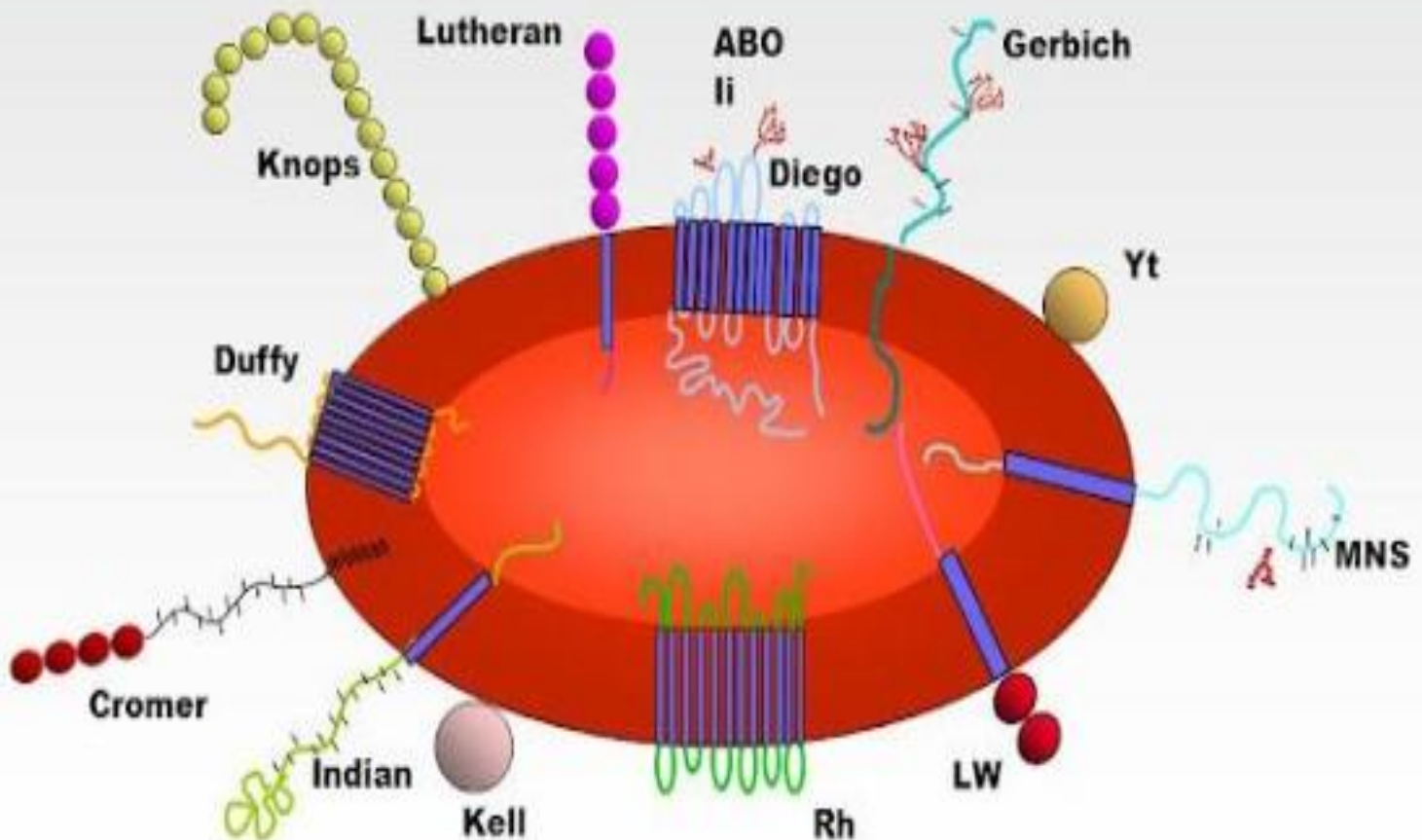


Тетяна Поручинська



**Фізіологія імунної
системи з основами
гематології**

Волинський національний університет
імені Лесі Українки
Кафедра анатомії, нормальної та патологічної фізіології

Тетяна Поручинська

Фізіологія імунної системи з основами гематології

Методичний посібник

Луцьк – 2025

Рекомендований до друку методичною радою
Волинського національного університету імені Лесі Українки
(протокол № 4 від 17.12.2025 року)

Рецензент: Панівська Ольга Вікторівна, доктор філософії (PhD), старший викладач кафедри гістології та медичної біології

Поручинська Т. Ф. Фізіологія імунної системи з основами гематології. Методичний посібник. Луцьк, 2025. 170 с.

Видання містить матеріали, що допоможуть здобувачам освіти покращити знання та отримати практичний досвід з нормальної фізіології людини, зокрема питань імунології та гематології. Посібник може бути корисним студентам-медикам, фізичним терапевтам, ерготерапевтам, фармацевтам, біологам, освітянам та всім, хто цікавиться фізіологією людини.

