

Методы исследования в иммунологии в последние два десятилетия

Л.А.Кцоян, С.С.Гамбаров, С.С.Арутюнян, А.В.Акопян, А.Р.Габриелян, А.С.Захарян

Кафедра клинической иммунологии и аллергологии ЕРГМУ им. М. Герац,

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: иммунологические методы, иммунодиагностика, проточная цитометрия, гибридомы, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, иммунофлюоресценция

В настоящее время задачами клинической иммунодиагностики являются:

- диагностика аллергии;
- выявление аутоиммунных заболеваний и выяснение их механизма;
- оценка состояния иммунной системы (ИС) с целью выявления ее наследственной и вторичной недостаточности, которая сопровождается различными заболеваниями;
- диагностика злокачественных новообразований и контроль за их иммунотерапией;
- типирование тканей и подбор доноров при пересадках тканей и органов;
- диагностика иммунологических конфликтов мать – плод.

Сегодня в иммунологии разработано и используется большое количество показателей, дающих возможность четко выявить различные поломки в тех или иных иммунных компонентах.

Современная иммунология почти не работает на органном уровне; она использует клеточные, клеточно-молекулярные и молекулярные методы [3]. Основным объектом иммунологических анализов является кровь – как ее клеточные компоненты, так и сыворотка.

Базисные подходы иммунодиагностики, используемые сегодня в практической медицине, делятся на три группы: I. Комплекс серологических методов; II. Клеточные методы; III. Молекулярно-биологические методы.

I. Серологические методы – методы, основанные на взаимодействии антигена с антителом. Серологические реакции широко используются для идентификации и количественного определения как антигенов, так и антител.

Антитела, иммуноглобулины (Ig), – это растворимые молекулы гликопротеидов, секретируемые плазматическими клетками. Антигены бывают разные, но

большинство также растворимые. Связывание антигена с антителом часто приводит к образованию невидимого растворимого комплекса. Поэтому разные тест-системы серологических реакций различаются между собой средствами визуализации реакций взаимодействия антиген – антитело, а значит и разной чувствительностью.

Исторически было разработано достаточно много методов выявления образовавшихся комплексов антиген – антитело. Условно их можно разделить на три группы:

- А. Методы, основанные на реакции преципитации.
- Б. Методы, основанные на реакции агглютинации.
- В. Методы, основанные на использовании меченых антител или антигенов.

С момента разработки методов и по сей день в практических лабораториях достаточно широко используется метод радиальной иммунодиффузии по Манчини (реакция преципитации) и методы агглютинации, благодаря простоте и надежности. Метод иммунодиффузии довольно чувствительный, его ошибка составляет не более 10 % [18]. Основным недостатком этого метода является длительное время анализа, а преимуществом – отсутствие необходимости в аппаратуре (спектрофотометре). Метод широко используется для определения концентрации Ig, компонентов комплемента, С-реактивного белка и др. В настоящее время некоторые фирмы выпускают готовые иммунодиффузионные системы для определения содержания Ig и компонентов комплемента [11].

Для реакции агглютинации обычно используют эритроциты (гематоглобулинация) или частицы латекса (латекс-агглютинация), покрытые известным антигеном. В присутствии антител к этому антигену происходит агглютинация (склеивание и выпадение в осадок) эритроцитов или частиц латекса. По характеру образовавшегося агглютината различают зернистую и хлопьевидную агглютинацию. Зернистая агглютина-

ция происходит при склеивании микробов, содержащих О-антиген. Бактерии, имеющие жгутики (Н-антиген), агглютинируются с образованием крупных хлопьев. Методы агглютинации используются для диагностики инфекций, для оценки количества С-реактивного белка и ревматоидного фактора. Ряд зарубежных фирм выпускают стандартные наборы реактивов для постановки реакции. Эти методы просты и позволяют количественно определить антиген, однако менее чувствительны, чем радиоиммунный и твердофазный иммуноферментный анализы [6].

В последние два десятилетия наиболее широко используют следующие иммуноанализы – иммунофлюоресцентный, радиоиммунный и иммуноферментный. Иммуноанализами называют такие методы качественного и количественного определения растворимых веществ, в основе которых лежит взаимодействие антигена с антителом, которое детектируется (визуализируется) с помощью специальной метки, заранее конъюгированной либо с антителом, либо с антигеном [12].

