

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

РАЗРАБОТКА ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИХ IgE- И IgG-АНТИТЕЛ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МИКОЗОВ (ИФТС-МИКО-IgE-IgG-AT)

Батурин В.А., Тельбух В.П., Малашенкова Т.Е.

Ставропольская государственная медицинская академия,
Центр клинической фармакологии и фармакотерапии,
г. Ставрополь, Россия

Проблема диагностики и лечения микозов в настоящее время приобретает особую актуальность в связи с целым рядом причин, одной из которых является высокая распространенность грибковых заболеваний, развивающихся на фоне иммунодефицита и чаще всего встречающихся в группах риска: у больных с эндокринными нарушениями, хроническими процессами в легких, бронхиальной астмой, туберкулезом, онко- и гематологическими заболеваниями. Общее количество грибковых заболеваний за последнее десятилетие выросло более чем в 2 раза. Одной из глобальных причин роста числа микозов считается ухудшение экологических условий, ведущих к изменению иммунореактивности организма. Клиническая картина микотических заболеваний очень разнообразна, поэтому важная роль принадлежит специфическим методам диагностики. Наиболее предпочтительными являются иммуноферментные (ИФА) *in vitro* методы, обладающие высокой специфичностью, чувствительностью, лишены каких-либо ограничений.

Целью настоящей работы является разработка отечественной иммуноферментной тест-системы для диагностики микозов. Мы поставили задачу сконструировать набор реагентов ИФТС-мико-IgE-IgG-AT, позволяющий выявлять аллергенспецифические IgE и IgG-антитела одновременно. В основу разработанной нами технологии ИФТС заложен гетерогенный твердофазный метод ИФА, вариант неконкурентного непрямого сэндвич-метода, принцип которого заключается в выявлении в сыворотке больного специфических антител классов IgE и IgG, которые аффинно взаимодействуют с соответствующими грибковыми аллергенами, иммобилизованными на твердой фазе. Присоединившиеся к твердой фазе специфические антитела определяли с помощью специфических антиглобулиновых конъюгатов, которые связываются с иммунным комплексом, фиксированном на твердой фазе с образованием комплекса, меченого ферментом пероксидазой. После отмывания от не связавшихся конъюгатов в лунки добавляется субстратный раствор с хромогеном, переходящим под действием пероксидазы в окрашенную форму голубого цвета. Реакция инактивируется стоп-реагентом, и интенсивность полученного желтого окрашивания учитывается спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Степень окрашивания пропорциональна уровню исследуемых специфических антител.

В качестве твердой фазы использовали полистироловые 96-луночные стрипированные планшеты фир-

мы «NUNC» с сорбированными на поверхности лунок грибковыми аллергенами различных специфичностей. Для выявления IgE- и IgG-антител использовали конъюгаты моноклональных антител против IgE и IgG. Референс-сыворотки изготовлены на основе человеческих сывороток. Изучена стабильность в процессе хранения иммунореагентов, входящих в состав «ИФТС-мико-IgE-IgG-AT». Полученные данные свидетельствовали о высокой стабильности иммунореагентов в процессе хранения трех и шести месяцев, при температуре 4°C.

С целью изучения эффективности, разработанной «ИФТС-мико-IgE-IgG-AT» в выявлении грибковой сенсибилизации, проведены клинико-лабораторные испытания. Анализу подвергнуты 2 группы больных. В первую группу (51 человек) вошли больные с бронхиальной астмой (БА) и хроническим обструктивным бронхитом (ХОБ). Вторую группу составили больные с различными аллергическими заболеваниями (84 человека). Сенсибилизация к грибковым аллергенам проявилась как немедленными IgE-опосредованными реакциями, так и клеточно-опосредованными IgG-зависимыми реакциями. Обнаружены аллергенспецифические IgE-антитела в первой группе больных с БА и ХОБ в 30-86% образцов и в 18-45% – во второй группе с аллергическими заболеваниями. IgG-антитела выявлены в первой группе – в 57-95%, во второй группе – в 42-72% случаев. Полученные данные показывают, что при сенсибилизации к грибковым аллергенам обнаруживаются более высокие уровни антител класса IgG – в 76 и 57% случаев (средние значения) у больных первой и второй группы в сравнении с IgE-антителами – в 58-30% случаев соответственно.

Разработана отечественная иммуноферментная тест-система «ИФТС-мико-IgE-IgG-AT», предназначенная для определения уровней аллергенспецифических IgE- и IgG – антител в сыворотке крови человека *in vitro* при выявлении причинно-значимых грибковых аллергенов в диагностике микозов и для контроля специфической иммунотерапии в клинической аллергологии.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В МОДЕЛИ *EX VIVO*

Вараксин Н.А., Рябичева Т.Г., Дружинина Ю.Г., Рыжикова С.Л.

ЗАО «Вектор-Бест», п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия

Для исследования цитокинового статуса пациента не всегда достаточно определения концентрации цитокинов в сыворотке или плазме крови, необходимо оценить и потенциальную способность клеток крови к продукции цитокинов. Такую оценку можно провести путем определения спонтанной и индуцированной продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови. Однако чтобы использовать общепринятые методики, необходимо доставить пациента в иммунологическую лабораторию

рию, так как время между забором крови и началом приготовления препарата не должно превышать 15-20 мин.

Цель работы: разработка альтернативной методики изучения продукции цитокинов клетками цельной крови, позволяющей проводить забор крови у пациента в условиях процедурного кабинета, а сам анализ проводить в специализированной иммунологической лаборатории.