УДК 612.017:616.15(072)

© Поручинська Т. Ф., 2025

© Волинський національний

університет імені Лесі Українки, 2025

ЗМІСТ

Вступ	5
Лабораторна робота 1. Техніка безпеки. Особливості роботи з лабораторним інструментарієм	6
Лабораторна робота 2. Забір капілярної крові. Дослідження гематокриту та гемоглобіну	15
Лабораторна робота 3. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів, вмісту еритроцитів у крові, еритроцитарних індексів	30
Лабораторна робота 4. Дослідження захисних властивостей шкіри	42
Лабораторна робота 5. Центральні (первинні) органи імунної системи	47
Лабораторна робота 6. Периферичні (вторинні) органи імунної системи	60
Лабораторна робота 7. Групові антигени еритроцитів людини. Визначення групи крові (системи АВ0) за допомогою моноклональних антитіл та стандартних сироваток	69
Лабораторна робота 8. Визначення групи крові за допомогою перехресного методу	81
Лабораторна робота 9. Визначення Резус-належності крові	85
Лабораторна робота 10. Механізми розвитку, діагностика та профілактика ізонесумісності матері й плоду	101
Лабораторна робота 11. Методи імунологічних досліджень. Імуноферментний аналіз	116
Лабораторна робота 12. Реакція аглютинації та преципітації	133
Лабораторна робота 13. Визначення окремих субпопуляцій лімфоцитів	146
Лабораторна робота 14. Визначення основних класів	159

імуноглобулінів	
Перелік використаних джерел	167

Вступ

Сучасна біологія та медицина приділяють вивченню імунологічних питань першорядну увагу, а клінічна імунологія визнана окремою навчально-практичною дисципліною. Прогрес у цій галузі відкрив нові можливості для боротьби з інфекційними процесами, злоякісними новоутвореннями, алергічними та аутоімунними хворобами, імунодефіцитами, а також для вдосконалення трансплантації органів і лікування безпліддя.

До кола основних завдань імунології належать:

- дослідження загальних закономірностей функціонування імунної системи у нормі й при патологічних змінах;
- визначення внеску імунних механізмів у виникнення та перебіг конкретних захворювань;
- розробка й упровадження методів імунодіагностики, імунотерапії, імунокорекції та імунопрофілактики.

Імунологічні підходи широко застосовують у діагностиці, лікуванні та профілактиці як інфекційних, так і неінфекційних недуг.

За об'єктом дослідження виокремлюють такі напрями: загальна, медична, ветеринарна, інфекційна, клінічна, екологічна імунологія, а також імуногенетика, алергологія, імунопатологія, імуногематологія, імунологія репродукції й ембріогенезу. За застосованими методами виділяють імунодіагностику, імунотерапію, імунопрофілактику, імуноморфологію та імунохімію.

Видання «Фізіологія імунної системи з основами гематології» має на меті поглиблення теоретичних знань здобувачів освіти та формування практичних навичок дослідження основних функціональних і структурних характеристик

крові та імунної системи. Він сприяє формуванню клінічного мислення, вміння інтерпретувати результати лабораторних досліджень, розумінню механізмів імунної відповіді, ролі імунітету при різних захворюваннях, а також значенню показників периферичної крові для діагностики патологічних станів.

Лабораторна робота 1

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ. ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ З ЛАБОРАТОРНИМ ІНСТРУМЕНТАРІЄМ

Обладнання та матеріали: амідопірин (5 г), аніліну гідрохлорид (0,075 г), спирт етиловий 95%, перекис водню (3%), лабораторний посуд, вата, автоклав.

Хід роботи

Робота 1. Правила поведінки під час виконання лабораторних робіт

1. Дотримання вимог інструкції обов'язкове для здобувачів освіти та викладачів.

2. Перебування сторонніх осіб у кабінеті в момент проведення експерименту можливе тільки з дозволу викладача.

3. Під час заняття здобувачі освіти повинні бути в білих халатах.

4. До проведення лабораторної роботи здобувач освіти допускається у разі здачі теоретичної частини даної роботи.

5. Під час виконання роботи забороняється використовувати обладнання та лабораторний посуд, які вийшли з ладу або мають пошкодження, а також прилади, які не мають прямого відношення до роботи. При використанні конкретного приладу слід дотримуватись правил техніки безпеки під час роботи з ним.

6. У лабораторії категорично забороняється вживати їжу, напої; захаращувати проходи особистими речами, виносити будь-які реактиви та обладнання.

7. У випадку травмування (порізи, опіки), а також поганого самопочуття здобувачі освіти повинні негайно сповістити про це викладача або лаборанта.

8. Забороняється виливати в каналізацію робочі розчини та органічні рідини, вони повинні зливатись у спеціально призначений для цього посуд.

9. Після закінчення експерименту необхідно прибрати робочі місця.