Принцип любого иммуноанализа основан на выявлении комплекса антиген – антитело, в котором один из двух иммунореагентов был мечен меткой. Различают два типа иммуноанализов: прямые и непрямые. Прямые, – в которых метку присоединяют либо к целевому антигену, либо к специфическому против целевого антигена антителу непосредственно. Непрямые, – в которых метку присоединяют не к антигену и не к антителу, а к антивиновым, “вторым” антииммуноглобулиновым антителам. Непрямой тип иммуноанализов применяют шире, чем прямой, так как один и тот же препарат конъюгата антиглобулиновых антител с меткой используют в разных тест-системах для определения различных конкретных антигенов или антител [12].

Иммунофлюоресцентный метод основан на использовании реагентов, меченных флюоресцентным красителем. Метод применяют для выявления как антигенов, так и антител. Метод прямой иммунофлюоресценции применяют для выявления антигенов, а непрямой – позволяет выявить антитела к специфическому антигену. Как правило, флюоресцентным красителем метятся антитела. Меченые антитела связываются с антигеном, образуя комплексы, которые можно выявить с помощью флюоресцентной микроскопии в темном поле микроскопа [3,6].

Иммуноанализы – радиоиммунный (РИА) и иммуноферментный (ИФА) методы, которые одинаково специфичны, одинаково высокочувствительны (чувствительность метода позволяет определить минимальное количество вещества – нанограммы) и наиболее широко применяются в клинической диагностике.

Метки, используемые при РИА и ИФА:

1. Радионуклид (обычно используют изотопы йода:

125 I или 131 I), анализ называется радиоиммунным.

2. Ферменты, катализирующие превращения субстрата с образованием цветного или флюоресцирующего продукта. Анализ называется иммуноферментным. В качестве ферментов – меток в ИФА используют специальные ферменты:

- пероксидазу из корней хрена,
- В-галактозидазу,
- щелочную фосфатазу,
- уреазу.

Вначале – более 30 лет назад – был разработан РИА, который используется для определения концентрации гормонов, антигенов и антител. Существует несколько модификаций РИА. Одна из них, основанная на конкурентном связывании меченного радиоактивным изотопом и немеченного антигена с антителами (конкурентный РИА), применяется в клинике значительно шире, чем остальные.

В случае РИА результат измеряют на счетчиках радиоактивности (β - или γ -излучения), но этот метод имеет недостатки:

- дорогостоящее оборудование и реактивы,
- небезопасность работы с радиоактивными изотопами,
- короткий период полураспада радионуклида (необходимо обновлять примерно один раз в месяц),
- результаты РИА нельзя регистрировать без прибора.

Менее чем через год после описания РИА был предложен метод ИФА, который является одним из самых современных методов в иммунологии. В настоящее время применяют твердофазные или иммуносорбентные варианты ИФА. На твердую фазу сорбируют либо антиген, либо антитело. В качестве твердой фазы используют:

1) полистироловые, поливиниловые планшеты, шарики и колпачки, на которых адсорбированы антигены или антитела,

2) пористые материалы типа нитроцеллюлозы. В пористых материалах часть реагентов фиксировано сорбирована, а другая часть диффундирует по порам.

В случае ИФА при образовании известного продукта результат реакции определяют с помощью спектрофотометра по оптической плотности окрашенного раствора (спектрофотометр измеряет поглощение света с определенной длиной волны). Реакцию можно оценить без прибора – на глаз. При использовании в качестве метки фермента, катализирующего образование флюоресцирующего продукта, результат реакции определяют на флюориметре, измеряющем излучение в определенном диапазоне длин волн. Без прибора в данном случае не обойтись. Существует много вариантов конструкций тест-систем для ИФА. Базисными вариантами последних являются: конкурентный ИФА,

ингибиторный, "сендвич"-иммуноанализ, иммунометрический анализ [12].

Таким образом, в настоящее время ИФА в силу своей безопасности и стабильности реагентов во времени вытесняют РИА и широко используются в медицинской лабораторной диагностике.

