виявляється збільшення (нейтрофіліоз (нейтрофілія), лімфоцитоз, еозинофілія, базофілія, моноцитоз,) чи зменшення (нейтропенія, еозинопенія, лімфопенія, моноцитопенія) вмісту лейкоцитів певного типу.

Збільшення чи зменшення кількості окремих видів лейкоцитів може бути відносним чи абсолютним. Не завжди збільшення відсоткового вмісту відповідає істинному збільшенню кількості цих лейкоцитів. Наприклад, відсотковий вміст лімфоцитів підвищено до 50%, а загальна кількість лейкоцитів в 1 мкл крові 3000 клітин, тобто абсолютна кількість лімфоцитів в 1 мкл крові буде 1500 (що є нормою). В даному випадку можна говорити тільки про відносний лімфоцитоз. Разом з тим зменшення відносних показників деяких типів клітин при підвищеній кількості лейкоцитів в 1 мкл крові ще не означає істинного зменшення їх кількості, оскільки абсолютна кількість цих клітин може бути нормальною або, навіть, підвищеною.

Таблиця 5.1

**Нормальна лейкоцитарна формула периферичної крові людини  
Відносний вміст лейкоцитів.**

Лейкоцити, x10 <sup>3</sup> /мкл	Міело- цити	Мета- міело- цити	Паличко- ядерні	Сегменто- ядерні	Еозино- філи	Базо- філи	Лімфо- цити	Моно- цити
			нейтрофіли					
4-9			1-6%	45-70%	0-5%	0-1%	18- 40%	2-9%

В тому випадку, коли поруч з відсотковим збільшенням (зменшенням) окремих популяцій лейкоцитів відмічається і абсолютне їх збільшення (зменшення), говорять про абсолютний лімфоцитоз (лімфопенію), нейтрофіліоз (нейтропенію) тощо.

За низки патологічних станів відмічається ядерний «зсув нейтрофілів вліво», тобто підвищення відсотка незрілих нейтрофілів в периферичній крові (незрілі нейтрофіли прийнято ставити в стандартну лейкоцитарну формулу зліва), чи навпаки – зсув вправо, тобто зменшення нормальної кількості паличкоядерних нейтрофілів і підвищення вмісту клітин з гіперсегментованими ядрами.

Більш точно визначення лейкоцитарної формули потребує визначення і абсолютних показників вмісту клітин.

Таблиця 5.2.

**Абсолютні показники кількості лейкоцитів периферичної крові  
людини.**

Клітини	Середня кількість клітин в 1 мкл	Референтні межі кількості клітин в 1 мкл
Лейкоцити	7400	4500-11000
Нейтрофіли	4400	1800-7700
Еозинофіли	200	0-450
Базофіли	40	0-200
Лімфоцити	2500	1000-4800
Моноцити	300	200-800

Аналіз лейкограми є цінним додатковим методом клінічного дослідження. Для правильного читання лейкограми необхідно брати до уваги усі її компоненти і розглядати їх в динаміці. Показники крові і лейкоцитарна формула не є сталими у певного індивіда – вони змінюються в процесі розвитку захворювання в залежності від змін імунобіологічних реакцій організму, тому трактувати зміни крові необхідно в тісному зв'язку з клінічною картиною при урахуванні усіх її особливостей (наприклад, ускладнень).

Збільшення кількості нейтрофілів (**нейтрофільоз**) найбільш характерне для інфекційних і гнійно-запальних процесів, причому вираженість нейтрофільозу і характер ядерного зсуву нерідко вказують на стадію і важкість процесу. Незначний нейтрофільоз з невеликим ядерним зсувом вліво відмічається звичайно при легкій формі захворювання, а значний нейтрофільоз при різкому ядерному зсуві вліво при важкій формі. Виражений нейтрофільоз з гіперлейкоцитозом нерідко супроводжує важку септичну інфекцію чи гнійно-запальний процес за умов ефективної опірності організму. Різкий нейтрофільоз з невеликим лейкоцитозом свідчить про важку септичну інфекцію при зменшеній опірності організму. Високий нейтрофільоз при лейкопенії – показник важкої інфекції і поганої імунної опірності організму.

**Нейтропенія** є ознакою функціонального чи органічного пригнічення гранулоцитопоезу. Функціональне пригнічення нерідко спостерігається при інфекційних захворюваннях, наприклад, за черевного тифу внаслідок дії тифозного токсину на кістковий мозок чи за лейшманіозу, коли проявляються ознаки гіперспленізму. Появу на 2-3-ому тижні розвитку черевного тифу нейтрофільозу (після нейтропенії), а замість лейкопенії – помірного лейкоцитозу свідчить про виникнення ускладнення (пневмонії, перитоніту). Тимчасова функціональна нейтропенія може спостерігатися і за умови застосування деяких лікарських засобів (наприклад, антибіотиків, цитостатиків і т.д.). Стійка нейтропенія зазвичай вказує на органічне ураження гранулоцитарного пагону кровотворення у кістковому мозку (наприклад, за гіпопластичних станів кісткового мозку).

**Еозинофілія** – підвищення вмісту еозинофілів в крові більше 5-6 %. Гіпереозинофілія характеризується значеннями відносного вмісту еозинофілів від 20-30% і, навіть, вище. Зазвичай, еозинофілія зустрічається за різних алергічних захворювань і синдромів: бронхіальної астми, набряку Квінке, крапивниці, сироваткової хвороби, сінної лихоманки. З вираженою еозинофілією часто протікають глисні інвазії (опісторхоз, анкилостомидоз, ехінококоз), деякі колагенози (вузликівий периартерит, склеродермія) та неспецифічний виразковий коліт. Незначна еозинофілія може відмічатися в період одужання при інфекційних і запальних захворюваннях (на фоні зменшення нейтрофільозу). За деяких захворювань органів кровотворення розвивається значна еозинофілія (нерідко хронічний мієлолейкоз). Треба пам'ятати, що вираженість еозинофілії у різних осіб при одній і тій самій формі захворювання може бути різною і залежати від індивідуальних особливостей організму.

**Лімфоцитоз** частіше буває відносним, а не абсолютним, особливо за інфекцій, які мають перебіг з нейтропенією (черевний тиф, лейшманіоз, бруцельоз, грип). Абсолютний лімфоцитоз виявляють за інфекційного мононуклеозу, хронічного лімфолейкозу, деяких інфекційних і запальних захворювань у дітей (інфекційного лімфоцитозу, кору, краснухи, кашлюка). Необхідно мати на увазі, що у дітей в ранньому дитинстві відмічається фізіологічний лімфоцитоз.

**Лімфопенія** також нерідко буває відносною, часто внаслідок наявного нейтрофілозу. Абсолютна лімфопенія розвивається, наприклад, за променевої хвороби (в асоціації з абсолютною нейтропенією), лімфогранульоматозу та поширеного туберкульозу лімфатичних вузлів внаслідок заміщення лімфоїдної тканини.

**Моноцитоз** в більшості випадків свідчить про розвиток імунних процесів в організмі. Проте, оцінювати його необхідно у зв'язку з усіма компонентами гемограми. Так, за інфекціях, які мають перебіг, асоційований з нейтро- і еозинопенією, моноцитоз є лише відносним. В той же час за низки хронічних інфекцій (хронічний сепсис, тривалий септичний ендокардит, туберкульоз, малярія тощо) може відмічатися тривалий абсолютний моноцитоз. Абсолютний моноцитоз за інфекційного мононуклеозу – це специфічна реакція на вірус.

**Моноцитопенія** спостерігається за важких септичних захворювань, гіпертоксичних форм інфекційних процесів.

Найбільш виражені зміни в лейкоцитарній формулі бувають за ураження органів кровотворення.

### **Практичне завдання:**

1. Виготовити мазок периферичної крові людини та зафарбувати його за Паппенгеймом-Крюковим, визначити лейкоцитарну формулу.
2. Розглянути сталі препарати мазків крові, визначити лейкоцитарну формулу, встановити показники норми та відхилення від норми.

### **Хід роботи**

1. Нанести на предметне скло краплину капілярної крові людини. За допомогою додаткового предметного скла з шліфованим краєм виготовити мазок. Підсушити на повітрі. Зафарбувати мазок за методом Паппенгейма-Крюкова з використанням комбінованого фарбування фіксатором-фарбою Мая-Грюнвальда та фарбою Романовського, що дає можливість добре диференціювати вміст клітин.

### **Фарбування за Паппенгеймом.**

Мазки сушать на повітрі і наносять на них розчин Май-Грюнвальда з метанолом. Мазки залишають на 5 хв.

Для виготовлення свіжої фарби Мая-Грюнвальда 0,25-0,50 г сухої фарби (еозин метиленовий синій) розчиняють в 100 мл метилового спирту з додаванням (чи без нього) 50 мл чистого гліцерину. Фарба дозріває 4 доби за кімнатної температури.

Далі мазки змивають дистильованою водою. Потім 20 хв дофарбовують розчином Романовського-Гімзе (перед використанням фарбу розводять у співвідношенні 1:10 дистильованою водою), ставляють препарати під кутом у штатив, підсушують на повітрі.

Мікроскопують з імерсією, у полі зору підраховують 200-300 клітин.

2. Розглянути власноруч зроблені і сталі препарати мазків крові людини. Підрахувати лейкоцити різних типів. З урахуванням вищенаведеного теоретичного матеріалу встановити і обґрунтувати заключення. Отримані результати занести у таблицю, зробити висновки.

#### Лейкоцитарна формула периферичної крові людини

Лейкоцити, тисячі в 1 мкл	Міелоцити	Мета-міелоцити	Паличко-ядерні	Сегментоядерні	Еозинофіли	Базофіли	Лімфоцити	Моноцити
			нейтрофіли					

**Матеріали і обладнання:** предметні скельця, скельця зі шліфованим краєм, ексикатори з містками, фарби за Май-Грюнвальд та за Романовським-Гімзе, дистильована вода, водопровідна вода для промивання препаратів. Світлові мікроскопи, засіб для підрахунку клітин.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

#### Запитання для самоконтролю:

1. Чому, на вашу думку, серед лейкоцитів крові найбільше всього нейтрофілів?
2. Що таке лейкоцитоз і лейкопенія?
3. Яким патологічним станам організму властива еозинофілія?
4. Які захворювання називають гемобластозами?

5. Які зміни лейкоцитарної формули крові свідчать про розвиток в організмі інфекційного захворювання бактеріальної етіології?

### **Лабораторна робота № 7.**

#### **Виділення лейкоцитів периферичної крові методом осмотичного лізису еритроцитів.**

Периферична кров є найбільш доступним джерелом лейкоцитів. Один мл крові людини містить  $5-10 \times 10^6$  лейкоцитів і в 1000 разів більше еритроцитів. Приблизно 18-37% лейкоцитів – це лімфоцити, а 2-9% лейкоцитів - моноцити. Лімфоцити і моноцити мають загальну назву - мононуклеари периферичної крові (МПК). 70% МПК припадає на Т-лімфоцити. Решта лейкоцитів (нейтрофіли, еозинофіли та базофіли) – це гранулоцити з сегментованим ядром. Тромбоцити, що містяться в крові, видаляються при її дефібринуванні. Дефібринуванням є процес видалення з крові білка фібрину, що утворився внаслідок згортання крові. Дефібринована кров не згортається, а еритроцити залишаються у ній інтактними. Дефібриновану кров отримують за допомогою використання дефібринатора (колби зі скляними кульками). Кров наливають у дефібринатор і струшують впродовж 10-15 хв. Фібрин осідає на скляних кульках, а отриману дефібриновану кров фільтрують крізь стерильну марлю, яка складена у 3-4 шари. Далі дефібриновану кров використовують для постановки різних реакцій, наприклад, реакції зв'язування комплементу (РЗК), отримання лікувальних сироваток тощо.

Для визначення стану імунної системи певного індивіда вивчають кількість, фенотипові та функціональні особливості різних популяцій лейкоцитів периферичної крові. Для цього набирають 2-3 мл периферичної крові у пробірки з антикоагулянтами: цитратом натрію, ЕДТА чи гепарином, в залежності від задач дослідження. Для отримання лейкоцитів периферичної крові використовують буфери, які лізують еритроцити. Такі буфери мають різний хімічний склад. Найчастіше застосовують буфери на основі  $\text{NH}_4\text{Cl}$  чи сапоніну. Невелику кількість крові з антикоагулянтом (20-100 мкл) інкубують у певному об'ємі буферу впродовж приблизно 3-5 хв. За цей час відбувається лізис еритроцитів. Далі лейкоцити, що залишилися, відмивають від залишків лізованих еритроцитів забуференим фізіологічним розчином (ЗФР).

Процес відмивання клітин полягає у їх центрифугуванні з додаванням середовища культивування або фізіологічного розчину. Режим центрифугування для клітин крові з метою їх осадження становить 1500 об/хв впродовж 5 хв.

Для виділення МПК периферичної крові використовують метод центрифугування в граді щільності фікол-верографіну. Для цього спочатку готують градієнт щільності, який має щільність 1,077. Градієнт розносять у центрифужні пробірки у об'ємі 1,5-2 мл. На градієнт обережно пастерівською піпеткою нашаровують зразки розведеної ЗФР (1:2 чи 1:3) крові. Співвідношення об'ємів градієнт/розведена кров має бути у межах 1:4 – 1:9 (Рис. 7.1, А). Центрифугують пробірки за умов 1500 об/хв впродовж 40-45 хв. Після центрифугуванні пастерівською піпеткою відбирають «кільце» МПК з інтерфази між плазмою і градієнтом (рис. 7.1, Б). Далі МПК відмивають від градієнту шляхом 2-х разового ресуспендування у ЗФР з наступним центрифугуванням в режимі за 1500 об/хв впродовж 5-7 хв.