10. При виникненні у лабораторії під час заняття аварійної ситуації (пожежа, сторонні запахи, аварії водогону, тощо) не допускати паніки і дотримуватись вказівок викладача.

11. Після сигналу «Повітряна тривога» необхідно взяти особисті речі та негайно перейти до укриття. Лаборанту: вимкнути світло, воду, увімкнені електричні прилади, погасити спиртівки та перейти до укриття.

Завдання: ознайомтесь з правилами поведінки під час виконання лабораторних робіт. Ознайомтесь з обладнанням та реактивами, які будуть використовуватись під час вивчення освітнього компонента.

Робота 2. Профілактика під час роботи з біоматеріалами

Необхідно бути обережними під час проведення маніпуляцій з ріжучими та колючими інструментами (голками, скальпелями, ножицями тощо).

З метою уникнення поранень забороняється використовувати скляні предмети з відбитими краями.

При маніпуляціях, які супроводжуються порушенням цілісності шкіри і слизових оболонок, проведенні лабораторних досліджень, обробці інструментарію, прибиранні і т. ін. необхідно користуватись засобами індивідуального захисту (халатами, гумовими рукавичками, масками). Ці дії дають змогу уникнути контакту шкіри та слизових оболонок з біологічними рідинами.

Студенти з травмами, ранами на руках, ексудативними ураженнями шкіри рук, які неможливо закрити лейкопластирем або гумовими рукавичками, звільняються на період захворювання від безпосереднього виконання завдань, пов'язаних з контактом з біологічними рідинами.

Усі маніпуляції з кров'ю і сироватками в лабораторіях виконуються за допомогою гумових груш, автоматичних піпеток, дозаторів.

Будь-які ємкості з кров'ю, іншими біологічними рідинами, біоматеріалами щільно закриваються гумовими або пластмасовими корками.

У разі забруднення кров'ю, біологічними рідинами, біоматеріалами: обробити місце забруднення одним із дезінфектантів (70 %-ним розчином етилового спирту, 3 %-ним розчином перекису водню, 3 %-ним розчином хлораміну); промити водою з милом і вдруге обробити спиртом.

У разі потрапляння крові, біологічних рідин, біоматеріалу на слизові оболонки: ротової порожнини – прополоскати 70 %-ним розчином етилового спирту; порожнини носа – закапати 30 %-ним розчином альбуциду; очі – промити водою (чистими руками), закапати 30 %-ним розчином альбуциду.

Не терти руками слизові оболонки.

Робота 3. Правила надання першої медичної допомоги

У залежності від ситуації, перша медична допомога полягає у наступному:

Отруєння розбавленими розчинами кислот

1. випити 4-5 склянок теплої води і викликати блювання,
2. випити стільки ж розчину оксиду магнію у воді і знову викликати блювання,
3. зробити два промивання шлунку чистою теплою водою (не менше 6 л).

Отруєння концентрованими розчинами кислот

При потраплянні всередину концентрованих кислот і при втраті свідомості забороняється викликати штучне блювання, застосовувати карбонати та гідрокарбонати як протиотруту (замість оксиду магнію). У цьому випадку необхідно терміново викликати лікаря.

Отруєння лугами

1. випити 4-5 склянок теплої води і викликати блювання,

2. випити стільки ж водного розчину оцтової кислоти (2%),
3. зробити два промивання шлунка.

Опіки

При будь-яких опіках забороняється користуватись жирами для обробки обпеченої ділянки та застосовувати фарбуючі речовини (розчини перманганату калію, брильянтовий зелений, йодну настойку). При опіку I ступеня охолоджують місце ураження і накладають суху стерильну пов'язку. У всіх інших випадках після охолодження місця опіку і накладання стерильної пов'язки звертаються за медичною допомогою.

При опіках їдкими речовинами останні видаляють з шкіри струшуванням або знімають пінцетом, сухим папером, скляною паличкою.

При опіках розчинами кислот або лугів останні змивають після струшування видимих краплин широким струменем прохолодної води (забороняється обробляти пошкоджену ділянку зволоженим тампоном). Після видалення з шкіри травмуючої речовини пошкоджену ділянку обмивають розчинами оцтової кислоти або гідрокарбонату натрію (2%), потім споліскують водою і накладають пов'язку з риванолом або фурациліном.

Порізи

Необхідно зупинити кровотечу за допомогою джгута або перетискання судин. Якщо рана забруднена, бруд видаляється тільки навколо місця пошкодження, але ні в якому разі не з глибинних шарів рани. Шкіру навколо рани знезаражують розчином йоду або брильянтовим зеленим і звертаються до медпункту або травмпункту. Якщо після накладання джгута кровотеча продовжується, на рану накладають стерильний тампон, який змочують розчином перексиду водню (3%), потім стерильну салфетку і туго бинтують.

Потрапляння до очей їдких рідин.