Материалы и методы. Для проведения такого анализа необходимо отобранную утром натощак в условиях медицинского учреждения периферическую кровь сразу внести в соотношении 1:4 в заранее приготовленный закрытый резиновой пробкой и завальцованный алюминиевым колпачком флакон, содержащий стерильную поддерживающую среду (DMEM, MEM, RPMI), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). При поддержании температуры 30-37°C время между забором крови и началом приготовления препарата составивать до 3 часов. Для исследования спонтанной продукции цитокинов использовать полученную разведенную кровь, а для индуцированной продукции – разведенную кровь с добавлением определенного количества митогена, например, фитогемагглютинин (ФГА) – 10 мкг/мл. Приготовленные препараты крови разлить по центрифужным пробиркам, не допуская образования воздушной прослойки под крышечкой пробирки. Препараты инкубировать при 37°C в течение суток, после окончания инкубации клетки крови осадить центрифугированием при 3000 г в течение 10 мин. Отобранную надосадочную жидкость аликвотировать и заморозить (-40°C) до проведения анализа. Концентрацию цитокинов в пробах определяли с помощью соответствующих наборов для иммуноферментного анализа производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Результаты спонтанной и ФГА-стимулированной продукции цитокинов, полученные по описанной методике, согласуются, с литературными данными полученными в культуре мононуклеарных клеток. Для здоровых доноров спонтанная продукция ИЛ-8 составляет от 200 до 2900 пг/мл; ИНФ γ – от 0 до 5 пг/мл; ФНО α – от 0 до 46 пг/мл; ИЛ-1 β – от 6 до 250 пг/мл; ИЛ-1РА – от 47 до 1946 пг/мл; ИЛ-6 – от 8 до 365 пг/мл; ИЛ-4 – от 0 до 11 пг/мл; ИНФ α – от 0 до 6 пг/мл. ФГА-индуцированная продукция цитокинов в супернатантах составляет: ИЛ-8 – от 1033 до 69000 пг/мл; ИНФ γ – от 348 до 1550 пг/мл; ФНО α – от 271 до 1690 пг/мл; ИЛ-1 β – от 270 до 930 пг/мл; ИЛ-1РА – от 2920 до 5030 пг/мл; ИЛ-6 – от 9600 до 29500 пг/мл; ИЛ-4 – от 0 до 28 пг/мл; ИНФ α – от 0 до 6 пг/мл. Коэффициент вариации для выборки из 8-15 измерений (между флаконами) составил от 4 до 32%.

Таким образом, по описанной методике можно изучать цитокиновый статус пациентов без доставки последних в иммунологическую лабораторию.

НОВАЯ МЕДИЦИНСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ TORCH-КОМПЛЕКСА

Дробченко С.Н., Ткаченко С.Б., Савичева А.М., Шипицына Е.В., Шалепов К.В.

РМАПО, ГУ НИИ АГ им. Д. Отта РАМН, ООО «Микробиомед», ЗАО «Биоград»

Новая медицинская технология: «Быстрые простые методы в диагностике заболеваний TORCH-комплекса»

(рег. № ФС-2006/002) была зарегистрирована Минздравсоцразвития 7 февраля 2006 года. В TORCH-комплекс включают: Т – токсоплазмоз, О – другие инфекции, R – краснуху, С – цитомегаловирусную инфекцию, Н – герпес. Недавно ВОЗ расширила данный список, добавив в группу «другие инфекции» ВИЧ, гепатиты В и С, хламидиоз.

Новизна медицинской технологии заключается в достоверной быстрой диагностике TORCH-инфекций, позволяющей дифференцировать различные фазы заболеваний.

Данная технология основана на применении унифицированной схемы анализа сыворотки, плазмы или цельной крови пациента для обнаружения маркеров широкого спектра врожденных инфекций. Для ускорения лабораторных исследований и упрощения технических средств были выбраны высокотехнологичные ИФА БПТ ИммуноКомб, позволяющие определять титр антител G, M, A к соответствующему возбудителю инфекции. БПТ ИммуноКомб сочетают достоинства классического ИФА – высокий уровень специфичности и чувствительности с простотой и быстротой постановки анализа. Это обуславливает их применение на любом этапе оказания медицинской помощи, начиная с первичного звена здравоохранения. Тесты сконструированы на основе высокоочищенных видоспецифических антигенов, благодаря чему удается избежать перекрестных реакций при обнаружении антител к соответствующему возбудителю и диагностировать заболевания на ранней стадии. Ранняя диагностика инфекции позволяет назначить своевременное адекватное лечение. Методика не требует дополнительного оборудования, БПТ ИммуноКомб содержит все необходимые для проведения анализа реагенты. Набор рассчитан на любое количество определений от 1 до 36. Время анализа – 40 минут. ИммуноКомб позволяет проводить анализ на различные заболевания по единому плану, варьируя только количество исследуемого образца, длительность и температуру инкубации в зависимости от вида инфекции. Результат учитывается визуально или автоматически. Уровень видоспецифических антител в каждом образце оценивается количественно или с помощью цветной шкалы КомбСкейл, входящей в состав набора, или автоматически на приборе КомбСкан. В тесте предусмотрен внутренний контроль, подтверждающий достоверность проведенного анализа.

При скрининге на TORCH-инфекции беременных женщин во время первого пренатального визита анализируется кровь с помощью динамического ИФА БПТ ИммуноКомб одновременно на присутствие антител класса IgM, IgA, IgG к соответствующему возбудителю.