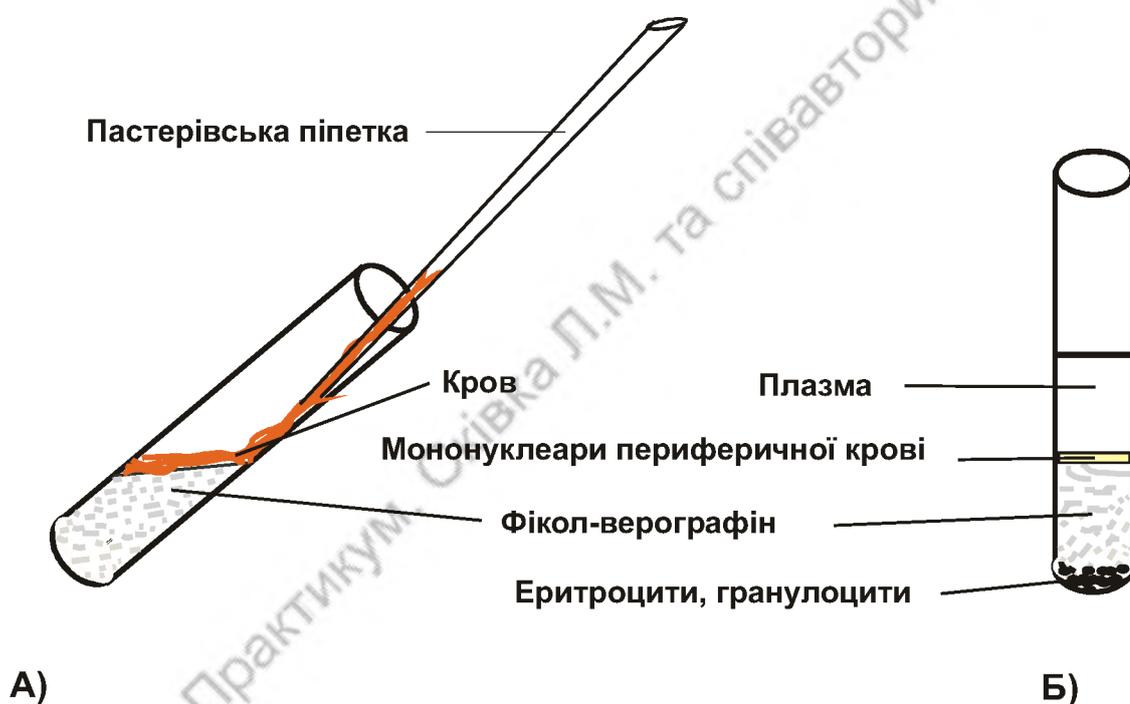


Рис 7.1. Етапи виділення мононуклеарів з використанням градієнту фікол-верографіну. А) Нашарування розведеної крові на градієнт фікол-верографіну зі щільністю 1,077 з використанням пастерівської піпетки; Б) Розшарування крові після 45 хв центрифугування з використанням градієнту щільності.

Моноцити мають виражену здатність до адгезії до поверхні скла чи пластику і саме за цією властивістю можна виділити ці клітини з пулу МПК. Для цього МПК культивують у чашках Петрі, з середовищем культивування RPMI 1640 з додаванням 1% аутологічної сироватки або 10% ембріональної сироватки телят. Суспензію клітин інкубують у зволоженій атмосфері з додаванням 5% CO<sub>2</sub> за 37°C впродовж 2 годин. Після інкубації видаляють надосад, що містить неадгезовані клітини (лімфоцити). Значна більшість клітин, що адгезували до скла чи пластику є моноцитами та дендритними клітинами периферичної крові.

Чистоту виділених клітин перевіряють за допомогою методу проточної цитометрії і специфічних антитіл

### **Практичне завдання:**

1. Виділити лейкоцити крові шляхом лізису еритроцитів в лізуючому буфері з  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .
2. Зробити препаративні мазки виділених клітин, розглянути мазки з використанням світлового мікроскопа.

### **Хід роботи**

1. Отримання лейкоцитів периферичної крові шляхом лізису еритроцитів в буфері на основі хлориду амонію.

Приготувати у 10 разів концентрований буфер для лізування еритроцитів, який містить на 1 л дистильованої води: 89,9 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10,0 г  $\text{KHCO}_3$  та 370,0 мг EDTA. Необхідно довести рН буфера до  $\sim 7,3$  (за допомогою 0,1 Н розчинів КОН чи HCl). До зразка крові об'ємом 100 мкл додати 1,4 мл розведеного буфера для лізису еритроцитів. Витримати клітини у буфері впродовж 3-5 хв. Додати фізіологічний розчин у об'ємі 3-5 мл. Осадити клітини центрифугуванням за умов 1500 об/хв впродовж 5 хв. Додати до осаду клітин фізіологічний розчин у об'ємі  $\sim 3-5$  мл. Ще раз центрифугувати клітини за умов 1500 об/хв впродовж 5 хв. Злити надосад. З отриманого осаду зробити цитопрепарати.

2. Приготування препаративного мазка лейкоконцентрату.

З осаду отриманих лейкоцитів на предметному скельці зробити мазок. Для цього краплину суспензії клітин розподілити по поверхні скла наконечником піпетки. Дати підсохнути мазку на повітрі. Зафарбувати мазок за Май-Грюнвальдом. За цим методом фарбування краще візуалізувати гранулоцити. Для фарбування на мазок наносять барвник – розчин еозин метиленового синього за Май-Грюнвальдом на 5 хв. Далі промивають і висушують.

У полі зору: лімфоцити мають синьо-фіолетові ядра і блакитну цитоплазму; моноцити мають синьо-фіолетові ядра і сіро-блакитну цитоплазму; гранулоцити мають синьо-фіолетові ядра і гранули в залежності від типу – червоні, фіолетові або темно-сині; тромбоцити мають з зовнішню частину блакитну, внутрішню – фіолетову; еритроцити – рожеві.

## Висновок:

---

### Запитання для самоконтролю:

1. Що таке дефібринована кров?
2. З якою метою при виділенні лейкоцитів крові використовують лізуючий буфер?
3. Які барвники та режими фарбування використовують для фарбування препаративного мазка лейкоконцентрату.
4. Який режим центрифугування потрібно використовувати для відмивання суспензії лейкоцитів.
5. Визначте етапи виготовлення мазка лейкоконцентрату.

### Лабораторна робота № 8.

#### Виготовлення корпускулярних антигенів для імунізації тварин.

**Антигени** (від гр. *anti*- проти, *genos* - створювати) - це природні біополімери та їхні синтетичні аналоги, що взаємодіють з антитілами та специфічними рецепторами для розпізнавання антигену В-клітин. Молекулярні структури антигену, що безпосередньо взаємодіють із антитілами, називають антигенними детермінантами або епітопами. Антигенні детермінанти за будовою можуть бути конформаційними чи лінійними. Окремо існує поняття антигенного пептиду. Антигенним пептидом називають пептид, представлений в комплексі з молекулами МНС І чи ІІ для розпізнавання Т-клітинним рецептором Т-лімфоцитів.

За ступенем імуногенності розрізняють повні (повноцінні) та неповні (неповноцінні, або гаптени) антигени.

До повних антигенів належать органічні речовини (переважно білки) мікробного, рослинного і тваринного походження, як правило, із досить великою молекулярною масою (понад 10 кДа).

Неповні антигени не здатні самостійно викликати імунну відповідь, але набувають цю здатність при з'єднанні зі специфічними речовинами (носіями), наприклад, білками плазми крові. Внаслідок цього виникають речовини із набутою імунологічною специфічністю - **кон'юговані антигени**.

До гаптенів належать речовини з невеликою молекулярною масою (менше 10 кДа): певні бактеріальні полісахариди, ліпіди, пептиди (зокрема, поліпептид туберкульозної палички).

Для збільшення ступеня імуногенності низькомолекулярних антигенів використовують речовини, що сприяють неспецифічній стимуляції імунної системи – так звані ад'юванти. До останніх належать гідроксид та фосфат алюмінію, фосфат кальцію, а також повний ад'ювант Фрейнда, який містить вбиті мікобактерії туберкульозу, мінеральну олію та емульгатор.

До розчинних антигенів належать (чужорідні білки, токсини, продукти деградації вірусів та бактерій) та корпускулярні (бактерії, віруси, еукаріотичні клітини) антигени. Вказані антигени викликають різні форми імунної відповіді, зумовлені характером представлення антигенів клітинам імунної системи. Екзогенні (зовнішні) розчинні антигени потрапляють до організму із довкілля повітряним та аліментарним шляхами, або внаслідок ін'єкції. Результатами їхнього розпізнавання слугують активація В-лімфоцитів та синтез антитіл. Синтез антигенів бактерій та вірусів зазвичай відбувається всередині інфікованих клітин; тому вони сприймаються імунною системою як ендогенні (внутрішнього походження). Внаслідок відбувається активація цитотоксичних Т-лімфоцитів, які знищують інфіковані клітини.

Переважна більшість природних антигенів є *тимусзалежними* (Т-залежні), оскільки в їхньому розпізнаванні беруть участь Т-лімфоцити. Т-залежні антигени як правило мають білкову природу, наприклад, еритроцити барана. *Тимус-незалежні* (Т-незалежні) антигени (переважно полісахариди бактерій) здатні ініціювати імунну відповідь за відсутності Т-клітин.

За ступенем чужорідності (неспорідненості) для організму реципієнта антигени поділяють на *аутоантигени*, *алоантигени* (*ізоантигени*) та *гетероантигени* (*ксеноантигени*). Сила імунної відповіді підвищується від ауто- до ксеноантигенів.

**Аутоантигени** – це структурно незмінені власні антигени. У нормі вони неімуногенні («забар'єрні антигени») внаслідок імунної толерантності (несприйнятливості) або недоступності контактів з факторами імунітету. Імунна реакція розвивається лише внаслідок порушень толерантності або цілісності біологічних бар'єрів (запалення, травма).

**Алоантигени** (ізоантигени аб огрупові антигени) притаманні усім особинам певного виду, тобто видоспецифічні. Наприклад, у людини є антигени груп крові (системи АВ0 та ін.).

**Ксеноантигени** (гетероантигени), або міжвидові антигени, діють при міжвидових зв'язках; наприклад, біомолекули різних тварин при їх введенні людині.

**Антигенність** (антигенна специфічність) - здатність антигену комплементарно зв'язуватися із антиген-специфічними рецепторами Т і В лімфоцитів. Вона притаманна пептидам, амінокислотам, вітамінам, динітрофенолам, іонам металів тощо.

**Імуногенність** - властивість антигена викликати імунну відповідь. Імуногенність залежить від структури антигену (молекулярна маса, просторова форма) та стану імунної системи реципієнта. Не усі антигени є імуногенами, але усі імуногени є антигенами.

В структурі бактеріальної клітини розрізняють джгутикові, соматичні та псульні антигени (рис. 8.1).

**Джгутикові** або Н-антигени (Н-АГ) локалізуються в джгутиках і становлять бою епітопи скоротливого білка флагеліну.

**Соматичні** або О-антигени (О-АГ) пов'язані з клітинною стінкою. Їхню нову складають ліпополісахариди.

**Капсульні** або К-антигени (К-АГ) зустрічаються у бактерій, які утворюють псулу. Як правило, К-антигени складаються з кислих полісахаридів (уронові слоти), хоча у бацили сибірської виразки К-АГ побудований із поліпептидних ланцюгів.



**Рис. 8.1. Основні антигени бактеріальної клітини**

Для стандартизації корпускулярних бактеріальних антигенів використовують наступні методи визначення концентрації бактеріальних суспензій: підрахунок клітин у лічильних камерах (Тома-Цейса, Бюркера, Горяєва, лічильна камера з сіткою Нейбауєра), турбідиметричні,

нефелометричні та візуальний метод з використанням стандартів каламутності. Каламутність стандарту на 10 одиниць (МО), орієнтовно відповідає наступним концентраціям мікробних клітин в 1 мл:

$0,93 \cdot 10^9$  клітин/мл для бактерій кишкової групи;

$2,2 \cdot 10^9$  клітин/мл для холерного вібріону;

### **Практичні завдання:**

1. Приготувати бактеріальну суспензію клітин *Escherichia coli*.

2. Провести стандартизацію отриманого антигену.

### **Хід роботи**

1. У пробірку з добовою культурою *Escherichia coli* внести 5 мл стерильного розчину хлориду натрію (0,15 моль/л). Змити з поверхні середовища мікробну біомасу обережно обертаючи пробірку між долонями. За допомогою піпетки перенести бактеріальну суспензію в стерильну пробірку та відмити клітини розчином хлориду натрію шляхом центрифугування зі швидкістю 3000 об/хв впродовж 10 хв. Після відмивання клітин, осад ресуспендувати до отримання гомогенної суспензії у фізіологічному розчині.

2. За допомогою стандарту каламутності приготувати з отриманої бактеріальної суспензії стандартизовану суспензію з використанням стандарту каламутності на 10 одиниць. Перед початком вимірювання стандарт необхідно струсити впродовж 10–15 секунд до повного зникнення осаду. Стандартизацію антигену, проводять з використанням стандартних або спеціально підібраних пробірок, які за діаметром, товщиною стінок і кольором скла відповідають пробіркам-еталонам. У стандартну пробірку перенести 1 мл вихідної суспензії бактеріальних клітин і додати порціями 0,9% фізіологічний розчин для отримання досліджуваної суміші, що відповідає стандарту каламутності на 10 одиниць. Об'єм доданого фізіологічного розчину зафіксувати. Порівняти ступінь каламутності в дослідній та еталонній пробірках в променях падаючого світла, розмістивши під пробірки порівняльну таблицю.

Розрахунок загальної кількості (ЗК) мікробних клітин провести за формулою:  $ZK = ((V_0 + V_i) / V_0) \times k$ , де:

$V_0$  – об'єм вихідної суспензії, мл (у даному випадку  $V_0 = 1$  мл);

$V_i$  – об'єм стерильного 0,9 % фізіологічного розчину, використаного для розведення вихідної суміші, мл;

$k$  – коефіцієнт: концентрація досліджуваних мікробних клітин в мл, що відповідає 10 МО, КУО/мл.

Приклад, визначення ЗК клітин *Escherichia coli* у досліджуваній суспензії:

До 0,5 мл ресуспендованої вихідної суспензії ( $V_0 = 0,5$  мл) додати порціями стерильний 0,9% фізіологічний розчин для доведення досліджуваної зависі до каламутності, що відповідає 10 МО. Нехай загальний об'єм доданого фізіологічного розчину дорівнює 1,5 мл ( $V_i = 1,5$  мл). Концентрація бактерій кишкової групи у зависі (коефіцієнт  $k$ ), що відповідає 10 МО, складає  $0,93 \cdot 10^9$  КУО/мл.

$$ZK = ((0,5 + 1,5) / 0,5) \times 0,93 \cdot 10^9 = 3,72 \cdot 10^9 \text{ КУО/мл}$$

*Інактивація антигену.* Стандартизований антиген *Escherichia coli* підігріти на водяній бані за 80°C впродовж 30 хв. Для перевірки стерильності одну-дві краплі інактивованого антигену засіяти в пробірку з МПБ та інкубувати в термостаті при 37°C впродовж 24 год. Відсутність росту культури свідчить про інактивацію антигену. Інактивованій антиген слід розлити в стерильні скляні пробірки з гумовими пробками. На етикетці вказати назву антигену, його концентрацію, дату виготовлення, зберігати в холодильнику за температури +4,0°C. Виготовлені таким чином антигени використовують для імунізації тварин з метою отримання імунних сироваток, а також в якості діагностикумів при титруванні отриманої антисироватки в реакції аглютинації.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

---

### Запитання для самоконтролю

1. Що таке антиген та які основні його характеристики?

2. Як класифікують антигени за ступенем імуногенності?
3. Чим антигенність відрізняється від імуногенності?
4. Наведіть класифікацію антигенів за ступенем чужорідності.
5. З якою метою на практиці використовують мікробні антигени?