II. Клеточные методы – методы анализа клеток иммунной системы (КИС) и их продуктов.

В процессе становления и развития иммунологии развивались и знания о КИС. Сегодня очевидно, что иммунный ответ (ИО) в норме начинается и заканчивается воспалением: доиммунное воспаление + распознавание антигена лимфоцитом + деструкция антигена (иммунное воспаление) + выведение продуктов распада антигена [5,12]. И если в 80-е годы XX века в иммунологии считалось, что из всех лейкоцитов лишь лимфоциты представляют ИС, то за последние 10 лет утвердилось мнение, что все лейкоциты являются КИС, каждая субпопуляция из которых выполняет свою функцию в ИО, т.е. в воспалении. В процессе развития иммунологии выделяют три этапа разработки методов анализа КИС [5].

Первый этап – 30-е годы XX века – создана теория кроветворения (конец XIX в.), налажен надежный метод анализа основных популяций ядросодержащих клеток в окрашенных мазках крови – лейкограмма, клинический анализ крови, даны основы клинической интерпретации лейкоцитарной формулы.

В основе определения лейкоцитов различных популяций лежат принципиальные морфологические различия по размеру, форме ядра, наличию в цитоплазме гранул и различие в их окрашивании. Практическая значимость этого этапа очевидна и сегодня – в начале XXI века врач-клиницист повседневно использует лейкограмму для определения характера течения воспалительного процесса.

В настоящее время в клинике существуют 2 метода клинического анализа крови: широко распространенный "ручной" способ визуального определения клеток при помощи светового микроскопа – метод простой, надежный, но низкопроизводительный из-за необходимости микроскопирования; автоматические анализаторы – они имеют значительно более высокую точность подсчета, поскольку результат выдается с использованием нескольких тысяч клеток, а не 100 клеток, как при световом микроскопировании [5].

Прогресс клинической иммунологии определила разработка в 70-х годах метода получения отдельных популяций лейкоцитов на градиенте плотности фикола – рентгеноконтрастное вещество (способ основан на различиях удельной массы эритроцитов и лейкоцитов разных типов) [15].

В результате одним из достижений иммунологии конца 60-х – начала 70-х годов XX века явилось учение о рецепторном аппарате лимфоцитов и других КИС. Среди открытых первыми поверхностных

структур, тесно связанных с мембраной лимфоцитов, огромное значение имеют поверхностные иммуноглобулиновые рецепторы, рецепторы для эритроцитов барана (ЭБ), для Fc – фрагментов Ig, различных компонентов комплемента и позже открытые рецепторы – клеточные дифференцировочные антигены или кластеры дифференцировки [2,7,8,10,12,14].

Следовательно, выяснилось, что популяция лимфоцитов неоднородна. Она включает популяции и субпопуляции, имеющие принципиально разные функции, разный набор маркерных молекул (антигенов, рецепторов) на мембране клеток, но морфологически они неразличимы. Идентификация этих популяций и субпопуляций возможна лишь на основе определения поверхностного антигенного состава этих клеток, т.е. их фенотипирования.

Учение о рецепторном аппарате КИС стимулировало разработку новых, более сложных (в отличие от методов определения лейкограммы), основанных на проведении иммунологических реакций, методов для выявления рецепторного аппарата КИС, определения различных медиаторов, продуцируемых этими клетками.

Основные иммунологические методы, предложенные в те годы, используются и по сей день – розеткообразование, бласттрансформация, торможение миграции лейкоцитов.

Таким образом, в 70-е годы XX века впервые клиницисты получили возможность анализировать Т- и В-лимфоциты человека.

Практическая значимость второго этапа – это выявления иммунной недостаточности при воспалительном процессе, т.е. при ИО [5].

В 80-е годы XX века была создана гибридная технология получения моноклональных антител (МА), основанная на принципе клонирования – получения множества одинаковых копий некоего биологического объекта, в данном случае клеток [10, 12].

МА однородны по всем показателям, в частности по специфичности. В искусственных условиях МА продуцируются клетками гибридом. Гибридома, или гибридная клетка, образуется при слиянии опухолевой (миеломной) клетки с нормальным лимфоцитом. Полученная в результате слияния гибридная клетка имеет часть хромосом (а значит и свойств) нормального лимфоцита – синтез антител и какую-то часть от опухолевой клетки – способность к неограниченному делению митозом. Неограниченно делящиеся клетки клонируются, т.е. их рассаживают по одной в каждую отдельную посуду и получают клоны клеток – гибридомы.