Для уточнения стадии заболевания следует анализировать парные сыворотки. Наличие низких уровней IgG к возбудителю в сыворотке человека может свидетельствовать о ранее перенесенной инфекции, проведенной терапии антибиотиками (антитела в крови могут сохраняться до 3-6 месяцев после излечения). Существенное нарастание титра антител класса G в парных сыворотках (в 4-8 раз от первоначального уровня) свидетельствует об активной фазе инфекции. В этом случае необходимо параллельное исследование на IgM или на IgA в случае хламидийной инфекции. Высокий уровень антител класса M или A подтвердит активное течение инфекции или рецидив заболевания. Чтобы исключить инфекцию или

своевременно начать лечение новорожденных от матерей, инфицированных во время беременности, целесообразно обследовать их с помощью ИФА БПТ ИммуноКомб. Если мать перенесла заболевания TORCH-комплекса в период беременности, но плод не был инфицирован, то материнские IgG-антитела передаются плоду уже с 12-16 недели, тогда как материнские IgM-антитела обычно через плаценту не проходят. В тех случаях, когда произошло внутриутробное инфицирование, у зараженного плода наряду с появлением материнских IgG-антител на 16-24 неделях развития начинают вырабатываться собственные вирусспецифические IgM-антитела. Таким образом, обнаружение специфических IgM-антител у новорожденных позволяет диагностировать внутриутробное инфицирование. Пассивные материнские IgG-антитела, переданные плоду, исчезают в течение 6-10 месяцев после рождения. Образование собственных IgG-антител у внутриутробно инфицированного ребенка обычно начинается со второй половины первого года жизни и продолжается до 3-4 лет. Поэтому последовательный контроль уровня антител IgG-класса у младенца поможет отличить внутриутробную краснуху (постоянный уровень, плато) от послеродовой краснухи (увеличение титра).

Мировой опыт скрининга беременных и новорожденных на TORCH-комплекс диктует необходимость разработки масштабных целевых программ, направленных на улучшение репродуктивного здоровья женщин и рождение здорового поколения, а, следовательно, положительно влияющих на демографическую ситуацию в стране.

Такой унифицированный подход к диагностике различных инфекций намного упрощает подготовку персонала и работу в лаборатории в целом. Данная технология может использоваться во всех без исключения лечебно-профилактических учреждениях стационарного и амбулаторно-поликлинического типа, включая первичное звено здравоохранения, выездные кабинеты.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ФЛЮОРОФОРА Imd-306 ДЛЯ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Захарова Е.Н.^{1,2}, Заботина Т.Н.¹, Блохин Д.Ю.^{1,2}, Иванов П.К.^{1,2}

¹ ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

² НПЦ МедБиоСпектр, Москва

С целью иммунологического фенотипирования клеток крови и костного мозга используют проточную цитофлуориметрию (ПЦ) и иммуноцитохимические методы. Теоретические возможности ПЦ на сегодняшний день поддержаны многопрофильным программным обеспечением проточных цитометров, а также широким выбором флуоресцентных зондов. В современных моделях цитофлуориметров используют возбуждение флуоресценции лазерным пучком, имеющим фиксированные спектральные характеристики. Наиболее часто применяют аргоновый (488 нм), гелий-неоновый (633,5 нм) либо диодный (635-650 нм) лазеры, в связи с чем в качестве основной характеристики флуорофоров является их способность к возбуждению флуоресценции монохроматическим

светом конструктивно заданной длины волны с эмиссией вторичных квантов в узких спектральных диапазонах (FL1 = 520-530 нм, FL2 = 575-595 нм, FL3 = 610-630 нм, FL4 = 650-670 нм).

Наряду с традиционными флуорофорами, такими как флуоресцеин изотиоцианат (FITC), Р-фикоэритрин (PE), аллофикоцианин (APC), в последние годы в проточной цитометрии используются и производные цианинового красителя Су3, который может связываться с антителами, авидином, ДНК и другими молекулами, содержащими группы первичных аминов. Эксклюзивным производителем этих флуорофоров является компания Amersham. В ИМБ им. В.А. Энгельгардта (Россия) синтезирована группа цианиновых флуорофоров, сходных по физико-химическим свойствам с Су3, в частности, соединение Imd-306.

Целью работы явилась оптимизация условий получения флуоресцентных зондов на основе Imd-306 и мышиных моноклональных антител (МКА) серии ICO для иммунофенотипирования лимфоцитов человека.

Материалы и методы. В работе использованы мышиные МКА (НПЦ МедБиоСпектр, Россия) к В- (CD20, клон ICO-180) и Т-клеточным (CD4, клон ICO-86; CD8, клон ICO-31) рецепторам лимфоцитов человека, сукцинимидный эфир цианинового красителя Imd-306. Для получения конъюгатов МКА инкубировали с сукцинимидным эфиром флуорофора в молярном соотношении от 1:2 (М:М) до 1:100 (М:М) в бикарбонатном буфере (рН 9,3) при +18-25°C в темноте в течение 30 мин. Условия инкубации были подобраны экспериментально. Очистку конъюгатов от несвязавшегося флуорофора проводили гель-хроматографией на колонке Sephadex G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером, рН 7,4. Плотность мечения рассчитывали по формуле:

$$[\text{dye}]/[\text{protein}] = 1,7 \cdot (A_{548}) / (A_{280} - (0,04 \cdot A_{548})), \text{ где: } [\text{dye}] = (A_{548}) / 129000;$$

$$[\text{protein}] = (A_{280} - (0,08 \cdot A_{548})) / 224000; A_{548} \text{ и } A_{280} - \text{оптические плотности конъюгатов, измеренные, соответственно, при 548 и 280 нм; } \epsilon_{\text{Imd-306}} = 129000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}; \epsilon_{\text{IgG}} = 224000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1};$$

При 280 нм поглощение Imd-306 составляет приблизительно 8% от поглощения при 548 нм. Полученные конъюгаты стабилизировали 1,0% раствором БСА с 0,1% азида натрия.