## **Лабораторна робота № 9.**

### **Індукція імунної відповіді. Способи введення імуногенів.**

Імунна відповідь – це реакція імунної системи на появу у внутрішньому середовищі організму небезпечної для його гомеостазу ендогенної або екзогенної субстанції. Метою імунної відповіді є елімінація небезпечної субстанції і формування протективного імунітету – здатності організму чинити ефективний опір захворюванню, що викликається цією небезпечною субстанцією. Формування протективного адаптивного (специфічного, набутого) імунітету є основною метою вакцинації (щеплення). Індукція імунної відповіді з метою формування проективного адаптивного імунітету потребує взаємодії між чинниками вродженої та набутої імунної реактивності (*імунна реактивність* – здатність організму відповідати імунною реакцією на подразник). Зокрема, активація наївних антигенспецифічних Т-клітин у вторинних лімфоїдних органах включає розпізнавання і поглинання субстанції професійними антигенпрезентувальними клітинами (дендритними клітинами) – резидентними клітинами-вартівими у тканинах організму, процесинг (ферментативну деградацію білкового антигену до невеликих пептидів) ними поглинутого матеріалу, утворення комплексу антигенного пептиду з молекулами головного комплексу гістосумісності (*Major Histocompatibility Complex, МНС*) і презентацію комплексу МНС:пептид на мембрані для його розпізнавання антигенним рецептором Т-клітин. Як зазначено вище, *імуноген* – це антиген, здатний стимулювати імунну відповідь в організмі реципієнта. Введення імуногенів – імунізація – один з етапів формування проективного адаптивного імунітету, а також отримання імунних сироваток та моноклональних антитіл. Залежно від мети імунізації та властивостей імуногену (розчинний чи корпускулярний) використовують різні способи його введення лабораторним тваринам, у т.ч. мишам: внутрішньовенне (в/в), внутрішньочеревне (в/ч), внутрішньоселезінкове (в/с) або в лімфовузол, внутрішньом'язове (в/м), підшкірне (п/ш), внутрішньошкірне (в/ш), нашкірне (н/ш), пероральне (п/о), муко зальне – нанесення антигену на слизові оболонки, яке включає інтраназальне (і/н),

пероральне, ректальне уведення тощо. Найчастіше застосовують в/в, в/ч та п/ш способи введення.

Внутрішньовенно мишам вводять як розчинні, так і корпускулярні антигени (клітинні зависі, кількість клітин – до 120 млн/тварину) в об'ємі від 0,2 до 1,0 мл. Цей спосіб використовують для того, щоб антиген одразу потрапив у кровотік і транспортувався у селезінку для активації гуморальної імунної відповіді. Після в/в імунізації пік антитілоутворюючих клітин у селезінці мишей спостерігається на четверту добу.

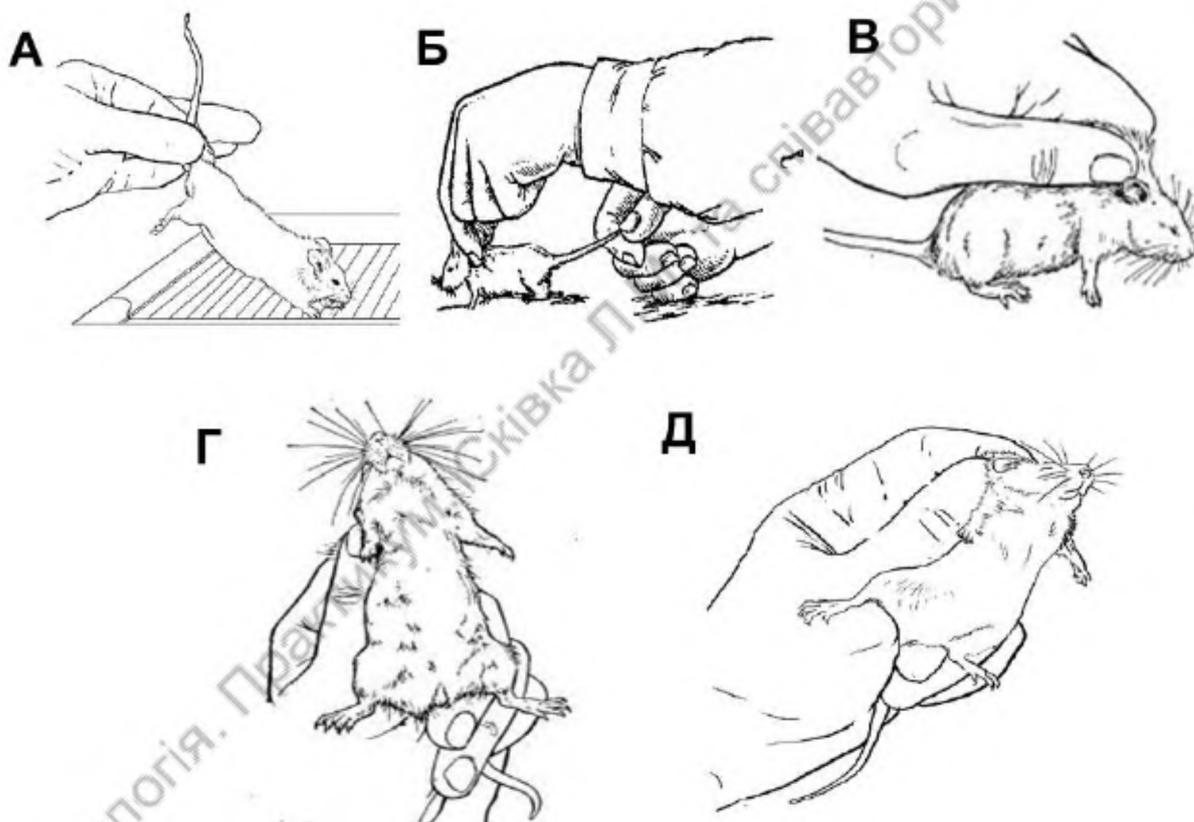
Метод в/ч введення застосовують для ін'єкції антигену або для отримання асцитів (накопичення рідини в черевній порожнині). Мишам внутрішньочеревно можна вводити від 0,2 до 1,0 мл розчину/суспензії антигену. В/ч введення частіше застосовується для корпускулярних антигенів. Після в/ч імунізації антиген так само, як і після в/в введення, потрапляє в кровотік, викликаючи стимуляцію гуморальної імунної відповіді. У цьому випадку пік антитілоутворюючих клітин у селезінці спостерігається на п'яту добу.

Метод в/м введення речовин зазвичай застосовують для лікування мишей антибіотиками і для індукції реакцій клітинного імунітету у сукупності з іншими способами. Для отримання імунних сироваток внутрішньом'язове введення використовується у комплексі з іншими способами. Максимальний об'єм розчину для в/м введення лабораторним гризунам – до 0,5 мл.

За допомогою п/ш введення антигену ефективно досягається активація клітинного імунітету, оскільки у цьому випадку антиген потрапляє в регіонарний (найближчий, дренажний) лімфовузол. Тому першу імунізацію часто проводять саме підшкірно з метою отримання високоспецифічних імунних сироваток. Розчин антигену у такому випадку його введення краще застосовувати разом з повним ад'ювантом (*ад'ювант* – субстанція, яка неспецифічно посилює відповідь імунної системи на антиген) Фрейнда. Розрізняють повний і неповний ад'ювант Фрейнда. Неповний ад'ювант Фрейнда являє собою водно-жирову емульсію, що містить мінеральну олію (наприклад, вазелінову), 0,15 М фосфатний буфер і безводний ланолін у співвідношенні 3: 1: 4. Повний ад'ювант Фрейнда містить, на додачу до водно-жирової емульсії, бактеріальний мураміддипептид. Максимальний об'єм розчину для п/ш введення – до 1,0 мл. Пероральне введення антигену застосовується для стимуляції антитілоутворення у межах імунної системи, асоційованої зі слизовими оболонками. Цей спосіб рідше за інші зазначені використовується для отримання імунних сироваток.

Для введення антигенів будь-яким способом необхідно попередньо зафіксувати лабораторну тварину. Різні способи введення потребують різних

видів фіксації. Для деяких способів фіксації застосовують спеціалізовані пристрої (станки, дошки-фіксатори, ящики, стереотаксичні прилади тощо). Найпростішим способом фіксації лабораторної миші є ручний. Білі лабораторні миші – спокійні миролюбні тварини. Для того, щоб зафіксувати мишу її ловлять за хвіст і пускають по столі або по сітці клітки (рис.9.1А). Коли тварина почне рухатися і натягне хвіст, тулуб притискають двома пальцями (великим і вказівним) вільної руки і плавно рухаючись по спинці у бік голови, захоплюють складку шкіри у ділянці потилиці, ближче до вух так, щоб вона не змогла повертати голову (рис.9.1Б і В). Рештою трьома пальцями, притиснувши їх до зап'ястка, притримують хвіст і ділянку крижу, злегка розтягнувши тварину. Фіксованій тварині надають необхідне для експериментатора положення (рис.9.1Г і Д).

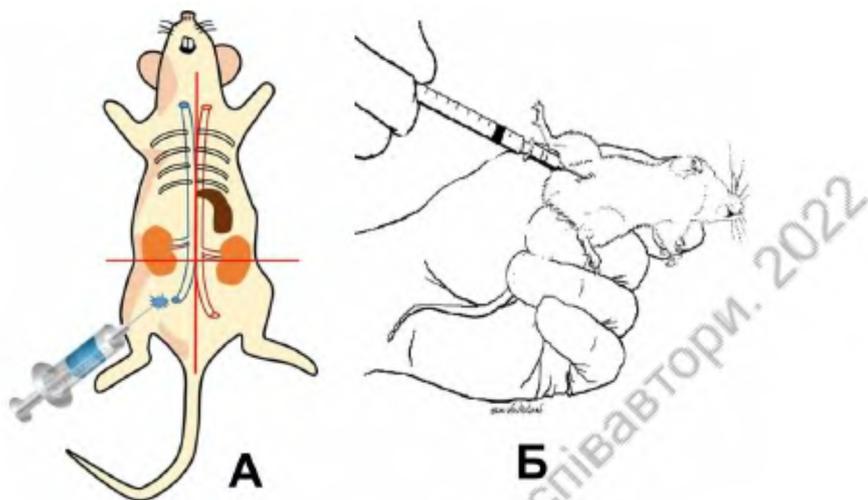


**Рисунок 9.1.** Ручний спосіб фіксації лабораторної миші. А – захват тварини в основі хвоста; Б і В – широкий захват шкіри у ділянці потилиці великим і вказівним пальцями вільної руки; Г і Д – фіксація хвоста після захвату шкіри на потилиці.

### Хід роботи

1. Опрацювати метод в/ч введення імуногену миші. При в/ч введенні асистент (або сам дослідник) здійснюють ручну фіксацію тварини (рис.1), місце уколу дезинфікують спиртом. Для визначення коректної ділянки

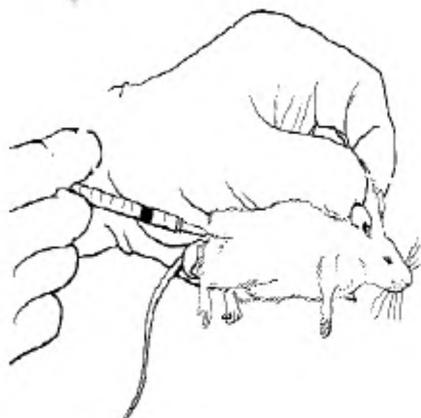
проведення в/ч ін'єкції вентральну (черевну) поверхню тіла тварини умовно слід поділити на чотири частини. Ін'єкцію проводять у ділянці нижнього лівого або правого квадранту (рис.9.2). Місце уколу після проведення ін'єкції обробляють спиртом.



**Рисунок 9.2.** Внутрішньочеревне введення імуногену лабораторній миші. А – місце уколу при проведенні в/ч ін'єкції; Б – фіксація та положення тварини при проведенні в/ч ін'єкції.

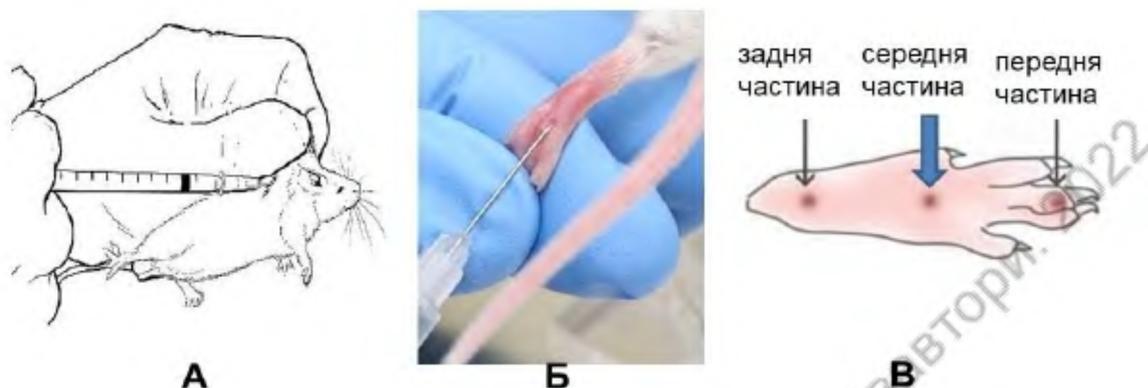
**Увага!** Голкою необхідно проколоти шкіру і черевні м'язи, не зачепивши сечовий міхур, кишечник і кровоносні судини. При правильних діях дослідника у місці уколу не спостерігається здуття шкіри, а у шприці поява крові, жовтуватої або бурого кольору рідини.

2. Опрацювати метод внутрішньом'язового введення імуногену миші (стегновий м'яз). Цей спосіб введення застосовують частіше для лікарських засобів. Для імунізації його використовують у поєднанні з іншими способами. Більш прийнятний для розчинних антигенів. Перед уколом дезинфікують задню лапку спиртом, ін'єкцію проводять у м'яз стегна, після чого місце уколу дезинфікують (рис.9.3).



**Рисунок 9.3.** Введення імуногену у стегновий м'яз лабораторної миші.

3. Опрацювати метод підшкірного введення імуногену миші (вздовж хребта) (рис.9.4). Підшкірне введення частіше застосовується для розчинних антигенів та гаптенів у комплексі з ад'ювантними речовинами. Підшкірне введення здійснюється усім гризунам у ділянку холки та/або смужкою вздовж хребта. У деяких випадках імуноген вводять під шкіру подушечки задньої лапки.



**Рисунок 9.4.** Підшкірне введення імуногену лабораторній миші. А – фіксація та положення тварини при підшкірному введенні у ділянку холки; Б – фіксація тварини та положення голки шприца при підшкірному введенні у подушечку задньої лапки; В – синьою стрілкою позначено найбільш адекватне місце уколу при п/ш введенні у подушечку задньої лапки.

**Увага!** Після введення утворюється пружне здуття (гранульома), котре розсмоктується через добу (у випадку застосування ад'юванту гранульома довго не розсмоктується). Об'єм речовини, що вводиться, може бути до 200 мкл.

4. Опрацювати метод інтраназального введення імуногену миші. Розчин антигену вводять краплями у носову порожнину тварини (рис.9.5).



**Рисунок 9.5.** Інтраназальне введення імуногену лабораторній миші.

**Матеріали і обладнання:** шприці об'ємом 1.0 та 2.0 мл, автоматичні дозатори, стерильні наконечники до автоматичних дозаторів, стерильний фізіологічний розчин, вата, етиловий спирт.