В результате были разработаны гибридные способы получения МА к широчайшему спектру маркерных молекул мембран КИС, характеризующим популяции и субпопуляции последних. Кроме того, методы с использованием МА позволили выявлять даже не-

значительное содержание иммунологически активных молекул в крови – третий этап анализа КИС и их продуктов.

В настоящее время создан огромный набор МА практически ко всем значимым эпитопам. МА широко используются как в иммунодиагностике, так и в иммунотерапии, а также в научно - исследовательских целях.

Методы анализа КИС и их продуктов делятся на три группы:

А. Методы, позволяющие дать качественно-количественную характеристику клеток.

Б. Методы, определяющие функциональную активность клетки.

В. Нагрузочные тесты.

Для качественно-количественного анализа КИС сегодня применяют два методических подхода: 1 – тесты розеткообразования и 2 – методы с использованием МА. Оба подхода основаны на выявлении популяции и субпопуляции КИС по рецепторам и антигенам на их поверхности.

Методы розеткообразования используют в качестве индикаторов корпускулярные частицы, в частности эритроциты животных. Они основаны на феномене прилипания к поверхности КИС корпускулярных частиц с образованием фигур, получивших название розеток. Розетки образуют не только лимфоциты, но и другие клетки КИС [4,5,10].

Эти методы используются в клинической иммунодиагностике с начала 70-х годов XX века и по сей день. Например, для выявления Т-лимфоцитов используются ЭБ, рецептором к ЭБ на Т-клетках является СД-2 молекула [16]. В-клетки образуют розетки с эритроцитами мышей и с ЭБ, нагруженными антителами против них и комплементом – ЕАС – РОК [4]. Методы розеткообразования являются наиболее простыми, доступными и относительно дешевыми, т.к. не требуют дорогостоящего оборудования (проточный цитофлюориметр), а результаты подсчитываются с помощью светового микроскопа. Конечно же, он менее точен, чем методы с использованием МА, но для основных целей практической клинической иммунологии точность результатов метода розеткообразования, несомненно, достаточна. Помимо количественного определения КИС, метод розеткообразования является и показателем функциональной активности клеток, в частности активации ЦАМФ [5].

Методы определения популяции и субпопуляции КИС с использованием МА делятся на: а) метод мембранной иммунофлюоресценции на проточных цитофлюорометрах; б) визуальный стрептавидин – биотинный метод; в) метод магнитного выделения клеток с использованием парамагнитных частиц, конъюгированных с МА; г) метод специфического цитолиза лимфоцитов [4].

Вопрос цитофлюорометрического анализа КИС

(проточная цитофлюорометрия) удалось решить после появления рынка МА к разнообразным дифференцировочным антигенам (маркерным молекулам) мембран клеток, характеризующим популяции последних.

В основу проточной цитофлюорометрии положена иммунофлюоресценция.

Для этого необходимо иметь МА, меченные флюорохромом, и проточный цитофлюорометр.

1. В настоящее время МА для определения популяции и субпопуляций КИС человека производят и продают многие зарубежные фирмы. Флюорохромы – это вещества, которые поглощают падающий свет определенной длины волны и излучают поглощенную энергию в виде света большой длины волны. В основном МА метят флюоресцин изотиоцианатом, фикоэритрином, перидином, родамином. Все вещества флюоресцируют под действием света одной длины волны – 488 нм, причем первый излучает зеленый, второй – оранжевый, а третий и четвертый – красный свет. Использование 3 флюорохромов позволяет одновременно определять 3 разных поверхностных антигена [1, 6].

2. Проточный цитофлюорометр (лазерный сортер) – прибор, работающий на лазерной регистрации флюоресцирующих клеток, обработанных МА, которые мечены флюоресцирующим агентом при их протекании по капиллярному каналу прибора. При попадании клетки в луч лазера с помощью детекторов определяются размеры, гранулярность каждой клетки, а также цвет флуоресценции, соответствующий разным поверхностным маркерам [1]. В клинике проточная лазерная цитофлюорометрия применяется:

- для определения содержания лимфоцитов СД 4 при ВИЧ-инфекции,
- как метод диагностики гемобластозов,
- для определения активированных лимфоцитов, а значит и определения адекватности активации ИС,
- для диагностики иммунодефицитов,
- для определения активации апоптоза нейтрофилов и лимфоцитов – показателя иммуносупрессии [3, 6, 14].