Специфическую активность конъюгатов оценивали в прямой РИФ с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) и регистрацией флуоресценции по каналу FL2 и FL3. Для сравнительной характеристики доли антиген-позитивных клеток в популяции (%) и медианы интенсивности флуоресценции (MFI) применяли коммерческие МКА к тем же антигенам, конъюгированные с FITC и PE (BD Pharmingen, Caltag).

Результаты. В результате проведенных исследований получены конъюгаты МКА и Imd-306 с различным соотношением краситель/белок(D/P). Показано, что оптимальным соотношением метки и иммуноглобулина для конъюгата CD20/Imd-306 является 5:1 (моль:моль), для конъюгатов CD4/Imd-306 и CD8/Imd-306 – в диапазоне 8-10:1 и 6-10:1 (моль:моль) соответственно. Для определения рабочей концентрации конъюгатов МКА/Imd-306, исследовали их активность в диапазоне исходных концентраций 0,5-100 мкг/мл. Оказалось, что для

конъюгатов CD4/Imd-306 и CD8/Imd-306 диапазон исходных рабочих концентраций составляет 2,5-10 мкг/мл, а для конъюгата CD20/Imd-306 — 5-20 мкг/мл. Однако наилучшие показатели доли антиген-позитивных клеток в популяции и медианы интенсивности флюоресценции были зарегистрированы в FI-2 канале флюоресценции, в то время как значения, полученные в FI-3 канале, не соответствовали таковым у коммерческих аналогов.

Таким образом, конъюгирование флюоресцентного красителя Imd-306 с МКА в оптимальных соотношениях не оказывало влияния на иммунохимические свойства последних, что позволяет рекомендовать к использованию синтезированные конъюгаты в диапазоне рабочих концентраций для цитометрического анализа клеточных популяций с анализом по FL-2 каналу флюоресценции.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ ОБ ОЦЕНКЕ ИММУННОГО СТАТУСА ЧЕЛОВЕКА, НОВЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПОДХОДЫ К ИХ РЕШЕНИЮ

Зурочка А.В., Хайдуков С.В.

*ГОУ ВПО Челябинская медицинская академия,
г. Челябинск, Россия*

*Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук, Москва, Россия*

В медицинской практике, помимо клинических признаков, лабораторное исследование иммунного статуса является одним из основных критериев оценки состояния иммунной системы организма человека.

В то же время так исторически сложилось, оценка иммунного статуса в иммунологических лабораториях проводится совершенно различными методами, что приводит зачастую к противоречивым данным при одной и той же патологии. Не говоря о том, что из одного и того же образца в разных лабораториях могут быть получены совершенно исключаящие друг друга результаты.

Оценка клеточного звена иммунной системы проводится различными методами в зависимости от инструментальной базы данного лечебного учреждения. В настоящее время для этих целей применяют метод розеткообразования, метод флюоресцентной микроскопии с использованием моноклональных антител и метод проточной цитометрии с использованием одно-, двух-, трех- и более параметровых систем (моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами, испускающими кванты света в разных областях спектра).

При сравнении результатов исследований, полученных различными методами, можно выявить следующую закономерность.

Во-первых, метод розеткообразования (который до сих пор имеет широкое распространение в иммунологических лабораториях больниц) и метод флюоресцентной микроскопии имеют очень высокий коэффициент погрешности, достигающий 30%, по сравнению с методом проточной цитометрии. Эта неточность связана как с методической погрешностью (например, достаточно сложно выделить чистую фракцию лимфоцитов, всегда остается 10-20% примеси моноцитов и гранулоцитов), так и с тем, что многие маркеры клеточной поверхнос-

ти могут экспрессироваться на различных популяциях клеток периферической крови. Ярким примером может служить CD8, который выявляется как на Т-клетках, так и на натуральных киллерах.

Во-вторых, субъективность учета полученных результатов. Слабо светящиеся клетки вообще могут выпасть из зоны анализа.

В-третьих, ограничение по времени учета (нужно считать не меньше 200 клеток, а при флюоресцентной микроскопии клетки под действием ультрафиолета быстро «выцветают»).

В-четвертых, недостаточная статистическая достоверность, поскольку 2 клетки составляют один процент, а в некоторых случаях важно бывает и полупроцентные изменения.

Розеткообразование лимфоцитов вообще нельзя отнести к методам оценки субпопуляций клеток, и он имеет право существовать только как исторический факт. То есть первые два методических подхода не годятся для практического применения.

Метод проточной цитометрии на сегодняшний день является «золотым стандартом» клинико-лабораторного исследования в иммунологии. Но появление двух-, трех-, четырех-, а в некоторых случаях и пяти-параметровых систем в настоящее время полностью перевернуло наши представления об иммунном статусе. Особенно в оценке значимости определения субпопуляций лимфоцитов.

Проточная цитометрия развеяла ряд устойчивых «мифов» иммунологии.

Первый «миф» — важность оценки процентного соотношения тех или иных субпопуляций. Сегодня более важным критерием является их количественная оценка.