### **Висновок:**

---

---

#### **Запитання для самоконтролю**

1. У якій ділянці черевної стінки проводять внутрішньочеревні ін'єкції лабораторній миші?
2. Які способи введення частіше застосовуються для корпускулярних антигенів?
3. Який спосіб введення антигену використовують для активації антитілоутворення у межах імунної системи, асоційованої зі слизовими оболонками?
4. У чому відмінність антигену та імуногену?
5. Зазначте локалізацію підшкірного введення імуногену лабораторній миші.

#### **Лабораторна робота № 10.**

##### **Отримання імунної сироватки.**

Сироватка крові – це її рідка частина, позбавлена формених елементів і фібрину (рис.10.1). Виділити сироватку із крові можливо шляхом нейтралізації фібриногену іонами кальцію (дефібринування) або внаслідок природного згортання крові.

Імунна сироватка (антисироватка) крові містить антитіла до певного антигену. Антитіла в сироватці з'являються у відповідь на потрапляння до організму антигенів.

Зазвичай в сироватці крові практично здорових людей і тварин містяться в невисоких титрах природні або нормальні антитіла до деяких мікроорганізмів, наприклад, до ентеробактерій і коків, які утворюються внаслідок постійних контактів з цими прокаріотами. Високі титри антитіл до патогенних мікроорганізмів виявляють в сироватках після активної імунізації вакцинними препаратами або перенесеного інфекційного захворювання. Антисироватки до

мікробних антигенів, які використовують в імунологічних дослідженнях, отримують шляхом імунізації тварин.

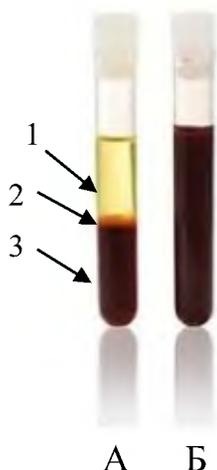


Рис. 10.1. Кров після згортання (А) та цільна (Б).

1. сироватка; 2. тромбоцити і білі клітини крові (лейкоцити); 3 - еритроцити.

Розрізняють імуно-діагностичні та лікувально-профілактичні сироватки.

Імуно-діагностичні сироватки містять антитіла проти одного (моновалентні) або кількох (полівалентні) антигенів. Їх отримують шляхом імунізації тварин (кролів та ін.) повноцінним антигеном. Такі сироватки використовують з метою діагностики захворювань.

Лікувально-профілактичні сироватки містять антитіла проти бактерій (антибактеріальні), вірусів (протівірусні), екзотоксинів (антитоксичні). Їх виготовляють із крові гіперімунізованих тварин (коней тощо), людей, які перенесли інфекційне захворювання (в їхній крові містяться антитіла проти збудника), або штучно імунізованих людей-донорів. Ці сироватки використовують для лікування і попередження інфекційних захворювань (грип, сказ, правець, дифтерія, ботулізм).

#### **Етапи отримання антисироваток.**

Антисироватки отримують у декілька послідовних етапів, а саме: приготування антигену, імунізацію тварин і визначення ступеню специфічності.

Для імунізації використовують корпускулярні та розчинні антигени.

Дози корпускулярних антигенів, які стимулюють синтез високоавідних антитіл, як правило, невеликі і складають для дрібних тварин (мишей та ін.) в середньому від  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^9$  клітин. Загалом антигени високого ступеню очищення застосовують в меншій кількості.

Розроблено кілька способів введення антигену. Високі титри антитіл отримують внаслідок внутрішньовенної імунізації. Підшкірне, внутрішньошкірне та внутрішньом'язове введення сприяють тривалому збереженню антигену в організмі і стимуляції лімфоїдної тканини. Тому при отриманні антисироваток часто комбінують внутрішньовенні і локальні ін'єкції. Для отримання високих титрів антитіл проводять кілька послідовних імунізацій, поєднуючи локальне введення антигену з ад'ювантом та внутрішньовенне без ад'юванта. Різні схеми імунізації передбачають ін'єкції поступово зростаючих доз антигену або повторні цикли імунізації через певні інтервали часу; тривалість останніх залежить від величини попередніх доз.

Високий ступінь специфічності необхідний для антисироваток, призначених для застосування у високочутливих імунохімічних аналізах (імуноферментному, радіоімуному тощо). Для уникнення перехресних реакцій, зумовлених наявністю антитіл іншої специфічності, при використанні серологічних тестів антисироватки вносять у великих розведеннях.

Концентрацію антитіл в антисироватці встановлюють за допомогою титрування у відповідній серологічній реакції з гомологічним антигеном. Титр сироватки – це найбільше її розведення (найнижча концентрація антитіл), при якому серологічна реакція позитивна.

Антисироватки зберігають розфасованими невеликими порціями в рідкому (+4°C), замороженому (-15°C) або ліофілізованому стані, що забезпечує максимальне збереження титрів антитіл. Ліофілізовані препарати найбільш придатні для довготривалого зберігання. Антисироватки після розморожування бажано використати повністю, бо повторне заморожування знижує їхню якість. У рідкій формі препарату титр антитіл швидко знижується, що обмежує строки зберігання. Для запобігання проростання до рідкої форми рекомендують додавати цитостатик (0,1%-ний азид натрію або мертиолат, 0,5%-ний фенол).

### **Практичне завдання:**

Отримати антисироватку імунізованої тварини.

### **Хід роботи**

1. Взяти 5-10 мл крові із вушної вени імунізованих тварин (кролів) через 6-10 діб після закінчення курсу імунізації.
2. Кров перенести в стерильні пробірки без консервантів та антикоагулянтів.
3. Пробірки з кров'ю помістити в термостат при +37°C на 30 хв.

4. Відшарувати пастерівською піпеткою утворений згусток від стінок пробірок і поставити на 30 хв в холодильник за +4°C з метою ретракції згустка.
5. Провести центрифугування впродовж 10-15 хв. при 1000 обертів/хв.
6. Отриману сироватку перенести в пробірки з гумовими пробками або в стерильні скляні ампули.

**Висновок:** \_\_\_\_\_

---

### **Запитання для самоконтролю**

1. Що таке антисироватка?
2. Які основні етапи отримання антисироваток?
3. Як визначають концентрацію антитіл в антисироватках?
4. Що становлять собою лікувально-профілактичні антисироватки?
5. Що таке титр сироватки?

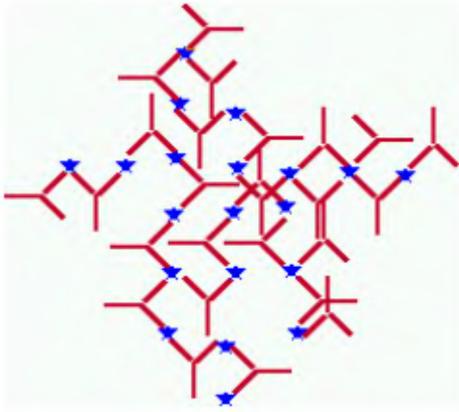
### **Лабораторна робота № 11.**

#### **Серологічні методи. Реакція аглютинації.**

Серологія – це наука про біологічні властивості сироватки крові. Термін «серологія» походить від латинських слів «serum» - сироватка і «logos» - знання, вчення. Серологічні методи – це підгрупа імунологічних методів дослідження. Імунологічні методи дослідження – це високо специфічні біоаналітичні методи для якісного і кількісного визначення широкого спектру розчинних і корпускулярних аналітів (аналіт – компонент зразка біологічного матеріалу, який підлягає аналізу), заснованого на реакції антиген:антитіло. Принцип імунологічних методів дослідження ґрунтується на здатності антитіл специфічно взаємодіяти з антигенами з утворенням імунних комплексів, наявність яких у реакційній суміші (у даному випадку, суміші антигенів з антитілами) засвідчує присутність у ній досліджуваного аналіту (антигенної субстанції або антитіла), а їх кількість пропорційна кількості досліджуваного аналіту. Висока специфічність антитіла надає можливість виявляти з його використанням білковий антиген з понад  $10^8$  подібних молекул. Доприкладу, жодний з хімічних методів дослідження не дозволяє розрізнити у суміші два близькоспоріднених (гомологічних) білки, такі як альбумін людини і тварин. Проведення аналізу з використанням антитіл дозволяє це зробити. Це зумовило широке використання імунологічних методів

дослідження не лише у медицині, біології і ветеринарії, а й у рослинництві, фармацевтичній промисловості, харчовій промисловості, хімічній індустрії тощо. У біології і медицині серологічні реакції використовуються для встановлення етіологічних (*етіологія* – наука про причини та умови виникнення хвороб) чинників первинних інфекцій, особливо після гострої стадії, коли інфекційний вірус або його компоненти більше не можна виявити у пробах біологічного матеріалу. Вони широко використовуються для скринінгу препаратів крові на ризик певних хронічних інфекцій, оцінки імунного статусу та необхідності профілактичного лікування у зв'язку з пересадками деяких органів. Вони також широко використовуються для епідеміологічних (епідеміологія – наука про закономірності виникнення і поширення захворювань) досліджень, оцінки поствакцинального тощо.

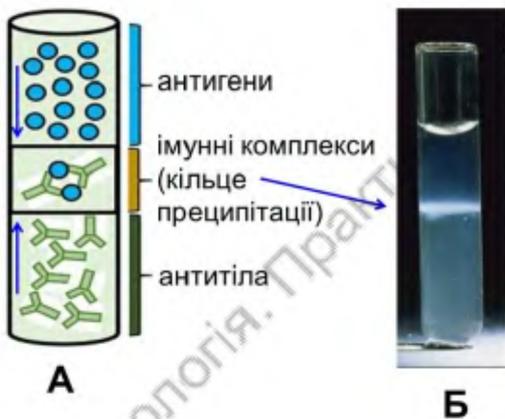
Імунологічні методи дослідження поділяються на дві підгрупи, залежно від способу реєстрації імунних комплексів: методи з прямою реєстрацією імунних комплексів і методи з непрямою реєстрацією імунних комплексів. Пряма реєстрація імунних комплексів передбачає їх візуальне виявлення неозброєним оком. Непряма реєстрація імунних комплексів передбачає застосування мічених реагентів. Якісний і кількісний аналіз імунних комплексів у таких методах проводиться шляхом реєстрації мітки. Прикладом таких методів є імуноферментний аналіз, коли міткою виступає фермент (в аналізі використовуються мічені ферментом антигенні субстанції або антитіла), а реєстрація імунних комплексів проводиться шляхом спектрофотометричної реєстрації продукту ферментативної реакції. Підгрупа методів імунологічних досліджень, заснована на прямій реєстрації імунних комплексів (інша назва прості серологічні методи) ґрунтується на мультивалентній природі антитіл і багатьох природних антигенних субстанцій. Валентність антитіла – це кількість антигензв'язувальних центрів у його складі. Наприклад, мономерна молекула IgG має у своєму складі два антигензв'язувальних центри, локалізовані на Fab-фрагментах. Це означає, що валентність мономерної молекули IgG дорівнює 2. Пентамерна молекула IgM має у своєму складі 10 антигензв'язувальних центрів. Це означає, що валентність пентамерного IgM дорівнює 10. Валентність антигену – це кількість антигенних детермінант (епітопів) у його складі. Здатність антитіл зв'язуватися з більш ніж однією антигенною детермінантою створює умови формування великих нерозчинних імунних комплексів, видимих неозброєним оком (рис.11.1).



**Рисунок 11.1.** Репрезентативна ілюстрація здатності мультивалентних антитіл формувати великі імунні комплекси з полівалентним розчинним антигеном.

Залежно від природи антигену, який використовується в аналізі, прості серологічні методи поділяються на методи, засновані на реакції аглютинації і методи, засновані на реакції преципітації.

Якщо антиген є розчинною молекулою, утворення імунних комплексів реєструється у реакції *преципітації* (осадження). Антитіла, які осаджують розчинний антиген (*преципітиноген*) у присутності електролітів (0.85% NaCl), називаються *преципітинами*. Розрізняють кількісну і якісну реакції преципітації. Реакцію преципітації можна проводити у розчині або в агарозному гелі. Прикладом якісної реакції преципітації у розчині є реакція кільцепреципітації (рис.11.2).

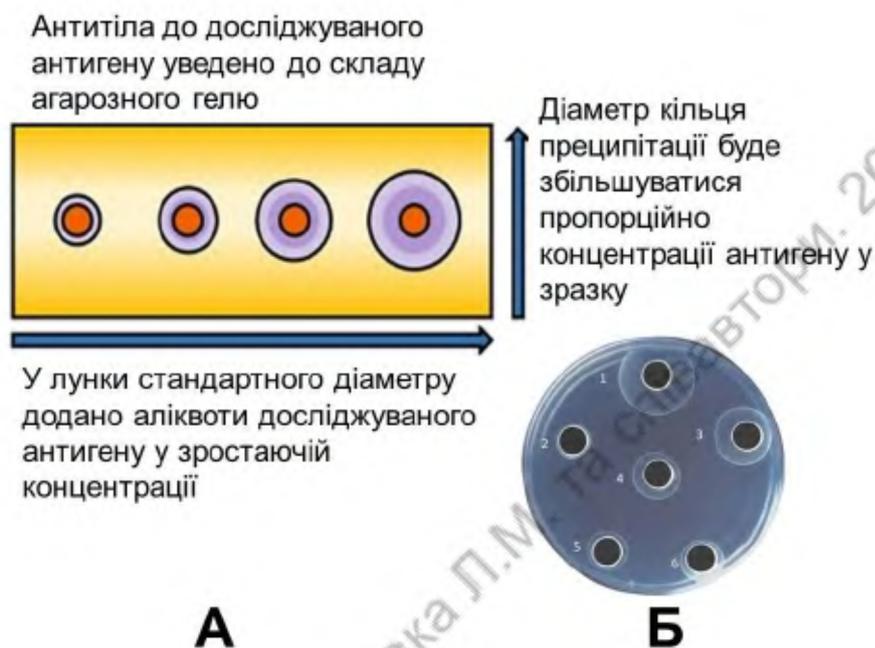


**Рисунок 11.2.** Якісна реакція преципітації у розчині (реакція кільцепреципітації). А – схема реакції; Б – репрезентативне зображення кільця преципітації.

Прикладом кількісної реакції преципітації в агарозному гелі є реакція радіальної імунодифузії за Манчіні (рис. 11.3).