Очі промивають водою, потім розчином борної кислоти або гідрокарбонату натрію, у залежності від складу речовини, що потрапила до

очей. Після промивання очей чистою водою під повіки слід ввести 2–3 краплі розчину альбуциду (30%).

Після надання першої медичної допомоги потрібно звернутися до лікаря.

Завдання до робіт 2-3: ознайомтесь з правилами профілактики під час роботи з біоматеріалами та надання першої допомоги при пораненнях. Для закріплення отриманих знань розв'яжіть наведені нижче тестові завдання.

Робота 4. Виконання азопірамової проби

Реактив азопірам в суміші з 3% перекисом водню в присутності прихованих слідів крові на медичних інструментах дає фіолетове забарвлення упродовж 1 хв, що переходить у рожево-бузкове або бурувате. Азопірам виявляє наявність гемоглобіну, пероксидаз рослинного походження, окислювачів, іржі, кислот.

Послідовність виконання дій:

1) Уміст одного флакону з амідопірином та одного флакону з гідрохлоридом аніліну змішують у сухому посуді і заливають 95% етиловим спиртом до об'єму 50 мл. Суміш добре перемішують до повного розчинення реактивів (розчин азопіраму зберігають у щільно закритому флаконі із темного скла в холодильнику до 2-х місяців, за кімнатної температури – не більше 1 місяця).

2) Робочий розчин готують безпосередньо перед перевіркою якості очистки виробів. Для цього змішують рівні об'єми розчину азопіраму і 3% перекису водню. Робочий розчин має бути використаний упродовж 1-2 годин після приготування.

3) Робочим розчином обробляють досліджувані вироби: протирають тампонами, змоченими реактивом, або наносять декілька крапель реактиву піпеткою. У присутності слідів крові упродовж однієї хвилини повинно з'явитись

фіолетове забарвлення, що переходить у рожево-бузкове. При наявності іржі чи хлору спостерігається бурувате забарвлення. Забарвлення, яке з'явилося пізніше, ніж через 2 хвилини після обробки медичних виробів/лабораторного посуду, не враховується.

Слід враховувати, що не можна піддавати перевірці гарячі вироби, а також тримати розчин біля нагрівачів.

Після перевірки, незалежно від її результату, потрібно видалити залишки робочого розчину з досліджуваних виробів, обмивши їх водою чи спиртом, а потім повторити передстерилізаційне очищення цих виробів.

Роботи мають виконуватись у добре провітрюваних приміщеннях, у гумових рукавичках, подалі від відкритого вогню. У разі потрапляння розчину азопіраму чи перекису водню на шкіру чи в очі, потрібно змити місце ураження великою кількістю води. При випадковому потрапленні реагентів у стравохід – випити 2 л води та викликати блювання, звернутись до лікаря.

Завдання: виконайте дослідження лабораторного посуду на предмет виявлення залишків крові за допомогою азопірамової проби та дотримуючись усіх необхідних заходів безпеки. Отримані результати проаналізуйте. Зробіть висновки щодо можливості застосування даного лабораторного посуду під час наступних досліджень.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Яких дій потрібно вжити, якщо у лабораторії під час заняття виникла аварійна ситуація (пожежа, сторонні запахи, аварії водогону тощо)?

А) негайно покинути приміщення.

Б) Оперативно, використовуючи ліфти, покинути приміщення.

В) Повідомити викладача/лаборанта, за потреби покинути приміщення, за можливості повідомити інших людей, які перебувають у сусідніх приміщеннях про аварійну ситуацію. У випадку задимлення

інших приміщень, розглянути можливість залишитись у лабораторії, очікуючи допомоги.

2. Якщо відбулось травмування під час перебування у лабораторії, потрібно:

А) Ретельно промити рану йодом та туго забинтувати.

Б) Очистити навколораневу поверхню та, за потреби, накласти пов'язку.

В) Очистити раневу поверхню від бруду, обробити її йодом та накласти пов'язку.

3. У який спосіб можна позбутись використаних органічних речовин, розчинів?

А) Вилити у каналізацію, каналізацію потім промити великою кількістю води.

Б) Залити використані рідини дезінфікуючим розчином.

В) Вилити у спеціально призначені для цього ємкості для подальшої утилізації.

4. Які з запропонованих тверджень є правильними?

А) для популяризації науки потрібно запрошувати якомога більше гостей у працюючу лабораторію;

Б) потрібно верхній одяг залишати у лабораторії;

В) потрібно використовувати тільки справні прилади після ознайомлення з інструкцією до їх використання;

Г) потрібно обережно користуватись електричними розетками, від яких чути тріск чи видно іскри. Після закінчення заняття обов'язково повідомити про несправність електрика;

Д) з метою збереження довкілля, одноразовий інструментарій можна використовувати багаторазово, якщо його продезінфікувати;

Е) потрібно залишати на робочому місці тільки необхідне обладнання;

Є) потрібно користуватись тільки справними електричними розетками;

Ж) не можна споживати їжу під час роботи у лабораторії;

З) потрібно одягати білий халат під час роботи у лабораторії.