Второй «миф» — оценка как самих субпопуляций, так и активационных рецепторов в однопараметровой системе, то есть используя только один краситель. С точки зрения современного подхода важно определение активации той или иной субпопуляции, а не активация лейкоцитов вообще. В свою очередь, однопараметровые системы допускается использовать только при анализе только пан-маркеров (таких как CD3, CD19 и т.д.) количество которых ограничено или при работе с гомогенными клеточными культурами.

Третий «миф» — клиническое и практическое значение оценки соотношения различных субпопуляций, например, CD4/CD8, CD25/CD95 и т.д.

Этот «миф» уже сегодня вызывает очень глубокие сомнения, так как даже субпопуляция CD4⁺-клеток очень разнородна. Это и Т-хелперы и Т-регуляторные клетки, причем часть клеток может быть активирована, а часть — нет, не говоря даже о том, что CD4 выявляется и на моноцитах. То же касается и CD8⁺-клеток, часть из них несет активационные рецепторы, часть нет.

Аналогичная система «мифов» существует и для оценки НК клеток, моноцитов и гранулоцитов. Появление многопараметровых систем выявило, что НК клетки также делятся на различные популяции (Т-НК и НК), В-клетки на В-1 и В-2 субпопуляции и так далее.

Перечень «мифов» можно продолжать еще долго, но уже этого перечня достаточно для понимания того, что должен сформироваться новый подход как к формированию протоколов фенотипирования, так и к трактовкам получаемых результатов иммунологического исследования.

По-видимому, по мере накопления нового фактического материала в современной иммунологии должна произойти определенная «переоценка ценностей». Очень важно не пропустить тот момент, когда новые факты, полученные при помощи современных методов исследований, изменят наши представления о функционировании иммунной системы и заставят нас разрабатывать совершенно новые подходы к трактовке полученных клинико-лабораторных результатов.

Первое, что должно сегодня быть определено, — это нормативные показатели для оценки иммунного статуса с использованием многопараметровых тест-систем с четким разделением субпопуляций лейкоцитов на активированные и неактивированные.

Второе — определить характер и направление изменений активности субпопуляций при типовых патологических процессах, при этом анализ должен быть углубленным и всесторонним, а не оценивать одну популяцию клеток, без учета изменений других субпопуляций и параметров иммунной системы.

Третье — выявить атипичные формы ответа иммунной системы при развитии патологии, особенно при хронических процессах.

Четвертое — учитывать фазность ответа иммунной системы, то есть иметь представление о динамике изменений характера ответа в различные периоды заболеваний.

Пятое — очень важно иметь возможность сопоставлять данные различных авторов, что требует стандартизации и унификации методов оценки иммунной системы.

Все поставленные задачи требуют объединения усилий различных исследователей в единую программу с единой идеологией обследования пациентов. Хотелось бы в дискуссии найти сторонников проведения таких исследований в масштабах регионов и страны в целом.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ИММУННОЙ СЕТИ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ИММУНОРЕГУЛЯЦИИ

Иванов В.В.

*Удмуртский Государственный Университет,
г. Ижевск, Россия*

Большой объем феноменологических исследований в клинической практике не позволяет сегодня понять механизмы патогенеза целого класса заболеваний, вызванных нарушением процессов иммунорегуляции. В то же время имеются многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о важной роли такого фактора, как иммунная сеть, в основе формирования которой лежат идиотип антиидиотипические взаимодействия.

Кроме экспериментальных исследований значительная часть работ посвящена исследованию антиидиотипических взаимодействий методами математического моделирования, нацеленными на раскрытие механизмов функционирования иммунной сети. Метод математического моделирования является единственным методом изучения недоступных нам непосредственно явлений макро- и микромира и эффективным способом находить общие принципы организации и функционирования сложных систем, каковой является иммунная сеть.

Нами разработана математическая модель организации иммунной сети, включающая в себя существенные

характеристики реального объекта, при этом из многообразия присутствующих в биологической системе элементов выбраны наиболее существенные для осуществления взаимодействий Идиотип—Антиидиотип и сгруппированы в функционально однородные формализуемые параметры.

Такая математическая модель описывает как типичные, так не типичные (наблюдаемые или экспериментально полученные) формы иммунореактивности. Исследование модели позволило описать и понять широкий класс иммунных реакций проявляющихся при разных патологиях: аутоиммунных реакциях, реакциях гиперчувствительности.

Таким образом, математическая модель отражает принципы организации иммунной сети и позволяет вскрыть механизмы регуляции в иммунной системе, в которых ведущая роль принадлежит идиотипическим взаимодействиям.

АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ И ЛИМФОЦИТАРНО-ТРОМБОЦИТАРНАЯ АДГЕЗИЯ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ УКСУСНОЙ КИСЛОТОЙ

Рущкина Е.А., Говорин А.В., Витковский Ю.А., Соколова Н.А., Солпов А.В., Бойко Е.В., Жеребцова С.В.

ГОУ ВПО Читинская Государственная Медицинская Академия Росздрава, г. Чита, Россия

Введение. При остром отравлении уксусной кислотой (ОУК) достаточно быстро развиваются нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, свертывания крови и фибринолиза, ведущие к развитию ДВС-синдрома. Многие ключевые механизмы этого синдрома остаются не изучены.

Цель и задачи: изучить агрегационную способность тромбоцитов (Тр) и феномен лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) у больных с ОУК.

Материалы и методы. Обследовано 43 пациента с ОУК: 25 пациентов со средней степенью и 18 пациентов с тяжелой степенью отравления. Средний возраст — 32,6±5,3. Контрольную группу составили 16 здоровых лиц. Пациентам исследовали спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию Тр с помощью лазерного анализатора «Биола» (модель LA230). В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в концентрации 10 мкг/мл и 2,5 мкг/мл. Подсчитывали число лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов (ЛТК) по методике Витковского Ю.А. (1999 г.) и количество Тр в периферической крови. Исследования проводили на 1-е, 5-е и 10-е сутки с момента отравления.