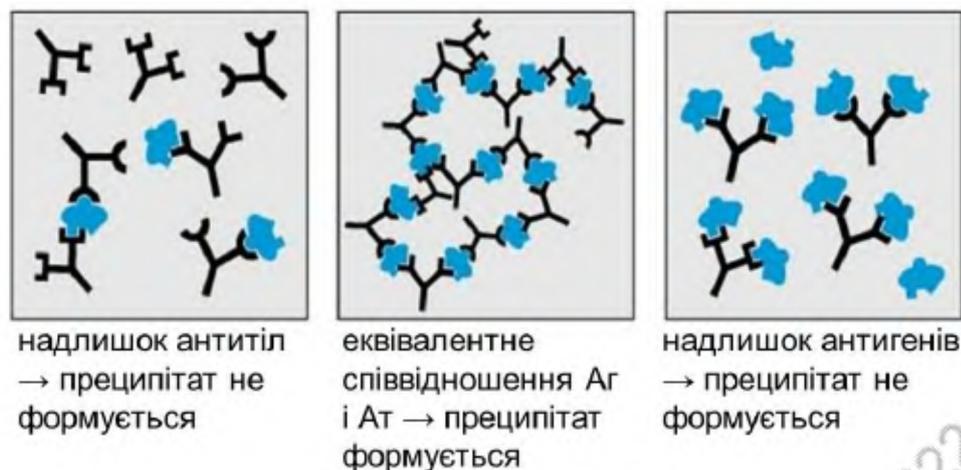
При постановці цієї реакції один з аналітів (наприклад антитіла, специфічні до досліджуваного антигену) вводяться до складу розплавленого агарозного гелю. Після застигання гелю у ньому роблять лунки стандартного діаметру, у які вносять аліквоту (точно виміряну частину зразка, у даному випадку – фіксований об'єм зразка біологічного матеріалу, наприклад, сироватки крові) досліджуваного біологічного матеріалу. Досліджувана антигенна субстанція буде дифундувати у

рідкій фазі агарозного гелю (буфері) і взаємодіяти зі специфічними антитілами у його складі з утворенням імунних комплексів, видимих неозброєним оком у вигляді кільця преципітації. Попередньо побудована (з використанням розчинів антигену з відомою концентрацією) калібрувальна крива залежності діаметру кільця преципітації від концентрації антигену дозволить провести кількісний аналіз досліджуваного антигену у зразку біологічного матеріалу.



**Рисунок 11.3.** Кількісна реакція преципітації в агарозному гелі (реакція радіальної імунодифузії за Манчіні). А – схема реакції; Б – репрезентативне зображення кілець преципітації в агарозному гелі.

Коли антитіла та розчинний антиген змішуються у розчині, дво- або багатовалентна природа імуноглобулінів, як зазначено вище, дозволяє одній молекулі антитіла зв'язуватися з більш ніж одним антигеном. Якщо антиген є полівалентним (має більше одного епітопу у своєму складі), він, у свою чергу, може зв'язувати кілька антитіл. Імунопреципітація відбувається лише тоді, коли концентрації антитіл і антигену по суті еквівалентні (див. центральну панель на рис.11.4). За надлишку антитіл (ліва панель) або антигену (права панель) переважає моновалентне зв'язування, яке не приводить до утворення видимого неозброєним оком преципітату.



**Рисунок 11.4.** Схематична ілюстрація залежності формування преципітату від кількісного співвідношення антигенів і антитіл.

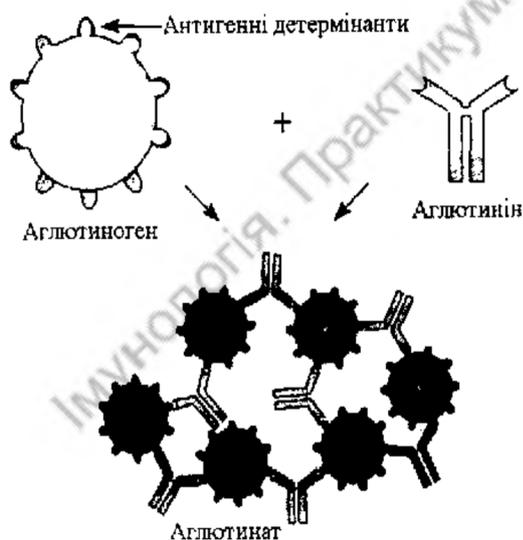
Перехресне зв'язування, яке відбувається між дво- або полівалентними антитілами та полівалентними антигенами на поверхні бактеріальних або інших клітин, може привести до видимого злипання клітин. Ця реакція злипання називається **аглотинацією**. Антитіла, які викликають такі реакції, називаються *аглотинінами*, поверхневі антигени клітин, які взаємодіють з аглотинінами, називаються *аглотиногенами*. Принцип реакції аглотинації ідентичний такому для реакції преципітації. Серологічні реакції, засновані на реакції аглотинації, завжди проводять у рідкій фазі і не використовують агарозний гель. Якщо досліджуваний корпускулярний Ag є еритроцитом, реакція називається *гемаглотинацією*. Розрізняють пряму і непряму реакції аглотинації. *Пряма (активна)* аглотинація – серологічна реакція, у якій специфічні антитіла взаємодіють з власними (природними) антигенними детермінантами досліджуваного антигену. *Непряма (пасивна)* аглотинація - серологічна реакція, у якій специфічні Ат взаємодіють з антигенними детермінантами, штучно кон'югованими на поверхні корпускулярного антигена (носія). У реакції аглотинації можуть брати антитіла всіх ізотипів (класів). Однак, найкращим аглотиніном є IgM завдяки його високій валентності. У простих серологічних методах аналізу антигенних субстанцій (бактеріальних клітин, еритроцитів, розчинних антигенів), заснованих як на реакції преципітації, так і на реакції аглотинації, застосовують *поліклональні антитіла* - гетерогенну суміш антитіл, спрямованих проти різних епітопів одного антигену. Поліклональні антитіла генеруються різними В-клітинними клонами імунізованої тварини і, як наслідок, імунохімічно гетерогенні: мають різну специфічність (специфічні до різних епітопів) та афінність (ступінь спорідненості антигензв'язувального центру

антитіла антигенній детермінанті). У серологічних методах аналізу антитіл об'єктом дослідження також є поліклональні антитіла, оскільки відповідь на переважну більшість антигенів є поліклональною. Аналітичні тести, засновані на реакції аглютинації, так само як і тести, засновані на реакції преципітації, можуть бути якісними або кількісними. Одним з прикладів аналітичних тестів на основі реакції аглютинації є реакція бактеріальної аглютинації – пряма (активна) реакція аглютинації. Завдяки своїй специфічності, простоті постановки і демонстративності, реакція бактеріальної аглютинації *широко застосовується у мікробіологічних та імунологічних дослідженнях з метою:*

- *Серологічної ідентифікації мікроорганізмів - визначення виду і серовару мікроорганізму - з використанням антитіл заданої специфічності (імуної діагностичної сироватки);*
- *Серологічної діагностики – визначення природи (специфічності) антитіл у сироватці крові людини або тварини, хворої на бактеріальні, вірусні, рідше інші інфекційні захворювання з використанням відомого антигену (діагностикуму).*

*Діагностикуми* - препарати, котрі містять відомий антиген у вигляді зависі живих або вбитих бактерій, а також продуктів їх розпаду, токсинів, вірусів тощо.

Бактеріальні клітини з приєднаними до них аглютинінами з'єднуються у великі агрегати, які називаються *аглютинатами* (рис. 11.5).



**Рисунок 11.5.** Схема реакції аглютинації.

Внаслідок цього рівномірна суспензія клітин, спочатку мутна, склеюється в грудки або пластівці, які зависають у прозорій рідині або осідають на дно. В аглютинації беруть участь виключно поверхневі антигени бактерій, які доступні

антитілам. Антигени, розміщені у внутрішніх структурах бактеріальної клітини, не беруть участі в цій реакції через відсутність доступу до них антитіл. Реакції аглютинації, подібно до реакцій преципітації, проводяться у розчині електроліту (наприклад, ізотонічному розчині хлориду натрію). За технологією постановки реакції розрізняють реакцію аглютинації на склі (пластиковій пластині) і у пробірках (лунках планшету). Механізм реакції полягає в тому, що під впливом іонів електроліту зменшується негативний поверхневий заряд бактеріальних клітин і вони можуть зблизитись на таку відстань, при якій між ними виникає аглютинація, зумовлена взаємодією з антитілами.

Як зазначено вище, у структурі бактеріальної клітини розрізняють кілька основних груп поверхневих антигенів, які можуть виступати аглютиногенами в реакції бактеріальної аглютинації: джгутикові (H), соматичні (O), капсульні (K) і деякі інші (див. рис.8.1).

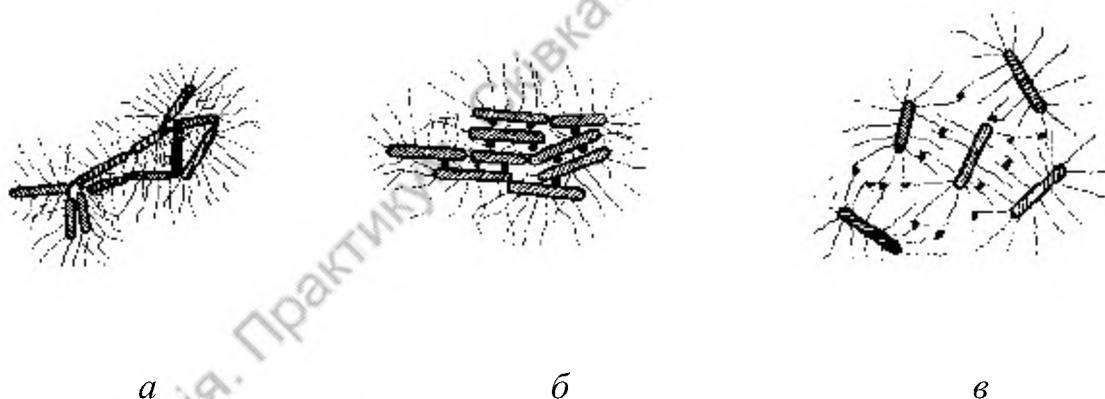
Джгутиковий антиген локалізований у локомоторному апараті бактерій – джгутиках. Він складається з білка флагеліну, котрий є термолабільним (при нагріванні швидко руйнується і втрачає свою специфічність). Соматичний антиген пов'язаний з клітинною стінкою бактерій. Його основу складають ліпополісахариди, що надає йому термостабільності і він не руйнується при кип'ятінні. Втрата специфічності цього антигену відбувається при обробці бактерій формаліном. Капсульні антигени є лише у бактерій, котрі формують цей утвір. Деякі з капсульних антигенів термолабільні, інші – термостабільні. Одним з різновидів капсульного антигену є Vi-антиген. Його можна виявити на поверхні збудника черевного тифу та деяких інших ентеробактерій з високою вірулентністю, в результаті чого він і отримав назву антигену вірулентності. (*Вірулентність – це ступінь здатності даного інфекційного агенту заражати даний організм.*)

За наявності у різних бактерій однакових або подібних групових антигенів вони можуть аглютинуватися однією і тією антисироваткою, що ускладнює їх ідентифікацію. Схематично це можна зобразити так: бактерія А містить аглютиногени a, b, c, бактерія В — b, c, d, бактерія С — c, d, e, а в сироватках крові імунізованих тварин утворюються відповідні їм аглютиніни. У таких випадках застосовують реакцію адсорбції (виснаження) Кастеллані. Дана реакція заснована на здатності споріднених груп бактерій адсорбувати з антисироватки групові антитіла при збереженні у її складі типоспецифічних антитіл. Отримані після такої адсорбції антитіла називаються монорецепторними. Вони дають змогу точніше визначати видову належність низки збудників інфекційних захворювань.

Макроскопічний і мікроскопічний вигляд аглютинації бактерій залежить від виду поверхневого антигену бактеріальної клітини, який бере участь у реакції. Аглютиніни, які реагують з О-соматичним антигеном, дають соматичну аглютинацію, дрібнозернисту. Соматична аглютинація в пробірках завершується через 24 години, при цьому утворюються компактні зерна, грудки, які важко розбити при струшуванні. Мікроскопічно можна помітити, що бактерії склеюються полюсами, утворюючи сітку (рис.11.6а).

В аглютинації з поверхневими Vi-антигенами спостерігається склеювання бактерій між собою всією поверхнею, що дає рівномірний осад. У певній мірі макроскопічно Vi-аглютинація нагадує соматичну (рис.11.6б).

Сироватки, які містять антитіла проти джгутиків бактерій, аглютинують клітини значно швидше. Вже через 30-40 хв окремі конгломерати бактерій у вигляді пластівців вільно осідають на дно пробірки. Анти-Н аглютиніни безпосередньо взаємодіють із джгутиками, знерухомлюючи бактерії. Мікроскопічно можна спостерігати склеювання бактеріальних клітин з допомогою джгутиків. Це джгутикова, або Н-аглютинація, крупнопластівцева (рис.11.6в).



**Рисунок 11.6.** Мікроскопічний вигляд бактеріальної аглютинації за участю різних поверхневих антигенів. *а* – соматична аглютинація; *б* - Vi-аглютинація; *в* – Н-аглютинація.

Якісна реакція аглютинації має назву орієнтовної реакції. Її проводять на предметному склі (або пластиковій пластині), аглютинація корпускулярних антигенів відбувається упродовж кількох хвилин. Застосовується як прискорений метод виявлення антитіл або для ідентифікації мікроорганізмів. Розгорнута реакція аглютинації, облік якої проводять через 2 год інкубації за 37°C, або через 24 год інкубації за кімнатної температури, застосовується з метою ідентифікації

мікроорганізму та виявлення антитіл (включаючи їх титр) у сироватці крові. Титр сироватки – це її максимальне розведення, за якого ще виявляється аглютинація антигену.

Орієнтовну аглютинацію ставлять перед постановкою розгорнутої реакції для того, щоб відібрати бактерії, що аглютинуються (у випадку серологічної ідентифікації) або сироватки, що аглютинують бактерії (у випадку серологічної діагностики або отримання імунних антисироваток) і виключити з подальших досліджень реагенти, що не вступають в реакцію аглютинації.

### **Хід роботи**

1. Отримати сироватку з крові імунізованої тварини, взятої без антикоагулянта (див. протокол лабораторної роботи №8).

*Увага!* Сироватка може зберігатися у стерильних умовах в холодильнику до 1 місяця. Для більш тривалого зберігання її заморожують при температурі від  $-20^{\circ}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ .

2. Нанести на знежирене предметне скло краплю отриманої нерозведеної або розведеної фізіологічним розчином 1:10 (1:20) сироватки (дослід) і, окремо, краплю фізіологічного розчину NaCl (негативний контроль).

3. У кожному з крапель внести петлею добову культуру тестованого мікроорганізму (імуногену) і ретельно розмішати до рівномірного помутніння.

4. Через кілька хвилин провести облік реакції неозброєним оком або із застосування лупи (бінокулярного мікроскопу). При позитивній реакції у краплі сироватки з'являються дрібні або крупні пластівці (зернистість), а при негативній – рідина залишається рівномірно мутною.

**Матеріали і обладнання:** термостат, холодильник, центрифуга, бінокулярний мікроскоп або лупа, предметні скельця, конічні (центрифужні) скляні пробірки, автоматичні дозатори невеликого об'єму, стерильний фізіологічний розчин.

### **Висновок:**

---

---

### **Запитання для самоконтролю**

1. У чому різниця між реакціями преципітації та аглютинації?
2. Чим визначається валентність антитіл?

3. У чому полягає принцип методу серологічної ідентифікації мікроорганізмів?
4. Що собою являє метод серологічної діагностики захворювання?
5. У чому різниця між прямою і непрямую реакцією аглютинації?