Для фенотипирования лимфоцитов в клинике в последние годы часто используют также метод иммуномагнитной сепарации клеток. Метод основан на применении парамагнитных полистирольных микрочастиц, покрытых МА к тем или иным антигенам клеточной поверхности, например к СД 3, СД 4, СД 19 [17].

В настоящее время в иммунологических лабораториях для фенотипирования лимфоцитов наиболее широко используют цитофлюорометрический анализ с проточным цитофлюорометром и МА, а методы розеткообразования – в тех клинико - иммунологических лабораториях, которые не имеют проточных цитоф-

люорометров [5].

Существует большое разнообразие методов, позволяющих исследовать различные функции КИС. Однако функциональное тестирование КИС представляет большие трудности, т.к. большинству из них свойственна необходимость культивирования клеток в стерильных условиях.

Приведем наиболее важные тесты оценки функциональной активности КИС.

1. Определение уровня Ig основных классов – А, М, G – в сыворотке крови и секретах. Ig – это гликопротеиды, секретируемые плазматическими клетками после антигенной стимуляции. Для определения их концентрации чаще всего применяют простую радиальную иммунодиффузию по Манчини с использованием поликлональных антител [18] и нефелометрию [5, 6].

2. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) основана на феномене активации лимфоцитов под влиянием стимулов (митогенов, или антигенов, или аллогенных лимфоцитов) с последующей трансформацией их в бласты – большие делящиеся клетки. Эта реакция определяет пролиферативный потенциал изучаемых клеток. Пролиферативную активность лимфоцитов оценивают по интенсивности синтеза ДНК в ответ на стимуляцию. Интенсивность синтеза ДНК оценивают радиометрически по включению в нее меченных радиоактивным изотопом нуклеозидов, например НЗ - тимидина.

Метод РБТЛ достаточно распространен в лабораториях клиник медицинских институтов, но в практике широкому его распространению препятствуют необходимость стерильной работы и дорогого оборудования (сцинтилляционного счетчика).

Иногда клеточную пролиферацию оценивают другим методом без применения радионуклидов – МТТ-тест, основанный на изменении цвета, связывающегося с живыми клетками красителя – бромид 3 - / 4,5 диметилтиазол – 2 - ИЛ / - 2,5 дифенил - 2 - тетразолия – из синего в желтый [4, 5, 7, 8].

3. Кожные пробы позволяют оценить способность Т-лимфоцитов вызывать аллергическую реакцию замедленного типа при в/к введении антигена. Классическим примером является реакция Пирке.

4. Реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) оценивает гиперчувствительность замедленного типа в системе *in vitro*, т.е. определяет сенситизацию клеток человека к различным аллергенам, антигенам *in vitro*.

5. Исследования цитокинов. Активированные КИС вырабатывают цитокины. Продукцию цитокинов, вырабатываемых преимущественно лимфоцитами, стимулируют Т - клеточные митогены (ФГА, Кон. А), а продукцию цитокинов, которые синтезируются моноцитами, – микробные полисахариды (МПС). Для определения содержания цитокинов в большинстве случа-

ев используют готовые наборы для РИА и ИФА. К сожалению, такие наборы пока довольно дороги.

Методы исследования уровня цитокинов с использованием цитокинзависимых или цитокинчувствительных клеточных линий в практической медицине не применяются из-за громоздкости.

6. Наиболее доступным объектом для оценки функционального состояния фагоцитов являются нейтрофилы крови. Способность к фагоцитозу чужеродных частиц является основной функциональной характеристикой нейтрофилов. Хотя метод определения фагоцитоза с помощью микроскопического подсчета фагоцитирующих клеток и фагоцитированных объектов – рутинный, его используют уже свыше 100 лет, однако до сих пор не удалось избавиться от нестабильности получаемых результатов, т.к. захват частиц является результатом взаимодействия множества факторов, которые трудно учесть. В последние годы стали разрабатывать модификации метода, позволяющие стандартизировать и автоматизировать регистрацию его результатов. К таким модификациям относится фагоцитоз частиц латекса, меченных флюорохромом, результаты же при этом оцениваются цитофлюорометрически.