Результаты. При анализе показателей агрегации Тр установлено, что наиболее низкая агрегация Тр наблюдалась в 1-е сутки отравления у пациентов со средней и тяжелой степенью отравления. Так, показатель степени агрегации при добавлении АДФ в концентрации 10 мкг/мл составил 6,8±0,6 отн.ед. и 2,4±0,3 отн.ед. соответственно, что имело достоверное различие по отношению к контролю (8,9±0,5; $p < 0,05$, $p < 0,001$ соответственно). Сравнение указанных клинических групп между собой также имело достоверные изменения ($p < 0,001$). На 5-е сутки степень агрегации при добавлении высоких

доз АДФ у пациентов с отравлением средней и тяжелой степени составила $6,0 \pm 0,4$ отн.ед. и $3,8 \pm 0,6$ отн.ед. соответственно ($p < 0,01$). Также этот показатель был достоверно снижен в обеих группах в сравнении с контролем ($8,9 \pm 0,5$ отн.ед., $p < 0,001$). Подобные различия получены и при внесении малых доз АДФ в 1-е и 5-е сутки. На 10-е сутки показатели агрегации улучшались в обеих группах, однако при тяжелой степени отравления сохранялись признаки гипоагрегации Тр. При анализе ЛТА установлено, что увеличение количества ЛТК отмечалось у пациентов с ООУК тяжелой степени на протяжении всего периода наблюдения и составило $28,0 \pm 3,6\%$, $22,9 \pm 3,3\%$, $19,3 \pm 2,7\%$, что имело достоверные различия по сравнению с контролем ($12,3 \pm 3,6\%$; $p < 0,001$, $p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно). Установлено, что у больных с отравлением тяжелой степени на 1-е и 5-е сутки снижалось число Тр ($130 \pm 12,5 \times 10^9/\text{л}$ и $190,6 \pm 20,3 \times 10^9/\text{л}$ соответственно), а к 10-м суткам их количество восстанавливалось до нормального уровня. У пациентов с отравлением средней степени тяжести количество Тр сохранялось в пределах нормы на протяжении всего периода наблюдения.

Заключение. У больных с ООУК выявлены существенные изменения агрегационной функции Тр, выраженность которых зависит от степени тяжести отравления. Агрегационная функция Тр снижается независимо от их количества в периферической крови. При тяжелой степени отравления на фоне тромбоцитопении отмечается увеличение количества ЛТК в периферической крови, которое возрастает по мере уменьшения агрегационной функции Тр.

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ АЛЛОИММУНИЗАЦИИ У ДОНОРОВ ГЕМОКОМПОНЕНТОВ

Рыжкова Т.В., Софонова И.С., Касьянов А.Д., Чечёткин А.В.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Скрининг и идентификация антиэритроцитарных антител имеют важное клиническое значение для предупреждения развития посттрансфузионных осложнений и выявления изосенсибилизированных пациентов. Обязательное проведение этого предтрансфузионного теста внедрено в деятельность военно-лечебных учреждений (ВЛУ) с 1998 г.

Целью работы явилось изучение частоты аллоиммунизации к антигенам эритроцитов у доноров. Определение антител к антигенам эритроцитов производили в непрямой реакции Кумбса с помощью гелевой системы ScanGel.

Для скрининга антиэритроцитарных антител использовали карточки системы ScanGel – Кумбс анти-IgG, анти-IgG, C3d (АГС) и готовые реагенты СканСел I-II-III (стандартные эритроциты).

Было обследовано 5880 доноров крови и гемокомпонентов на станции переливания крови НИО крови и тканей НИЦ Военно-медицинской академии. В качестве контроля использовали сыворотку кадровых доноров гемокомпонентов.

В результате обследования антиэритроцитарные антитела были выявлены у 46 доноров. Из них 4,3% составляли женщины, 95,7% – мужчины. Анти-Келл антитела были

выявлены у 36,9% доноров, анти-Е антитела – у 21,74%, анти-Д антитела – у 10,9%, анти-С антитела – у 10,9%, анти-е антитела – у 4,37%, анти-с антитела – у 2,17% доноров. Антитела к антигенам других групповых систем эритроцитов (Kidd, Duffy, MNS, Lewis и др.) выявлены у 13,0% доноров. В контрольной группе антиэритроцитарные антитела не обнаружены.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИКУМЫ ДЛЯ УСКОРЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *S. DYPHTHERIAE*

Свиридов В.В., Гаврилова Н.Ф., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., Лукин Ю.В., Генералова А.Н., Бызова Н.А., Жердев А.В.

ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Эффективность лечебных и противоэпидемических мероприятий при инфекционных заболеваниях зависит от правильности и своевременности выявления возбудителя и оценки его свойств. Исследование посвящено разработке методов ускоренной дифференциации токсигенных штаммов дифтерийного микроба на основе выявления дифтерийного токсина (ДТ) в среде подрашивания возбудителя в реакции латекс-агглютинации (РЛА) и в иммунохроматографическом анализе (ИХА) на основе использования моноклональных антител (МкАт) к ДТ. Оценены специфичность, чувствительность и стабильность моноклональных диагностикумов.