### **Лабораторна робота № 12-13. Оцінка стану природної резистентності організму. Визначення фагоцитарної активності клітин імунної системи.**

Природна резистентність є первинним бар'єром захисту організму від надходження інфекційних і неінфекційних агентів. Вроджені механізми природної резистентності виникли на ранніх етапах еволюції і збереглися у хребетних. Реалізація механізмів захисту природної резистентності здійснюється за допомогою цілого ряду механізмів (механічних бар'єрів, фізико-хімічних властивостей середовищ), а також багатьох гуморальних (лізоцим, система білків комплементу, інтерферони, дефензини, лактоферини, білки гострої фази запалення, природні антитіла та інш.) і клітинних (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли, моноцити, макрофаги, мастоцити, природні кілерні клітини, дендритні клітини, клітини нормальної мікрофлори) факторів.

В умовах норми шкірний покрив і слизові оболонки організму ефективно забезпечують захист від проникнення патогенів. Однак в умовах контакту з високо вірулентним інфекційним агентом або при механічних ушкодженнях покривних тканин, патогени проникають в тканини, що швидко мобілізує фактори природної резистентності. В місцях проникнення розвивається реакція гострого запалення. В розвитку запальної реакції важливу роль відіграють клітинні фактори природної резистентності - фагоцитарні клітини, саме вони поглинають, перетравлюють і знищують патогени.

Фагоцитоз – загальнобіологічний процес поглинання та перетравлення клітиною різних субстанцій (мікроорганізмів, вірусів, фрагментів клітин та інш.) і є головним механізмом клітинного імунітету в системі природної резистентності. Фагоцитоз відіграє важливу роль у формуванні протимікробного, противірусного, протипухлинного, трансплантаційного імунітету та формуванні імунологічної толерантності.

**Фагоцитарні клітини** - основна група клітин міелоїдного походження системи вродженого імунітету. За морфологією і функціями їх розподіляють на мононуклеарні фагоцити (моноцити і макрофаги) і поліморфо-ядерні лейкоцити (ПМЯЛ). ПМЯЛ представляють собою округлі клітини діаметром 10-15 мкм з

паличковидним або сегментованим ядрами. Морфологічною особливістю ПМЯЛ є достатньо виражена грануляція цитоплазми. Гранули різняться за формою і розміром, містять значну кількість бактерицидних сполук. До фагоцитозу здатні всі ПМЯЛ, але тільки нейтрофілам притаманна висока фагоцитарна активність.

До мононуклеарних фагоцитів належать моноцити і макрофаги. Моноцити крупніші за інші лейкоцити. Ядра моноцитів бобовидні, підковоподібні, рідше — дольчасті. Цитоплазма моноцитів блідо-голуба, але по периферії темніша. В цитоплазмі містяться дуже дрібні азурофільні зерна. Для моноцитів характерним є наявність виростів цитоплазми і утворення фагоцитарних вакуолей, в цитоплазмі візуалізуються піноцитозні везикули. Моноцити здатні активно прилипати до скла, здійснювати фагоцитоз і піноцитоз, є дуже рухливими клітинами. Моноцити, що мігрують в тканини, перетворюються на різні популяції тканинних макрофагів під впливом факторів мікрооточення тканин. Макрофаги в організмі можуть бути у вільному і фіксованому стані. Під час запалення вони активно мігрують в осередок, змінюють свої властивості і функції. Критеріями функціональної активності макрофагів є фагоцитарна активність, бактерицидні властивості, здатність до агрегації, взаємодії з лімфоцитами. Макрофаги володіють здатністю регулювати запальний процес і індукувати розвиток адаптивної імунної відповіді.

Активация фагоцитів запускається через різноманітні рецептори. Наприклад, на поверхні фагоцитарних клітин представлені специфічні рецептори до Fc-фрагментів IgG, до компонентів системи комплементу, які ініціюють фагоцитоз опсонізованих об'єктів. Активовані фагоцити виконують різні функції: здійснюють хемотаксис, фагоцитоз, продукують активні форми кисню і нітрогену, синтезують і секретують цитокіни, проявляють бактерицидну активність, а також здійснюють процесинг і презентацію антигенів (дендритні клітини, макрофаги).

Джерелом фагоцитарних клітин є периферична кров, перитонеальний ексудат, клітинні суспензії тканин і органів, а також змиви і секрети.

Визначення різних показників фагоцитарної активності клітин має важливе значення для оцінки стану як системної імунореактивності організму, так і місцевого імунітету. Для оцінки показників фагоцитозу використовують різні методи визначення фагоцитарної активності нейтрофільних лейкоцитів і макрофагів, а також різні цитохімічні тести, які дозволяють оцінити функціональний стан фагоцитарних клітин. Дослідження фагоцитарної

активності клітин базується на кількісному визначенні поглинутих і перетравлених фагоцитами мікроорганізмів при сумісній інкубації фагоцитів з тест-культурою мікроорганізмів або інертними частками (латекс).

### **Практичне завдання:**

1. Визначити фагоцитарну активність клітин імунної системи.

### **Дослідження фагоцитарної активності клітин периферичної крові людини (мікрометод з капілярною кров'ю)**

#### **Хід роботи**

1. Обробити шкіру спиртом. Висушити. Стерильним ланцетом зробити прокол пальця.
2. Капілярну кров в об'ємі 0,1 мл нанести у вигляді краплини на знежирене покривне скельце. Місце проколу обробити спиртом.
3. Покласти покривне скельце з краплиною крові в центр предметного скла.
4. Скельця помістити у вологу камеру (чашка Петрі з просоченим водою фільтрувальним папером), витримати камеру в термостаті 45 хвилин при  $t+37^{\circ}\text{C}$ .
5. Згусток еритроцитів крові обережно видалити з поверхні покривного скельця за допомогою препарувальної голки.
6. На покривне скельце нанести піпеткою 0,2 мл суспензії тест-об'єктів для фагоцитозу (частинки латексу або тест-культури мікроорганізмів) і витримати у вологій камері 30 хвилин при  $t+37^{\circ}\text{C}$ .
7. Для видалення неадгезованих клітин і непоглинутих частинок покривне скельце занурити пінцетом у розчин Хенкса і промити 2 хвилини.
8. Висушити при кімнатній температурі, фіксувати клітини метанолом 5 хвилин і фарбувати 4 хвилини гематоксиліном Караччі з дофарбуванням еозином (30 секунд).
9. Мікроскопіювати препарат з імерсійним об'єктивом  $\times 90$ .
10. Визначити відсоток клітин з ендочитованим матеріалом. На скельці дослідити 100 клітин.

### **Визначення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів експериментальних тварин**

#### **Хід роботи**

1. Для отримання перитонеальних макрофагів мишей (або щурів) наркотизувати, фіксувати і ввести внутрішньочеревно 5-10 мл середовища 199 з 10% сироваткою ембріона корови.
2. Після легкого масажу черевної порожнини обережно вскрити в асептичних умовах черевну порожнину і шприцем відібрати перитонеальну рідину в центрифужні пробірки.

3. Центрифугувати 10 - 15 хвилин при 1500 об/хв. Надосад злити, клітинний осад ресуспендувати в 1 мл середовища 199.
4. Підрахувати кількість клітин в камері Горяєва. Довести до концентрації  $2 \times 10^6$  клітин на мл.
5. До суспензії клітин додати об'єкти фагоцитозу у співвідношенні 1:10. Інкубувати 30 хвилин при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Бактерії додатково опсонізувати мишачою сироваткою 10 хвилин при  $+37^{\circ}\text{C}$ , відмити.
6. Після інкубації приготувати мазки на предметних скельцях, висушити, зафіксувати метанолом 20 хвилин і фарбувати за Романовським–Гімзе 30-40 хвилин.
7. Мікроскопіювати препарати з імерсійним об'єктивом  $\times 90$ .
8. Визначити відсоток клітин з фагоцитованим матеріалом. На скельці дослідити 100 клітин.

### **Визначення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові**

#### **Хід роботи**

1. Мікробну тест-культуру культивують на твердому поживному середовищі одну добу, змивають фізіологічним розчином, після чого доводять до певної концентрації з використанням стандарта каламутності ( $2 \times 10^9$  клітин на мл).
2. В центрифужну пробірку додати 0,25 мл 2% розчину цитрату натрію і 0,5 мл цільної венозної крові, отриманої натщесерце.
3. Додати до зразка крові 0,25 мл завісини добової тест-культури мікроорганізмів, попередньо підігрітої до температури  $+37^{\circ}\text{C}$  (співвідношення інгредієнтів 1:2:1).
4. Суміш перемішати та інкубувати при температурі  $+37^{\circ}\text{C}$  30 хвилин, струшувати кожні 10 хвилин.
5. Пробірки центрифугувати при 1500 об/хв. 10 хвилин. Надосадову рідину злити, осад ресуспендувати в 1 мл фізіологічного розчину.
6. З отриманої суспензії клітин приготувати два тонких мазка на обезжирених предметних скельцях.
7. Препарати висушити при кімнатній температурі, фіксувати в суміші Нікіфорова 10 хвилин і фарбувати за Романовським – Гімзе 30 хвилин.
8. Мікроскопіювати препарати з імерсійним об'єктивом  $\times 90$ .
9. Визначити відсоток клітин з фагоцитованим матеріалом. На скельці дослідити 100 клітин.

#### **Облік результатів:**

При мікроскопії фарбованих мазків враховують 100 – 200 фагоцитів, в яких підраховують:

- 1) Кількість клітин з ознаками фагоцитозу;

2) Кількість поглинутих мікроорганізмів (частинок латексу);

Поглиналивну здатність фагоцитів оцінюють показниками фагоцитарного індексу і фагоцитарного числа.

**Фагоцитарний індекс (ФІ)** - відсоток фагоцитів, що містять мікроорганізми (частинки) з кількості усіх підрахованих фагоцитів. В нормі він становить 40 – 80 %.

**Фагоцитарне число (ФЧ)** – середня кількість мікроорганізмів (частинок), які поглинуті одним активним фагоцитом. В нормі це число дорівнює 4-9.

**Матеріали та обладнання:** добові тест-культури мікроорганізмів – *Staphylococcus aureus* (штам 209), *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*; 2% розчин цитрату натрію, фізіологічний розчин, суміш Нікіфорова, метанол, барвник Романовського-Гімзе, стандарт каламутності, термостат, центрифуга, мікроскоп, лабораторний посуд: центрифужні пробірки, піпетки, предметні і покривні скельця.

## **Висновок**

---

### **Запитання для самоконтролю:**

1. Які основні складові природнього імунітету Вам відомі?
2. Які клітини імунної системи здатні здійснювати фагоцитоз патогенів при розвитку запалення?
3. Опишіть основні етапи фагоцитозу.
4. Які методичні підходи можна застосувати для дослідження фагоцитарної активності клітин?
5. Що таке фагоцитарний індекс і фагоцитарне число?

## **Лабораторна робота № 14. Проточна цитометрія. Імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові людини.**

Для характеристики імунної реактивності необхідно ідентифікувати і провести кількісну та функціональну (проліферативна активність, синтез і секреція біологічно активних медіаторів, таких як цитокіни і хемокіни, здатність до міжклітинної взаємодії тощо) оцінку клітин імунної системи різних типів. Значний обсяг такої інформації можна отримати шляхом аналізу поверхневих мембранних молекул імуноцитів, які часто служать так званими фенотиповими маркерами клітин різних популяцій і субпопуляцій. Серед великого різноманіття поверхневих мембранних молекул клітин імунної системи найчастіше з цією метою застосовують аналіз кластерів диференціювання лейкоцитів (від англ. clusters of differentiation, CD) –

поверхневоклітинні молекули, які виконують функції рецепторів або лігандів і відображають ступінь зрілості клітини, стадію її диференціювання, функціональний стан (активація/інактивація), готовність до міжклітинної взаємодії або взаємодії з позаклітинним матриксом, адгезивні та міграційні властивості тощо. Крім того, CD-маркери застосовуються для характеристики популяційної (лінійної) приналежності лейкоцитів. Дослідження кількісних і функціональних характеристик клітин імунної системи, засноване на аналізі CD-маркерів, належить до імунологічних методів дослідження, заснованих на непрямій реєстрації імунних комплексів і проводиться з використанням моноклональних антитіл, специфічних до різних CD-маркерів і кон'югованих з мітками: ферментами, флуорофорами (флуорофор – хімічна сполука, здатна випромінювати світло при її збудженні світлом іншої довжини хвилі). Реєстрація імунного комплексу (комплексу між досліджуваною клітиною імунної системи і моноклональним антитілом, специфічним до її поверхневоклітинного маркера) відбувається шляхом реєстрації мітки, кон'югованої з анти-CD антитілом методом світлової, флуоресцентної мікроскопії або методом проточної цитометрії (цитофлуориметрії). Проточна цитофлуориметрія (Flow Cytometry) є одним з найбільш точних, чутливих і сучасних методів дослідження популяцій клітин імунної системи.

**Проточний цитофлуориметр** – це прилад, який дозволяє вимірювати оптичні властивості індивідуальних клітин у гетерогенній клітинній суспензії без її попереднього фракціонування. На відміну від оптичного мікроскопа, проточна цитофлуориметрія не є методом візуалізації. Зображення клітини в процесі роботи прилад не отримує.

Проточні цитофлуориметри можуть забезпечуватися 1-6 лазерами. Для кожної клітини, в залежності від конструкції приладу, може вимірюватися від 5 до 14 і більше параметрів.

Перевагами методу проточної цитометріїє: короткий час аналізу, завдяки величезній продуктивності (аналіз до  $10^5$  клітин за секунду); аналіз великої кількості клітин (до  $10^7$  клітин), що гарантує статистичну достовірність результатів; детектування окремих субпопуляцій клітин, що важливо при аналізі гетерогенних клітинних популяцій, таких як периферична кров; здатність виявити і характеризувати рідкісні клітини (клітинні стани), тобто ті, які зустрічаються з частотою  $10^{-5}$ - $10^{-7}$ .

### **Принцип проточної цитометрії**

Проточна цитометрія - метод якісного та кількісного дослідження біологічних та фізичних властивостей клітин, що знаходяться в потоці, за сигналами світлорозсіювання і флуоресценції в режимі поштучного аналізу.

Для фокусування клітин в потоці рідини використовується гідродинамічне або акустичне фокусування, за допомогою якого клітини шикуються в потоці в ряд, одна за одною.

У проточній комірці клітини опромінюються лазером, оптична система приладу збирає світловий сигнал від клітин, а електронна система перетворює і оцифровує цей сигнал для подальшого аналізу (рис. 14.1).