5. Що слід негайно зробити здобувачу освіти у випадку травмування (порізи, опіки) або поганого самопочуття під час лабораторної роботи?

А) Викликати штучне блювання, незалежно від типу травми.

Б) Негайно сповістити про це викладача або лаборанта.

В) Самостійно вийти з лабораторії та звернутися до медпункту.

Г) Продовжити роботу, не звертаючи уваги.

6. Які маніпуляції з кров'ю та сироватками в лабораторіях обов'язково виконуються для уникнення контакту?

А) Виключно за допомогою скляних піпеток без гумової груші.

Б) Виключно студентами, звільненими від контакту з біологічними рідинами.

В) Тільки за допомогою чистих рук та ватних тампонів.

Г) За допомогою гумових груш, автоматичних піпеток або дозаторів.

7. Який дезінфектант рекомендується використати для первинної обробки місця, забрудненого кров'ю, перед промиванням водою з милом?

А) 3 %-ний розчин хлораміну.

Свіжоприготовлений робочий розчин азопіраму.

Б) Йодна настойка.

В) Концентрований розчин кислоти.

Г) Концентрований розчин кислоти.

8. Що категорично забороняється робити при отруєнні концентрованими розчинами кислот та втраті свідомості?

А) Викликати штучне блювання.

Б) Зробити два промивання шлунку чистою теплою водою.

В) Застосовувати оксид магнію.

Г) Терміново викликати лікаря.

9. Яка перша дія при наданні допомоги у випадку порізу з кровотечею?
- А) Видалити бруд з глибинних шарів рани.*
 - Б) Знезаразити шкіру навколо рани розчином йоду.*
 - В) Зупинити кровотечу за допомогою перетискання судин.*
 - Г) Накласти стерильний тампон, змочений перекисом водню.*
10. При опіках їдкими розчинами кислот або лугів, як необхідно змивати травмуючу речовину зі шкіри після струшування видимих краплин?
- А) Жирами для обробки обпеченої ділянки.*
 - Б) Широким струменем прохолодної води.*
 - В) Обробляти пошкоджену ділянку зволоженим тампоном.*
 - Г) Розчином брильянтового зеленого.*
11. Який компонент із перелічених виявляє азопірам в суміші з 3%-ним перекисом водню?
- А) Вода.*
 - Б) Спирт етиловий 95%.*
 - В) Гемоглобін.*
 - Г) Хлорид натрію.*
12. Який термін використання робочого розчину азопіраму після його приготування?
- А) Не більше 1 місяця.*
 - Б) Упродовж 1-2 годин.*
 - В) До 2-х місяців.*
 - Г) Упродовж 24 годин.*
13. Яке забарвлення з'явиться упродовж однієї хвилини при проведенні азопірамової проби, якщо на виробі присутні сліди іржі або хлору?
- А) Бурувате.*
 - Б) Фіолетове, що переходить у рожево-бузкове.*
 - В) Синьо-зелене.*

Г) Відсутність будь-якого забарвлення.

Лабораторна робота 2

ЗАБІР КАПІЛЯРНОЇ КРОВІ. ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕМАТОКРИТУ ТА ГЕМОГЛОБІНУ

Обладнання та матеріали: автоматичні скарифікатори, спиртові серветки, стерильна вата, пробірки для забору капілярної крові, гемоглобінометр LabAnalyt-12, тест-смужки до гемоглобінометра, піпетки, стандарт гемоглобіну для контролю, гумові груші, рукавички, капілярна кров, гемометр Салі, капіляр для гемометра Салі, 0.1% розчин хлористоводневої кислоти.

Короткі теоретичні відомості

Гемоглобін (Hb) – складний залізовмісний білок-пігмент, який знаходиться всередині еритроцитів (червоних кров'яних тілець). Саме він надає крові червоного кольору. Молекула гемоглобіну є гетеротетрамером і складається з двох основних частин: глобіну (білкової частини, що представлена чотирма поліпептидними ланцюгами) та гему (чотирьох груп, кожна з яких містить один атом двовалентного заліза, саме атом заліза є місцем, де відбувається оборотне приєднання кисню).

Головна функція гемоглобіну – транспорт газів між легеньми та тканинами. У легнях гемоглобін легко зв'язується з киснем, утворюючи оксигемоглобін. У тканинах, де концентрація кисню низька, зв'язок розривається, і кисень вивільняється для забезпечення клітинного метаболізму. Гемоглобін також частково зв'язує вуглекислий газ, утворюючи карбгемоглобін і транспортує його назад до легень для виведення. Гемоглобін відіграє важливу роль у підтриманні сталості кислотно-лужного балансу крові (pH), тобто виконує буферну функцію.