7. Методы оценки метаболического взрыва нейтрофилов – продукция свободных радикалов кислорода.

При поглощении и переваривании чужеродных частиц (при активации нейтрофилов) в нейтрофилах возрастает интенсивность метаболических процессов, в частности увеличивается продукция свободных радикалов кислорода. Последнюю можно оценить с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) и хемилюминесценции.

Суть НСТ-теста состоит в том, что растворенный нитросиний тетразолий, поглощенный нейтрофилом, под влиянием активных форм кислорода в клетке превращается в нерастворимые темно-синие гранулы (формазан).

В основе метода хемилюминесценции лежит определение уровня свечения нейтрофилов в процессе метаболического взрыва в результате их стимуляции, усиленное добавлением люминола [5]. В настоящее время зарубежными фирмами выпускаются приборы и наборы реактивов для определения хемилюминесценции.

8. Исследование системы комплемента. Количественное определение компонентов комплемента (чаще С3 и С4) проводят с помощью простой радиальной иммунодиффузии, нефелометрии и ИФА с использованием МА.

Общую гемолитическую активность комплемента определяют в гемолитической системе, включающей ЭБ и специфические антиэритроцитарные антитела.

Исследование же активности отдельных компонентов комплемента в сыворотке проводится только в

специализированных лабораториях.

9. Методы определения антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности лимфоцитов и активности натуральных киллеров *in vitro* с использованием клеток-мишеней (как сенсibilизированных антителами, так и чужеродных) требуют сложной аппаратуры и условий работы с изотопами, поэтому применяются преимущественно в специализированных лабораториях.

10. Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

Поскольку результаты определения ЦИК часто бывают противоречивы, а значит малоинформативны, в настоящее время это исследование проводится все реже.

11. Методы, основанные на реакции высвобождения гистамина тучными клетками, трудоемки и применяются редко [9, 13].

12. Определение общего уровня Ig E обычно проводят с помощью РИА и ИФА, поскольку низкое содержание этого Ig не позволяет использовать те методы, которые применяются для определения Ig G, Ig A и Ig M [9, 13].

13. Определение специфических Ig E проводят также с помощью РИА и ИФА [9, 13].

14. Тесты повреждения нейтрофилов для оценки иммуносупрессии. Наличие в организме эндогенной интоксикации приводит к развитию иммуносупрессии, т.е. угнетению ИС. Уровень иммуносупрессии определяют двумя методами: а) морфологический метод выявления дегенерации нейтрофилов; для выявления дегенеративных изменений в нейтрофилах требуется лишь качественная окраска мазка крови. Признаками дегенеративных изменений являются: пикноз, фрагментация и вакуолизация ядра, а также разрыв, токсогенная зернистость, вакуолизация цитоплазмы; б) выявление экспрессии Fas - рецепторов на нейтрофилах. Показано, что различные микроорганизмы, их экзо- и эндотоксины активируют апоптоз нейтрофилов. А значит оценить уровень эндогенной интоксикации организма можно на основании определения экспрессии молекул апоптоза нейтрофилов. Для осуществления этого метода используют МА к антигену CD 95. Результаты оценивают либо с помощью проточного цитофлюорометра, либо визуальным стрептавидин-биотиновым методом [5].

Каждый используемый метод выявляет рецепторы или антигены в том случае, если их количество выше определенного порога, составляющего предел чувствительности этого метода, и факт их невыявления во все не говорит о том, что их нет вообще. Обнаружить подобные маркеры возможно лишь при определенных изменениях условий постановки реакций или определенным воздействием на клетки, приводящим к их активации. Так, в процессе развития методов клинической иммунологии определилась необходимость осу-

ществления иммунологических клинических методов в нескольких вариантах их постановки: например, в измененном режиме или в присутствии различных веществ эти методы были названы "нагрузочными тестами" (НТ) [5].