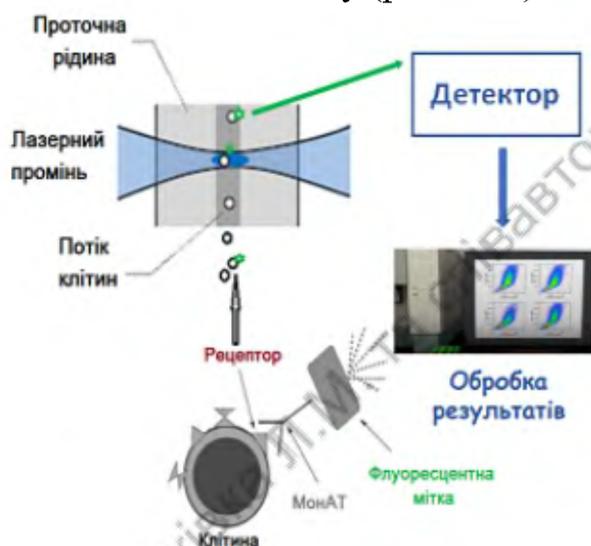


Рис.14.1. Принцип проточної цитофлуориметрії

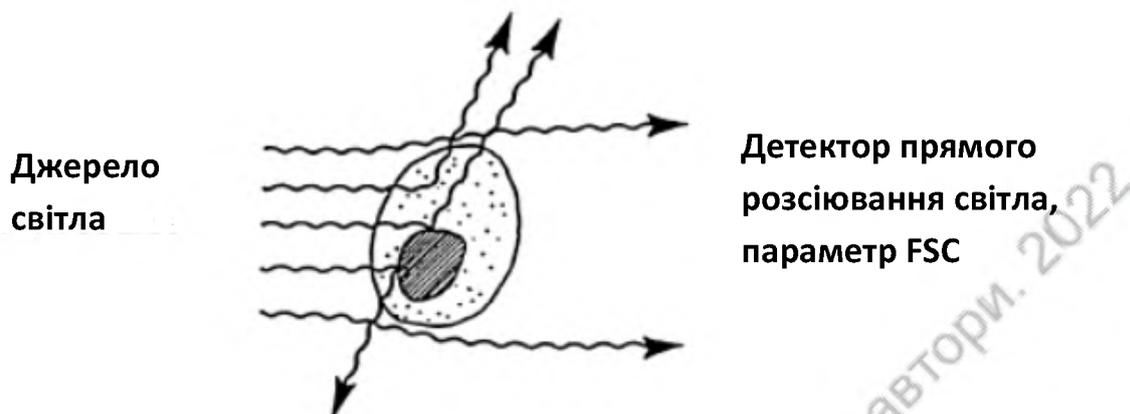
Проточний цитофлуориметр сконструйований таким чином, що досліджувані клітини поодиночці проходять крізь тонкий капіляр і опромінюються лазерним променем певної довжини хвилі. При цьому відбувається розсіювання лазерного світла. Клітини розсіюють лазерне світло під усіма кутами. Розсіювання світла залежить від розміру частинок (комірки) (об'єм, площа поверхні комірки) і внутрішньої складності (ядро, зернистість) (рис.14.2).

**Сигнал прямого світлорозсіювання (forward scatter, FSC).** Якщо довжина хвилі світла порівнянна з розміром часточок (клітин) - світло розсіюється під малими кутами ( $1-19^{\circ}$ ) і називається пряморозсіяним. Показник інтенсивності прямого світлорозсіювання використовують для визначення розміру (діаметра) клітин. Чим більшою за розміром є клітина, тим більшою буде інтенсивність її прямого світлорозсіювання.

**Сигнал бічного світлорозсіювання (side scatters, SSC).** Якщо довжина хвилі світла більша за розміри часточок (клітин) - світло розсіюється під кутом  $90^{\circ}$ , що спостерігається при реєстрації внутрішньоклітинних структур. Показник інтенсивності бічного світлорозсіювання використовують для визначення структурної складності (форми ядра, гранулярності тощо) клітин

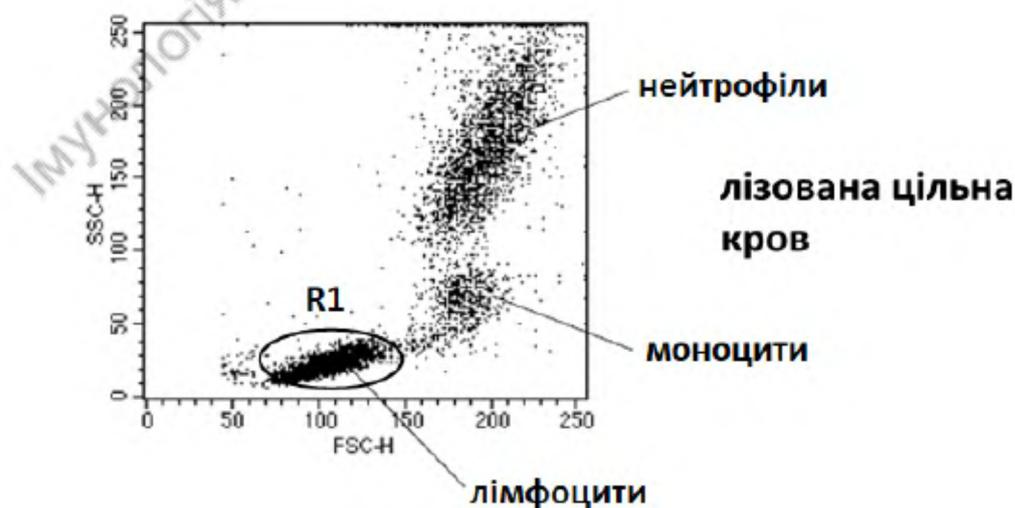
Інтенсивність бічного світлорозсіювання буде вищою у клітин з високим вмістом цитоплазматичних гранул.

**Детектор бічного  
розсіювання світла,  
параметр SSC**



**Рис.14.2.** Властивості клітини щодо розсіювання світла.

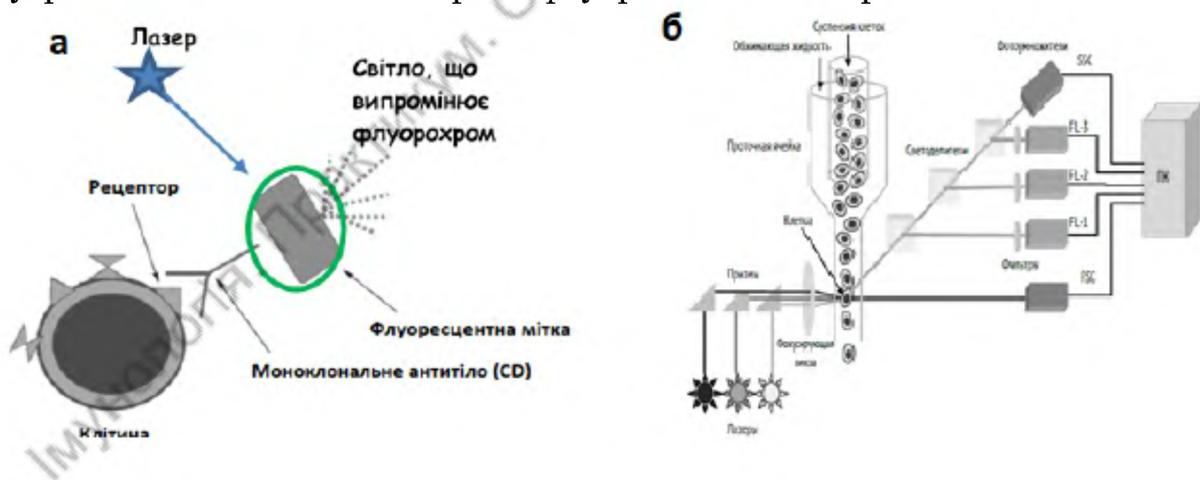
Для візуалізації даних у проточній цитометрії значення кожного виміряного оптичного параметра можна відобразити графічно різними способами. Графіки можуть бути однофакторними (гістограми) або двовимірними (точкові графіки). Однофакторні графіки дозволяють візуалізувати один оптичний параметр (розсіювання світла або флуоресценцію) для кожної «події» (у проточній цитометрії «подією» називається одна часточка, виявлена приладом). Двовимірні графіки – точкові графіки – дозволяють візуалізувати два оптичних параметри в одній системі координат (рис.14.3).



**Рис.14.3.** Гістограма розподілу клітин лізату цільної крові людини в залежності від прямого (FSC) і бічного (SSC) розсіювання світла.

Положення події визначається двома значеннями, тобто інтенсивністю сигналу для оптичних параметрів, відображених на осі  $x$  і  $y$ . Коли всі події нанесені на графік, події з подібними значеннями інтенсивності накопичуються в кластерах, які можуть представляти певні популяції клітин. характеризується дуже високою щільністю подій.

Основний параметр проточного цитофлуориметра - інтенсивність флуоресценції досліджуваного об'єкта, яка забезпечується використанням флуорофорів. Лазерне світло збуджує мічені флуорофором антитіла або флуоресцентні барвники, які використовуються для кількісного та функціонального аналізу клітин (наприклад, антитіла, мічені флуоресцеїнізотиоціанатом (Fluorescein-5-isothiocyanate, FITC) або йодид пропідію). Для цього лазери збуджують клітини в точці дослідження рівномірним світлом певної довжини хвилі. При потраплянні лазерного променя, флуорофор збуджується і випромінює світло з більшою довжиною хвилі, ніж лазер (рис. 14.4, а). Це світло проходить крізь ряд фільтрів, підсилюється дзеркалами і реєструється певним детектором як флуоресценція (показник FL) (рис. 14.4, б). Інтенсивність флуоресценції клітини пропорційна кількості поверхневоклітинних молекул, з'єднаних з міченими антитілами або внутрішньоклітинній концентрації флуоресцентного барвника.



**Рис.14.4.** Детекція флуоресценції проточним цитофлуориметром

### Імунофенотипування клітин крові.

Імунофенотипування методом проточної цитометрії – це методологія ідентифікації та кількісного аналізу клітин на основі їх поверхнево клітинних маркерів, яка проводиться з використанням мічених флуорофорами специфічних моноклональних антитіл.

Лімфоцити крові людини поділяють на такі основні **популяції**: Т-лімфоцити, В-лімфоцити, природні кілери (ПК), природні кілерні Т-клітини (ПКТ). Кожна з популяцій поділяється на **субпопуляції**. Наприклад, Т-клітини за будовою Т-клітинного рецептору поділяються на  $\alpha\beta$ -Т-лімфоцити та  $\gamma\delta$ -Т-лімфоцити, а за експресією поверхневих маркерів поділяються на CD4-позитивні і CD8-позитивні Т-клітини. CD4+Т-клітини, в свою чергу, поділяють на Т-хелпери 1 (Тх1), Т-хелпери 2 (Тх2), Тх17 (продукують ІЛ-17), можуть викликати запалення тканин, аутоімунні розлади, опосередковують протиінфекційний захист, а також та регуляторні Т-клітини (Трег), а CD8+Т-клітини – на Т-цитотоксичні клітини типу 1 (Тц1) та Т-цитотоксичні клітини типу 2 (Тц2). Ця класифікація заснована на різниці біологічних функцій клітин і експресії певних поверхневих клітинних маркерів.

Перелік CD-антигенів, які використовуються для імунофенотипування, постійно поповнюється і сьогодні містить приблизно 400 CD-антигенів і їх підтипів. Їх виявлення широко використовується в імунодіагностиці. Діагностичну значимість мають як визначення відсотка клітин, що несуть на своїй поверхні певний антиген, так і інтенсивність експресії певного антигену на поверхні клітинної мембрани.

До маркерів, що характеризують лінію (популяцію) Т-клітин, у першу чергу, належить Т-клітинний рецептор (ТКР). Існує два типи ТКР. ТКР1 – складається з гама та дельта (2 -9 %) ланцюгів та ТКР2 – з альфа та бета ланцюгів (81 – 98 % всіх лімфоцитів). Однак, характеризують Т-лімфоцити за експресією CD3 - комплексу п'яти інваріантних поліпептидних ланцюгів, що складають повний комплекс антигенного рецептора Т-клітин. CD3 – це пан Т-клітинний фенотипів маркер, або маркер, який експресуються всіма Т-клітинами.

**Референтні значення кількості CD3+ лімфоцитів** у периферичній крові: 60-80%, абс. число  $0,8-2,2 \times 10^9$ /л.

CD4 - характерний для хелперних Т-клітин; представлений також на моноцитах, макрофагах, дендритних клітинах. Це корецепторна молекула антигенного рецептора Т-клітин, яка зв'язується з молекулами МНС класу II. Експресується також на антигенпрезентувальних клітинах, полегшує розпізнавання пептидних антигенів. Як зазначено вище, CD4+ Т-клітини поділяють на Т-хелпери 1 (Тх1), Т-хелпери 2 (Тх2), Тх17 (продукують ІЛ-17, можуть викликати запалення тканин, аутоімунні розлади, протиінфекційний захист) та регуляторні Т-клітини (Трег). Тх1 продукують прозапальні цитокіни інтерлейкін (ІЛ)-2, фактор некрозу пухлин  $\alpha$  (ФНП  $\alpha$ ), фактор некрозу пухлин  $\beta$

(ФНП  $\beta$ ), ІЛ-3, ключовий цитокін цих клітин – інтерферон  $\gamma$  (ІФН  $\gamma$ ). CD4+ Т-клітини беруть участь в активації цитотоксичних Т-клітин, відіграють важливу роль у боротьбі з внутрішньоклітинними збудниками інфекцій; відповідають за розвиток клітинної імунної відповіді. Тх2 продукують протизапальні цитокіни ІЛ-4, ІЛ-13, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9, ІЛ-11, ІЛ-21, ІЛ-25, ІЛ-10, ІЛ-3, ключовим цитокіном цих клітин є ІЛ-4; відповідають за розвиток гуморальної імунної відповіді. Тх17 - ключовий цитокін ІЛ-17, крім того секретують ІЛ-21 і ІЛ-22, диференціюються з активованих CD4 + клітин незалежно від Тх1- і Тх2-лімфоцитів. Ці клітини можуть брати участь в імунному захисті від патогенів. Основна функція Трег лімфоцитів полягає у запобіганні реакції інших Т-клітин на аутоантигени, а також обмеження (супресія) будь-яких форм імунної відповіді. Натуральні регуляторні клітини експресують  $\alpha$ -ланцюг рецептора для ІЛ-2 (CD25), що відрізняє їх від активованих Т-хелперів, що несуть меншу кількість молекул CD25. Супресорна активність CD4+ регуляторних Т-клітин пов'язана з транскрипційним фактором FOXP3. Трег мають фенотип CD4+/CD25hi/FOXP3+.

CD4+CD25hi Т-лімфоцити складають 5% від числа тимоцитів, 3-5% від числа периферичних лімфоцитів (5-7% від числа CD4+ Т-клітин).

**Референтні значення кількості CD4+ лімфоцитів** в периферичній крові: 33-52%, абс. число  $0,5-1,4 \times 10^9$ /л.

CD8 – маркер цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ). Подібно до CD4+Т-лімфоцитів, CD8+Т-лімфоцити поділяють на дві ефекторні популяції в залежності від набору цитокінів, які вони секретують. CD8+ цитотоксичні Т-клітини 1-го типу (Тс1) в основному секретують ІФН- $\gamma$  і ефективно знищують клітини-мішені за перфориновим і CD95-опосередкованим механізми. CD8+Т-клітини 2-го типу (Тс2), в основному, секретують ІЛ-4, -5, -10 та -13 і менш ефективно знищують клітини-мішені за перфорин-гранзимовим механізмом. CD8+ ЦТЛ здійснюють знищення чутливих клітин-мішеней за перфорин-гранзимовим та CD95/CD95L-залежним механізми.