Уміст гемоглобіну вимірюється у грамах на літр (г/л) і залежить від статі та віку (табл. 2.1):

Таблиця 2.1

Референтні значення рівня гемоглобіну

Категорія	Референтні значення (г/л)
Чоловіки	130 – 170
Жінки	120 – 158
Вагітні жінки	105 – 120

Зниження рівня гемоглобіну нижче норми (у жінок < 120 г/л, у чоловіків < 130 г/л) є основною ознакою анемії.

Гематокрит (Ht), або гематокритне число, — це відносний показник, який відображає частку (об'ємну фракцію) формених елементів крові, в основному еритроцитів, у загальному об'ємі цільної крові.

Показник виражається у відсотках (%). Наприклад, якщо гематокрит дорівнює 45 %, то це означає, що 45 % об'єму крові складають еритроцити, а решта 55 % — плазма та інші формені елементи (лейкоцити і тромбоцити, які займають незначний об'єм).

Класично гематокрит визначають шляхом центрифугування зразка крові у спеціальному капілярі, де кров розділяється на три шари:

1. Нижній, найбільший шар — еритроцити.
2. Тонкий проміжний шар (лейкоцити та тромбоцити).
3. Верхній шар — плазма крові.

Гематокрит є важливим показником густоти крові та її киснево-транспортної здатності. Підвищення гематокриту може свідчити про згущення крові, що часто відбувається при зневодненні (дегідратації), а також при деяких

захворюваннях, які супроводжуються збільшенням кількості еритроцитів (наприклад, адаптація до високогір'я).

Зниження гематокриту зазвичай вказує на анемію або гемодилуцію (розрідження крові), наприклад, через надмірну гідратацію.

Нормальні показники гематокриту залежать від статі та виражаються у відсотках. Для чоловіків референтні значення становлять 40-52 %, для жінок – 36-47 %.

Обидва показники, гемоглобін та гематокрит, тісно корелюють і використовуються разом для діагностики анемій та оцінки загального стану системи кровотворення.

Хід роботи

Робота 1. Підготовка досліджуваного

Збір капілярної крові слід здійснювати приблизно в один і той самий час доби та після принаймні восьми годин голодування, оскільки як циркадний ритм, так і стан харчування можуть впливати на результати. Якщо потрібно строго простежити динаміку показників, то слід також забезпечити півгодинний постільний режим перед взяттям зразка, але це можливо лише в лікарняних умовах. За інших умов ефективним є піднесення портативних інструментів до розслабленого сидячого пацієнта.

Зразок капілярної крові доцільно забирати, якщо не передбачається інших тестів, які б вимагали венозного доступу для отримання більшої кількості крові.

Місцем забору капілярної крові можуть бути кінчик пальця або мочка вуха, у новонароджених або немовлят - п'ята. Якщо кровообіг поганий, кровотік можна збільшити, зігрівши кінцівку, зануливши її в теплу воду.

Не натискаючи, місце проколу кілька разів протирають тампоном, розчиненим 70% спиртом, а потім щільно, але обережно проколюють шкіру стерильним одноразовим ланцетом (рис. 2.1).

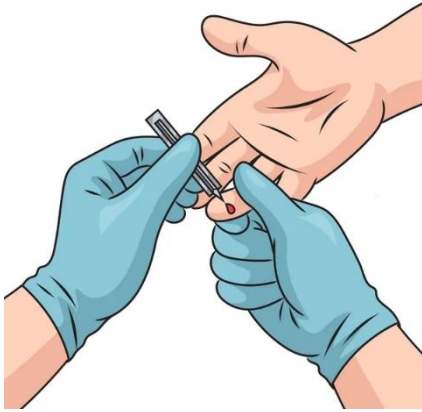


Рис. 2.1. Проколювання кінчика пальця одноразовим ланцетом.

Першу краплю крові витирають, оскільки вона може бути забрудненою або містити тканинну рідину, а наступну кров забирають у спеціальну пробірку (рис. 2.2).

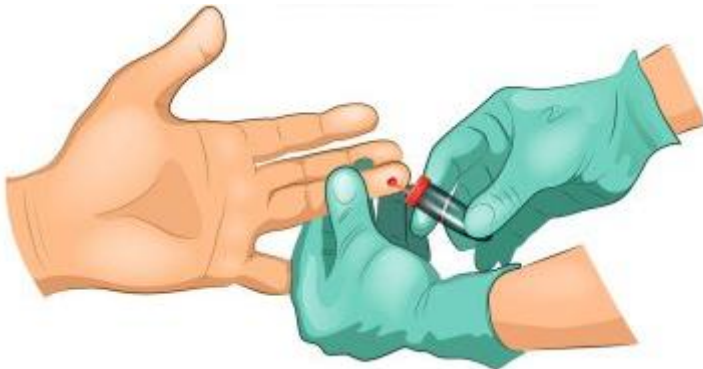


Рис. 2.2. Забір крові у пробірку для капілярної крові.