Постановка НТ дает возможность выявить преимущественно те или иные популяции и субпопуляции КИС, оценить функциональное состояние разных субпопуляций КИС и изменения взаимосвязей между всеми КИС, определяя различные индексы этих соотношений.

Различают 3 варианта НТ:

- тесты, основанные на изменении одного или нескольких параметров,
- использование клеточных тестов в качестве модели для испытания сыворотки крови и других гуморальных факторов,
- определение чувствительности клеток к препаратам.

В практической иммунологии широкое распространение получил третий вариант НТ.

Схема постановки НТ следующая: клетки – дозированное воздействие – клетки после нагрузки – тестирование в реакции – результат. В качестве дозированного воздействия обычно используют физиологические дозы различных препаратов, а в качестве иммунных реакций – розеткообразование (чаще всего), фагоцитоз, РБТЛ, НСТ - тест [5]. Например, субпопуляции Т-лимфоцитов выявляют в пробах с теофилином, гистамином, с иммуноглобулинами различных классов [4].

III. Молекулярно-биологические методы – методы, использующие принципы молекулярной биологии. Самые современные методы в иммунологии – это методы молекулярной биологии и особенно молекулярной генетики, в частности методы ДНК, РНК-зондов и полимеразная цепная реакция (ПЦР) [3, 10, 14]. При помощи молекулярно-генетического анализа иммунологических объектов и феноменов удается получить однозначные информации и однозначный анализ полученных результатов.

Основой молекулярных подходов в иммунологии является клонирование генов, их перенос и направленное выключение. Возможность развития методов молекулярного клонирования – получение чистого клона гена и вслед за ним чистого клона молекул белка, кодируемого этим геном, – появилась, с одной стороны, после развития методов молекулярной биологии и биохимии нуклеиновых кислот, позволяющих определять первичную последовательность нуклеотидов, с другой стороны, после того как научились искусственно синтезировать отрезки ДНК (20 – 30 нуклеотидов), – олигонуклеотиды. Последние используют в качестве затравки – праймера – для синтеза длинных молекул ДНК. Основываясь на этом, в 1983 году был

описан метод ПЦР – метод получения копий искомого гена (в среднем примерно один миллион) [12].

Ярким примером уже реализованного использования этого метода в иммунологии в последние 15 лет является генотипирование молекул HLA (особенно 2-го класса), выявление генетического материала инфекционного возбудителя.

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод: для более четкого детального анализа характера и течения воспалительного процесса необходимо дополнить общий анализ крови определением уточняющих иммунологических показателей [5].

Традиционно методы клинико-иммунологических исследований делят на методы оценки естественного, клеточного и гуморального звеньев иммунитета. В зависимости от степени глубины иммунных отклонений различают несколько уровней иммунологического обследования – от ориентировочного 1-го до более высоких уровней [2, 11, 14].

В последнее десятилетие в клинике принято использовать следующий план иммуно-лабораторного обследования:

1. Общий анализ крови, СОЭ, С-реактивный белок.
2. Оценка гуморального звена иммунитета:
 - а) количество В - лимфоцитов,
 - б) уровень сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G и секреторного Ig А.
3. Оценка клеточного звена иммунитета:
 - а) абсолютное число лимфоцитов,
 - б) количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов; соотношение CD 4/ CD 8 клеток,
 - в) кожные тесты с recall - антигенами (например, туберкулин, стрептококк),
 - г) пролиферативная активность Т-лимфоцитов в

ответ на стимуляцию митогеном или антигеном, д) оценка цитотоксичности.

4. Оценка системы фагоцитов:
 - а) количество фагоцитирующих нейтрофилов и моноцитов,
 - б) активность фагоцитоза,
 - в) кислородзависимый метаболизм (метаболическая активность) по НСТ-тесту,
 - г) исследование молекул адгезии.
5. Оценка системы комплемента:
 - а) определение количества С 3,
 - б) определение количества С 4,
 - в) определение гемолитической активности комплемента.

При необходимости определяют:

1. Количество и функцию естественных киллеров.
2. HLA - фенотип.
3. Продукцию цитокинов.
4. Наличие специфических аутоантител.
5. Наличие специфической клеточной сенситизации.
6. Наличие Т- и В- клеток с признаками активации (DR, CD 25, CD 71).
7. Хемотаксис нейтрофилов.
8. Определение общего уровня Ig E.
9. Определение специфических Ig E.
10. Определение циркулирующих иммунных комплексов.
11. Методы, основанные на реакции высвобождения гистамина тучными клетками [2].