Диагностикумы приготовлены на основе отобранных и охарактеризованных ранее МкАт к дифтерийному токсину ДТ-17 и ДТ-22, обладающих способностью нейтрализовать действие токсина *in vitro* в тесте микроцитотоксичности на культуре клеток яичника китайского хомячка (СНО), и МкАт ДТ-19, антитоксическими свойствами не обладающих. Препараты МкАт выделены из асцитной жидкости мышей путем аффинной хроматографии на антигенном сорбенте.

Для приготовления латексных диагностикумов использовали 10%-ную суспензию окрашенных кристаллическим фиолетовым полиакролеиновых латексных частиц размером 1,6 мкм. Микросферы (10%-ную суспензию) сенсибилизировали в течение 2 ч при комнатной температуре смесью МкАт в разных сочетаниях, взятых в равных концентрациях в диапазоне 20–200 мкг/мл; непрореагировавшие альдегидные группы блокировали раствором овальбумина в боратном буфере. Затем частицы отмывали центрифугированием и хранили в том же буфере при 4°C. О сорбции МкАт на латексе судили по агглютинации диагностикумов кроличьей антисывороткой к Ig мыши, взятой в серийных разведениях, начиная с 1:100.

При конструировании ИХА диагностикума использовали рабочую мембрану с латеральным током жидкости с размером пор 15 мкм. Протективные МкАт, взятые в различных концентрациях, конъюгировали с частицами коллоидного золота размером 15 и 30 нм. Оптимальным в качестве проявочных оказались конъюгаты МкАт с частицами размером 30 нм. Для формирования аналитической зоны использовали МкАт ДТ-17 и ДТ-22. Для связывания коллоидных конъюгатов МкАт в контрольной зоне оптимальными оказались козьи антимышинные антитела.

Полученные результаты показали, что в присутствии антигена (ДТ или дифтерийного анатоксина) агглютинация латексных частиц, сенсibilизированных каким-либо одним вариантом МкАт, как и следовало ожидать, отсутствовала. Активно агглютинировались диагностикумы, полученные при сенсibilизации частиц одновременно двумя вариантами МкАт. При этом с наибольшей чувствительностью ДТ выявлялся с диагностикумом, полученным со смесью МкАт ДТ-17 и ДТ-22. Минимальная выявляемая концентрация, как и при использовании моноклонального диагностикума ДИФТЕРИЯ-МОНОЗИМ, составляла 0,001-0,002 Лf/мл (около 3-4 нг/мл), что существенно выше принятой иммунопреципитации в геле (тест Элека). При использовании диагностических полосок в ИХА тесте токсин выявляется в диапазоне концентраций 4-200 нг/мл при использовании в аналитической зоне МкАт ДТ-22 и в качестве проявочных — конъюгата ДТ-17.

Пригодность разработанных тестов для практического применения проверена при оценке токсигенной активности штаммов коринебактерий, выделенных от больных и носителей и охарактеризованных общепринятыми бактериологическими методами. Все изоляты коринебактерий (биоваров *gravis*, *mitis*, *intrmedius*, а также 4 изолята *C. ulcerans*) засевали в жидкие питательные среды (мартековский бульон, среду Лингуда) с добавлением сыворотки. Через 1, 2 суток в среде культивирования выявляли ДТ с помощью моноклональных ИФА и РЛА диагностикумов. Полученные данные свидетельствуют о хорошем соответствии результатов обоих тестов: оцениваемые по титру реакции, результаты различались не более, чем на \pm одно разведение, что свидетельствует об очень высокой чувствительности латексного диагностикума. Со средой культивирования 3 из 4 изолятов *C. ulcerans*, оцененных по преципитационному тесту с поликлональной сывороткой как *tox*⁺, моноклональные ИФА и РЛА диагностикумы реакции не дали. По данным культурального теста микротоксичности они также нетоксигенны.

Существенным преимуществом разработанных моноклональных РЛА и ИХА диагностикумов, в том числе и перед ИФА, является быстрота получения результатов: реакция агглютинации учитывается через час, а в ИХА окрашенная полоса, свидетельствующая о присутствии токсина, проявляется через 5-7 мин после погружения тест-полоски в среду. Благодаря использованию моноклональных антител эти диагностикумы отличаются и абсолютной специфичностью. Ложноположительных реакций не отмечено ни в одном случае при тестировании различных бактериальных антигенов и токсинов. Кроме того, в отличие от большинства коммерческих латексных диагностикумов, разработанные нами на основе МкАт сохраняют чувствительность в течение не менее 1 года при хранении при 4°C (срок наблюдения).

Можно полагать, что фактором, определяющим качественные и количественные характеристики разработанных диагностикумов, являются моноклональные антитела, которые целенаправленно отбирались для работы с учетом их иммунохимических и эффекторных свойств, и соблюдение необходимых требований при отборе к свойствам МкАт и латексных препаратов позволит создавать высоко специфичные эспресс-методы для индикации антигенов как инфекционной, так и неинфекционной природы.

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ. СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДА

Хайдуков С.В.

*Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук*

Проточная цитометрия — это современная технология быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. В свою очередь, иммунофенотипирование позволяет охарактеризовать клетки при помощи моноклональных антител или каких-либо других зондов и дает возможность судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров и происходящих в них процессах.

В настоящее время все больше и больше клинических лабораторий используют метод проточной цитометрии для определения иммунного статуса пациентов, диагностики лейкозов и лимфопролиферативных заболеваний. Однако, отсутствие стандартных подходов к пробоподготовке и процессу анализа по-прежнему делает метод проточной цитометрии достаточно субъективным и зависит от опыта оператора, проводящего анализ.