Під час забору, слід бути обережними, щоб не тиснути на тканину, з якої береться кров, оскільки це також може змінити клітинний склад зразка.

Після забору крові місце проколу протирають спиртовою серветкою та закривають місце проколу стерильним пластиром або ватою.

Завдання: дотримуючись усіх правил техніки безпеки, виконайте забір капілярної крові у досліджуваного.

Робота 2. Визначення гематокриту

Гематокрит – об'ємна фракція еритроцитів у цільній крові (співвідношення об'єму еритроцитів і плазми крові), що залежить від кількості та об'єму еритроцитів. У сучасних гематологічних лічильниках гематокрит є розрахунковим (вторинним) параметром, визначеним за кількістю еритроцитів та їх об'ємом (рис. 2.3).

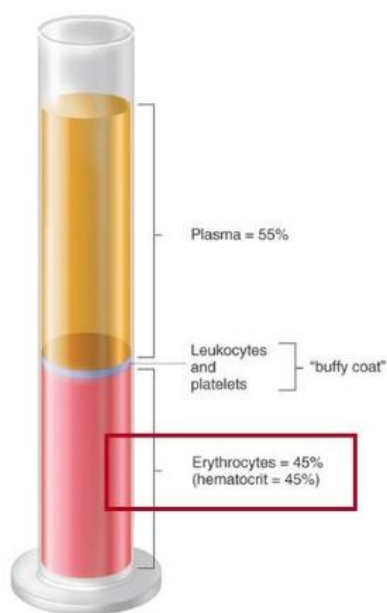


Рис. 2.3. Схематичне зображення визначення гематокриту. Нижній шар – еритроцити – становить 45 % (отже, показник гематокриту – 45 %); середній шар – суміш лейкоцитів та тромбоцитів; верхній шар – плазма крові.

Норма гематокриту у жінок: 36-42 %, у чоловіків: 40-48 %, у новонароджених: 44-62 %. Підвищення гематокритної величини спостерігається під час еритремії, вторинному еритроцитозі, у новонароджених, а зниження – при анеміях.

Методи дослідження гематокриту

1) Метод мікрогематокриту. Для цього дослідження використовується мікрогематокритна трубка (капілярна трубка) довжиною 75 мм і діаметром 1 мм, яка містить гепарин і має червоне кільце на кінці трубки, центрифуга мікрогематокриту та зчитувач мікрогематокриту. Метод мікрогематокриту передбачає центрифугування заповнених кров'ю капілярів у спеціальній центрифугі зі швидкістю 11000-12000 об/хв упродовж 4-5 хв. Зчитування здійснюється за допомогою шкали на пробіротримачі або мікрогематокритного картридера.

2) Метод макрогематокриту. Використовують гематокритну пробірку Wintrobe, центрифугу та піпетку Пастера. У гематокритну пробірку Wintrobe заливають кров до позначки 100 мм за допомогою піпетки Пастера. Для того, щоб у стовпчику крові не залишилося бульбашок, пробірку наповнюють повільно, при цьому кінчик піпетки завжди знаходиться нижче найвищого положення стовпчика крові. Потім пробірку центрифугують упродовж 30 хв при 3000 об/хв. Після завершення центрифугування пробірку виймають, а висоту стовпчика еритроцитів визначають як рівень гематокриту. Під час звітності слід враховувати тільки рівень еритроцитів; шар із лейкоцитів та тромбоцитів не слід включати в гематокрит, оскільки це може призвести до хибнопозитивних результатів.

3) Автоматичний аналізатор вимірює середній розмір і кількість еритроцитів за «принципом Культера». У цьому методі розмір і кількість еритроцитів можна виміряти шляхом визначення імпедансу, коли кров проходить через прохід між двома електродами.

Визначення гематокриту за допомогою портативного пристрою

Для визначення гематокриту за допомогою портативного пристрою (рис. 2.4) використовують свіжу капілярну кров, результат отримують негайно.

Для визначення гематокриту в такий спосіб, потрібно ознайомитись з інструкцією до приладу, перевірити його справність та наявність відповідних тест-смужок.

Після цього прилад вмикають та очікують сигналу на моніторі про його готовність.

Шкіру обробляють спиртовою серветкою, виконують прокол скарифікатором, першу краплину крові знімають сухою серветкою. Другу краплю наносять на спеціальне поле індикаторної тест-смужки, яке підсвічується. Результат з'являється на екрані через кілька секунд. Після виконання тесту скарифікатор та тест-смужку необхідно утилізувати.



Рис. 2.4. Гемоглобінометр LabAnalyt-12. На екрані портативного пристрою видно два показники. Вгорі – рівень гемоглобіну крові (вимірюється у г/л), внизу – рівень гематокриту (вимірюється у %).