**Референтні значення кількості CD8+ лімфоцитів** в периферичній крові: 19- 35%, абс. число  $0,3-0,9 \times 10^9$ /л.

Один з основних маркерів для НКК є молекула CD16. Антиген CD16 – це низько афінний рецептор для IgG. Інший маркер – це CD56, який є ізоформою N-CAM (neural cell adhesion molecule).

**Референтні значення кількості ПК (CD16+56+ лімфоцитів)** в периферичній крові: 6-20%, абс число  $0,1-0,4 \times 10^9$ /л.

ПКТ- експресують маркери ПК (CD16 та CD56) та Т-лімфоцитів (CD3). Поєднують механізми природної резистентності та специфічної імунної реактивності.

**Референтні значення кількості CD3+CD16+56+ лімфоцитів** в периферичній крові: 0-10%, абс. число 0-0,28 x10<sup>9</sup>/л.

CD19/CD20 – маркери В-лимфоцитів.

**Референтні значення кількості CD19+ лімфоцитів** в периферичній крові: 7-19%, абс. число 0,1-0,5 x10<sup>9</sup>/л.

CD3+HLA-DR+ - фенотип активованих Т-лімфоцитів (пізня активація).

**Референтні значення кількості CD3+HLA-DR+** в периферичній крові: 3-20%, абс. число 0,08-0,28 x10<sup>9</sup>/л.

CD4+CD25+FoxP3+D127- – регуляторні Т-лімфоцити.

**Референтні значення кількості CD4+CD25+FoxP3+CD127-** в периферичній крові: 7-10%, абс. число 0,1-0,28 x10<sup>9</sup>/л.

Як зазначено вище, для імунофенотипування методом проточної цитометрії застосовують антитіла проти фенотипових маркерів, мічені флуорофорами - речовинами, здатними витратити частину енергії поглиненого світла на флуоресценцію (або випромінювання світла певної довжини хвилі при поверненні із збудженого стану в стабільний). При цьому світло, що випромінюється, відрізняється від поглиненого довжиною хвилі та інтенсивністю. Відповідно до правила Стокса, довжина хвилі світла, що випромінюється, більша, ніж довжина світла, що поглинається, оскільки при поглинанні частина енергії розсіюється у вигляді тепла, а випромінювання світла більшої довжини хвилі вимагає менше енергії. Кожний флуорофор характеризується певним спектром поглинання і випромінення, який визначається шляхом вимірювання відносної інтенсивності флуоресценції при певній довжині хвилі.

Наприклад, спектр поглинання FITC при його збудженні лазером з довжиною хвилі 488нм становить 495нм, а довжина хвилі емісії (флуоресценції) – 520 нм.

Проте, застосування одного типу моноклональних антитіл, мічених флуорофором (так звана одинарна мітка) не завжди дає об'єктивну інформацію про ту чи іншу популяцію лімфоцитів, оскільки кожна клітина несе на своїй поверхні одночасно велике різноманіття антигенів. Більш точне і інформативне дослідження субпопуляцій досягається при використанні антитіл з подвійною міткою, тобто до зразка досліджуваних клітин додають одночасно два типи моноклональних антитіл з різною специфічністю, що несуть на собі різні

флуоресцентні барвники (наприклад, анти-CD3-FITC та анти-CD8-PE (Phycocerythrin, фікоеритрин), довжина хвилі емісії 575 нм, у APC (аллофікоціанін – лазер 650 нм, емісія 660 нм). За допомогою такого підходу можна визначити на поверхні лімфоцитів одночасну експресію двох або більше маркерів.

### **Практичне завдання:**

1. Провести імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові.
2. Визначити відносну та абсолютну кількість CD3+; CD3+CD4+; CD3+CD8+; CD3-CD16+56+, CD3-CD19+, CD3+CD16+56+ та CD3+HLA-DR+ – лімфоцитів за допомогою проточного цитофлуориметра.

### **Хід роботи**

1. Використовуються наступні моноклональні антитіла (монАт):

1 пробірка: К – контроль (монАт не додаються)

2 пробірка: монАт анти CD3-FITC+ анти CD4-PE + анти CD8-APC

3 пробірка: монАт анти CD3-FITC+ анти CD19-PE

4 пробірка: монАт анти CD3-FITC+ анти CD16+56-PE

5 пробірка: монАт анти CD3-FITC+ анти HLA-DR-PE

Відповідно до специфічності антитіл необхідно підписати пробірки.

2. Внести у пробірки по 5 мкл відповідних монАт різної специфічності, кожне з яких мічене «своїм» флуорофором. Кожного разу слід використовувати чистий накінецьник!
3. Перемішати зразок крові.
4. Вести у кожну пробірку по 25 мкл периферичної крові. Обережно, не торкаючись стінок пробірки.
5. Інкубувати протягом 30 хв у темряві за кімнатної температури.
6. Після інкубації додати до зразків по 2 мл лізуючого буфера (гіпотонічний розчин для лізису еритроцитів). Інкубувати протягом 10 хв у темряві.
7. Додати по 2 мл забуференого фізіологічного розчину (ЗФР) у кожну пробірку для відновлення ізотонічності середовища та центрифугувати протягом 10 хв при 1500 об/хв.
8. Вийняти пробірки з центрифуги.
9. Злити надосад.

10. Додати 400 мкл ЗФР до кожної пробірки.
11. Включити проточний цитофлуориметр, проточну систему приладу, яка працює як система гідродинамічного фокусування, що забезпечує проходження клітин крізь камеру поодинці; включити комп'ютер з програмами для отримання даних, що передає прилад, їх обробки та аналізу.
12. Запустити програму, яка забезпечує отримання та обробку даних, переданих з проточного цитофлуориметра. Створити протокол, в якому будуть записуватися та аналізуватися всі одержані дані даного зразка. Включити та налаштувати відповідні інструменти, що забезпечують зв'язок з приладом та керування його роботою.
13. Провести аналіз зразків. Для початку розмістити контрольний зразок клітин у пробозабірнику приладу та здійснити налаштування ряду параметрів приладу. У протоколі зафіксувати, що це був контрольний зразок.
14. Змінити найменування зразка в протоколі з контролю на дослідний відповідно до специфічності використаних моноклональних антитіл, наприклад, - 3, 4, 8. Здійснити отримання та запис даних.
15. Таким чином здійснити підрахунок клітин у даній пробі, що несуть антигени CD3, CD4, CD8.
16. Такі ж дії здійснити відносно кожного зразка. Записати та зберегти всі одержані дані. Потім провести аналіз відсоткового вмісту клітин у зразках, що несуть відповідні антигени.
17. Підрахувати абсолютну кількість CD3+; CD4+; CD8+; CD16+56+, CD3+CD16+56+ та CD3+HLA-DR+ - лімфоцитів.

**Матеріали та обладнання:** проточний цитофлуориметр, холодильник, центрифуга, автоматичні дозатори і накінечники, полістиролові пробірки, буферний розчин, лізуючий розчин, моноклональні антитіла, досліджувані зразки крові з антикоагулянтом ЕДТА.

**Висновок:**

---

---

**Запитання для самоконтролю:**

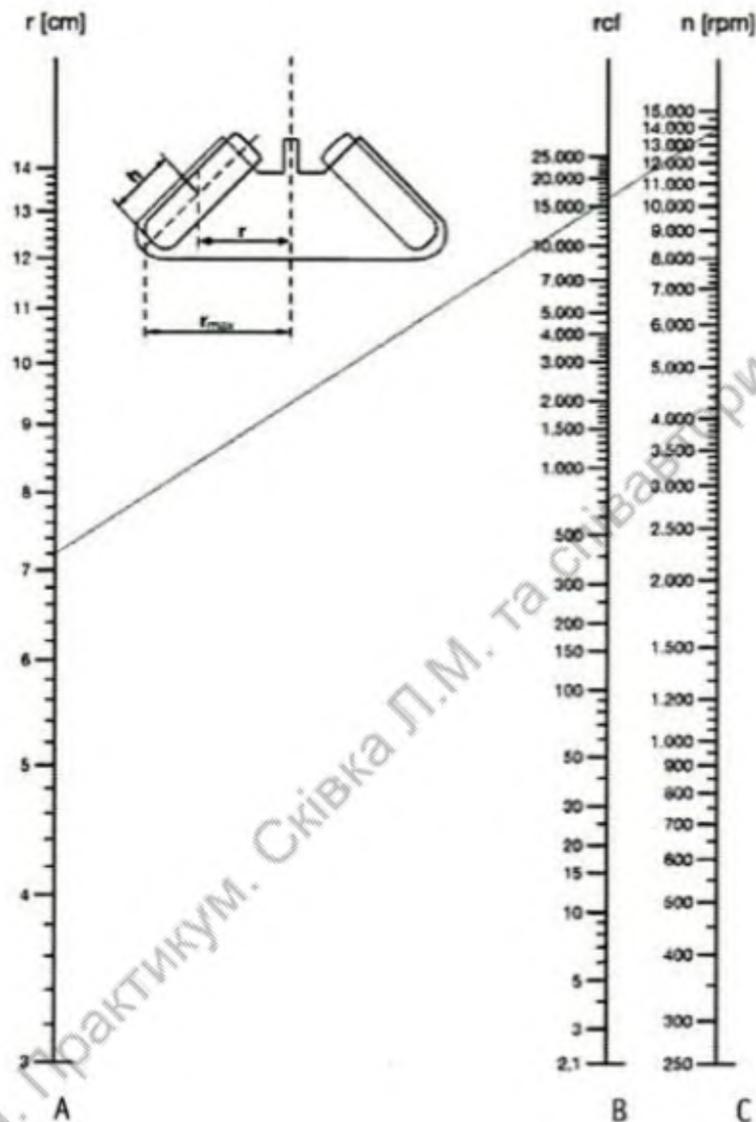
1. В чому полягає принцип проточної цитофлуориметрії?

2. Назвіть переваги проточної цитофлуориметрії порівняно з флуоресцентною мікроскопією.
3. Імунофенотипування лімфоцитів – це..?
4. Які популяції та субпопуляції Т-лімфоцитів вам відомі? Який їх фенотип і функціональне призначення?
5. Головний цитокін, який продукують Тх1?

Імунологія. Практикум. Сківка Л.М. та співавтори. 2022

## Додаток 1

Номограма для визначення відносного прискорення центрифуги (rcf) залежно від швидкості обертання ротора (n, rpm) та його радіусу (r)



$r$  – радіус ротора, см

$n$  – швидкість обертання ротора, обертів за хвилину (rpm – від англ. revolutions per minute)

rcf (від англ. relative centrifuge force) – відносне прискорення центрифуги

Радіус центрифугування  $r_{max}$  – це відстань від осі обертання ротора до дна гнізда ротора.

Приклад застосування: на шкалі А відмічають значення  $r$  радіуса ротора – 7,2 см, на шкалі С відмічають значення швидкості ротора – 14000 об/хв, з'єднують ці дві точки. Точка перетину утвореного відрізка зі шкалою В вказує значення прискорення для даного ротора. В даному випадку прискорення дорівнює 15000.

## Список використаних джерел літератури.

1. Вершигора А.Ю., Пастер Є.У., Колибо Д.В. та ін. Імунологія. Підручник. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2011. - 911 с.
2. Чайченко Г.М., Цибенко В.О., Сокур В.Д. Фізіологія людини і тварини. Підручник. К.: Вища школа. 2003. - 463 с.
3. Галактионов В. Г. Эволюционная иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. Г. Галактионов. - М. : Академкнига, 2005. - 408 с.
4. Demas G. E., Nelson R. F. Ecoimmunology. Oxford University Press, Incorporated, 2011 – 576 p.
5. Грищенко Л.И., Акбаев М.Ш., Васильков Г.В. Болезни рыб и основы рыбоводства — М.: Колос, 1999. — 456 с.
6. Sharon G., Zilberg D. Atlas of Fish Histology and Histopathology. - Central and Northern Arava Research and Development Centers, 2012. – 78 p.
7. Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria // Proc Natl AcadSci USA. 1996;93(18):9553-8.
8. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. Натвиг Дж. Б., Перлманн П., Вигзелль Х., ред. Пер. с англ. М.: Медицина; 1980, 280 с.
9. Антитела. Методы. Пер. с англ. Под ред. Д.Кэтти.- М.:Мир, 1991, 911 с.
10. Лимфоциты. Методы. Пер. с англ. Под ред. Дж.Клауса.-М.:Мир, 1990, 400 с.
11. Иммунологические методы исследований. Пер. с англ. Под ред. И.Лефковитса, Б.Перниса.- М.: Мир, 1988, 530 с.
12. Кондратьева И.А., Ярилин А.А., Егорова С.Г. Практикум по иммунологии: Учеб. Пособие для студ. Высш. Учеб. Заведений, 2-е изд., испр. и доп. // М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
13. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике - Кишкун А.А. - Практическое пособие // М., ООО «Медицинское информационное агенство» Издательский центр «Академия», 2006. – 536 с.
14. Скок М. В. Основи імунології. Курс лекцій. Київ 2002.- 151 с.
15. Пастер Е. У., Овод В. В. Позур В. К., Вихоть Н. Е. Иммунология. Практикум. – К.: Изд-во при Киев. ун-те, 1989 – 304 с.
16. Титов Л. П. Иммунология. Терминологический словарь. М: ООО «Медицинское информационное агенство», 2008. – 512 с.
17. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте //

- Учебное пособие. — 3-е изд., перераб. и доп. — Киев: Вища школа, 1983. — 383 с.: ил.
17. Carbone L. What Animals Want: Expertise and Advocacy in Laboratory Animal Welfare // Oxford University Press. - 2004. - p. 22.
  18. Кучеренко МЄ, Бабенюк ЮД, Войціцький ВМ Сучасні методи біохімічних досліджень: учбовий посібник.- К: Фітосоціоцентр, 2001. - 424 с.
  19. Казин В.Н., Урванцева Г.А. Физико-химические методы исследования в экологии и биологии: учебное пособие. – Ярославль: Ярославский гос. университет, 2002. – 172 с.
  20. Физико-химические методы анализа в биохимии: Тексты лекций по спецкурсу для студентов биологического факультета/ авт.-соавт. Воробьева Е.В.; Мин. образ. РБ, УО «ГГУ им. Ф. Скорины»; Гомель, 2005. – 133с.
  21. Казмірчук В.Є. Інтерпретація лейкограми та імунограми згідно з сучасними позиціями. "Внутрішня медицина"- 4(4), 2007.
  22. Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Артамонова М.Н. Методические рекомендации для студентов к лабораторным занятиям по иммунологии Учебное пособие. - Ульяновск, 2016. - 82 с.

Імунологія. Практикум. Сківка Л.М. Харків: «Ваварія» 2022