В процессе анализа фенотипа клеток периферической крови следующие правила должны быть общими:

- стандартная настройка проточного цитометра согласно инструкциям фирм производителей и периодическая проверка состояния инструмента с использованием контрольных материалов;
- стандартные условия отбора клинического образца для анализа с использованием рекомендуемых антикоагулянтов, а также его транспортировка и хранение;
- стандартный набор анализируемых маркеров. Должны быть использованы рекомендуемые ВОЗ панели клеточных маркеров. Допускается расширение панели моноклональных антител для более полной характеристики исследуемого образца. Однако следует учитывать, что многие маркеры могут экспрессироваться на различных типах клеток и определять их наличие следует в режиме не менее чем двухцветного анализа;
- стандартная процедура пробоподготовки. Во избежание потерь клеток следует использовать метод цельной крови, т.е. безотмывочную технологию. Особое внимание следует уделить подбору флюорохромов, с которыми связаны антитела, поскольку плотность клеточных маркеров варьирует в достаточно высоком диапазоне и может повлиять на результаты исследования;
- стандартный анализ с использованием контрольных образцов и контрольных сумм (например: Т-кл. + В-кл. + НК-кл. = $100 \pm 5\%$, и т.д.).
- участие в программах внешней оценки качества лабораторных исследований методом проточной цитометрии.

Таким образом, стандартизация иммунофенотипирования при помощи метода проточной цитометрии позволит врачам наиболее корректно оценивать иммунный статус пациентов и ставить диагноз, в не зависимости от того в каком месте был проведен данный анализ.

ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ПАТОЛОГИЕЙ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Хисамова Н.Ф., Хайруллина Р.М., Хаматдинова З.Р., Ахметшин Р.З.

*Детская республиканская клиническая больница,
г. Уфа, Россия*

Современный метод проточной цитометрии позволяет с высокой точностью на статистически достоверном материале измерить количество исследуемых веществ в клетках и их ядрах. Отдельное место среди методов проточной цитометрии занимает ДНК-цитометрия.

Своеобразие метода заключается в том, что содержание ДНК в нормальной жизнеспособной клетке не является постоянным, а зависит от фазы жизненного цикла клетки. При разных формах патологии количество ДНК в покоящейся (неделяющейся) клетке не всегда бывает одинаковым (диплоидным), может отклоняться от нормального содержания (анеуплоидия) в сторону уменьшения (гипоплоидия) или чаще в сторону увеличения (гиперплоидия).

Информативность ДНК-цитометрии в онкологии для выявления агрессивности опухолевого процесса не вызывает сомнений. Однако применение метода в других областях медицины изучено недостаточно.

Целью настоящего исследования является определение диагностической значимости ДНК-цитометрии периферической крови у детей с врожденными пороками развития мочеполовой системы (ВПРМПС) и с хроническими гломерулонефритами (ХГН).

Материалы и методы. Было проведено комплексное иммунологическое обследование 42 детей: из них 21 с минорными пороками развития МПС (гипоспадия, крипторхизм), 10 – с врожденной патологией развития мочеполовой системы (мегауретер, поликистоз) и 11 – с хроническим гломерулонефритом (ХГН). Группу сравнения составили дети с минорными пороками развития МПС. Анализ исследуемого материала (периферическая кровь) проводилось на проточном цитометре модели FACS Calibur (фирмы BD), после предварительной обработки – набором Cycle TEST™ Plus DNA reagent (BD). Интерпретация ДНК-гистог-

рам осуществлялась в соответствии с методическими рекомендациями Европейского консенсуса по проточной цитометрии ДНК [Ormerod et al., 1998]. Иммунофенотипирование клеток крови проводили методом прямой иммунофлуоресценции на проточном цитометре модели FACS Calibur (BD) с использованием набора Simultest IMK Plus (BD).

Результаты. У детей с минорными пороками развития (группа сравнения) в 100% случаев был выявлен диплоидный тип гистограм, 99% клеток находилось в G1-фазе клеточного цикла, т.е. стадии, в которой происходит реализация присущих клетке функций в интересах ткани и организма в целом [В.К. Мазурик, 2001].

Дети с ВПРМПС (n = 10) были разделены на 2 подгруппы, различающиеся по плоидности клеток крови: в 1-й подгруппе (n = 6) 44,2% клеток были диплоидными, 51,6% – анеуплоидными (анеуплоидия носила стойкий характер, и тип гистограм не изменялся в процессе мониторинга). Во 2-й подгруппе (n = 4) все клетки имели диплоидный набор хромосом. Вне зависимости от типа гистограм (диплоидный, анеуплоидный) в обеих подгруппах, клетки периферической крови находились в G1-фазе клеточного цикла. Субпопуляционный состав клеток периферической крови характеризовался следующими показателями: в 1-й подгруппе отмечалось достоверное снижение CD8⁺-, CD16⁺-фракции лимфоцитов, в то время как у детей 2-й подгруппы на фоне снижения цитотоксических лимфоцитов и естественных киллеров наблюдалось повышение CD3⁺-, CD4⁺-фракции лимфоцитов.

У детей с ХГН (n = 11) клетки периферической крови в 100% случаев были диплоидными, основная масса клеток 74,5% находилась в G1-фазе и 24,5% в S-фазе клеточного цикла.

Иммунофенотипирование клеток периферической крови у детей с ХГН определило достоверное снижение CD4⁺, CD16⁺, HLA-DR⁺ (маркер поздней активации).

Таким образом, на основании сопоставления клинических особенностей течения заболеваний и проведенных иммунологических исследований сделано предварительное заключение о диагностической и прогностической значимости ДНК-цитометрии у детей с ВПРМПС.