Следует отметить, однако, что спектр иммунологического обследования определяется возможностями иммунологической лаборатории данного лечебного учреждения.

Поступила 23.06.04

Իմունաբանության մեջ հետազոտման մեթոդները վերջին երկու տասնամյակների ընթացքում

Լ.Ա. Կժոյան, Ս.Ս. Համբարյան, Ս.Ս. Հարությունյան, Ա.Վ. Հակոբյան, Ա.Ռ. Գաբրիելյան, Ա.Ս. Զաքարյան

Հոդվածում արծածված են կլինիկայում վերջին երկու տասնամյակներում օգտագործվող իմունաբանական մեթոդների սկզբունքները:

Լուսաբանված են այսօր պրակտիկ բժշկության մեջ կիրառվող իմունաբանությունում հիմնական մոտեցումները, որոնք բաժանվում են 3 խմբերի.

1. շնաբանական մեթոդներ, որոնք հիմնված են հակաձիմների և հակամարմինների փոխազդեցության վրա,
2. բջջային մեթոդներ, որոնք իրենցից ներկայաց-

նում են իմունային համակարգի բջջերի և նրանց ածանցյալների վերլուծություն,

3. մոլեկուլյար-կենսաբանական մեթոդներ, որոնք պարունակում են իմունաբանության մեջ կիրառվող մոլեկուլյար կենսաբանության սկզբունքները՝ գենների կոմպլոքում, նրանց տեղափոխում և նպատակալաց անջատում:

Methods of research in immunology in the last two decades

L.A.Ktsoyan, S.S.Gambarov, S.S.Haroutyunian, A.V.Hakobyan, A.R.Gabrielyan, A.S.Zakaryan

In the article the principles of the immunological methods used in clinical practice during the last two decades are described and analyzed.

It is shown that today in applied medicine the basic approaches of immunodiagnosics are distributed into 3 main groups:

1. serological methods-based on interaction of an antigen with an antibody,

2. cellular methods – analysis of cells of immune system and their products.
3. molecular-biological methods, based on the principles of molecular biology in immunology: cloneing cells, genes, genes carrying, and directed de-energizing.

Литература

1. Домбаева С.В., Мазуров Д.В., Климова С.В., Бахус Г.О., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Аллергология и иммунология, 2002, 3, 3, с. 371.
2. Дранник Г.Н. В кн.: Клиническая иммунология и аллергология. М., 2003.
3. Зарецкая Ю.М. В кн.: Иммунология и иммуногенетика человека. М., 2002.
4. Караулов А.В. В кн.: Клиническая иммунология. М., 1999.
5. Лебедев К.А., Понякина И.Д. В кн.: Иммунная недостаточность: выявление и лечение. М., 2003.
6. Лолор-мл.Г., Фишер Т., Адельман Д. В кн.: Клиническая иммунология и аллергология. М., 2000.
7. Новиков Д.К., Генералов И.И., Железняк Н.В., Окулич В.К. В кн.: Медицинская иммунология. Витебск, 1998.
8. Новиков А.К., Новикова В.И. В кн.: Клеточные методы иммунодиагностики. Беларусь, 1979.
9. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артамасова А.В. В кн.: Аллергические заболевания. М., 1999.
10. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. В кн.: Иммунология. М., 2000.
11. Соколова Е.И. В кн.: Клиническая иммунология. Руководство для врачей. М., 1998.
12. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. В кн.: Иммунология. М., 2000.
13. Хаитов Р.М. В кн.: Клиническая аллергология. М., 2002.
14. Ярилин А.А. В кн.: Основы иммунологии. М., 1999.
15. Boyum A. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 21, 97, p. 77.
16. Jondal M., Holm Q., Wigzell H. J. Exp. Med., 1972, 136, p. 207.
17. Lea T., Varidal F., Davies C., Ugelstad I. Scand. J. Immunol., 1985, 22, p. 207.
18. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.E. Immunochemistry, 1965, 2, p. 35.