Визначення гематокриту крові методом макрогематокриту

Визначення гематокриту крові включає центрифугування зразка крові з антикоагулянтом у спеціальному капілярі. Центрифугування здійснюють упродовж 30 хв на 3000 об/хв. Після цього вимірюють висоту стовпчика еритроцитів та визначають частку еритроцитів від загального об'єму крові (рис. 2.5).



Рис. 2.5. Дослідження гематокриту за допомогою центрифугування. Пробірка ліворуч – осідання еритроцитів у результаті центрифугування, пробірка праворуч – вигляд крові до центрифугування.

Завдання: виконайте дослідження гематокриту обома методами, порівняйте отримані результати. Вкажіть переваги та недоліки кожного з

методів. Визначте, чи відповідають отримані результати нормі (враховуючи стать та вік досліджуваного).

Робота 3. Визначення рівня гемоглобіну

Гемоглобін (Hb, hemoglobin) – один із основних параметрів оцінювання еритропоезу. Кількість гемоглобіну в крові відображає її кисневу ємність.

Низький рівень гемоглобіну може свідчити про зниження вироблення гемоглобіну організмом, зниження виробництва еритроцитів або руйнування чи втрату еритроцитів.

Низький рівень гемоглобіну пов'язаний з застосуванням певних ліків, залізодефіцитною анемією, іншими видами анемій, захворюванням нирок, захворюванням печінки, захворюванням на рак, хіміотерапією, променевим лікуванням, неправильним харчуванням, малярією тощо.

Підвищений рівень гемоглобіну може означати, що організм виробляє занадто багато еритроцитів або, що в організмі мало рідини, наприклад, у разі зневоднення.

Слід розуміти, що підвищений гемоглобін, навіть якщо це є наслідком компенсації організмом хвороб (наприклад, хвороб легенів або серця), є несприятливою ознакою здоров'я.

Підвищення рівня гемоглобіну може бути пов'язаним зі правжньою поліцитемією (рідкісний стан, який виникає у результаті вироблення кістковим мозком надмірної кількості еритроцитів), палінням, раком нирки, хронічним захворюванням легенів, серцевою недостатністю, проживанням на значних висотах над рівнем моря, зневодненням.

Діапазон нормального рівня гемоглобіну становить для жінок: 120 – 155 г/л, чоловіків: 135 – 175 г/л, дітей: 110 – 160 г/л, вагітних жінок: 110 – 120 г/л.

Методи визначення гемоглобіну

Технологічний прогрес у методах тестування гемоглобіну призвів до створення новаторських методів і пристроїв, які допомагають вимірювати концентрацію гемоглобіну у пацієнтів.

Наприклад, автоматичний аналізатор гемоглобіну дозволяє отримувати надійні, швидкі та точні результати у сфері гематології. Тест на гемоглобін може залежати від різноманітних методів, деякі з яких використовують реагенти, а інші застосовують «безреагентні» або неінвазивні методи.

1) Метод гемоглобінціаніду (HiCN).

Метод HiCN для вимірювання гемоглобіну здійснюється за принципом перетворення гемоглобіну в ціанметгемоглобін, куди додають ціанід калію та фериціанід. Наявність міжнародно прийнятого еталонного стандартного калібратора є однією з переваг цього типу методу визначення гемоглобіну. Хоча метод HiCN все ще регулярно використовується в клініках, ціанід-залежний протокол робить його більш поширеним як еталонний для калібрування аналізаторів гемоглобіну на місці надання медичної допомоги. Крім того, метод HiCN є трудомістким і ручним процесом.

2) Безреагентні методи. Суть дослідження полягає у вимірюванні абсорбцію цільної крові при 506 нм і виявлення насиченого киснем і деоксигенованого гемоглобіну при 880 нм з компенсацією каламутності. Перевагою дослідження за допомогою цих методів є короткий час вимірювання, який становить лише одну секунду.

3) Неінвазивні методи. Після нових технологічних розробок неінвазивні методи почали використовуватися для визначення концентрації гемоглобіну, спочатку як інструменти моніторингу під час операції, а останнім часом у пунктах медичної допомоги та здачі крові. Існують неінвазивні пристрої, які залежать від білого світла, а також збору даних передачі для визначення концентрації гемоглобіну в капілярах тканин, тоді як інші працюють на основі

пульсоксиметрії. Як ще одна неінвазивна технологія вимірювання застосовується оклюзійна спектроскопія. Прилад має датчик у формі кільця, який під'єднується до пальця досліджуваного. Датчик миттєво зупиняє кровотік і запускає оптичний сигнал, який, у свою чергу, створює високе співвідношення сигнал/шум. Це дає оцінку концентрації гемоглобіну.

4) Метод концентраційної колориметрії. Гемоглобінометр Салі — це ручний набір інструментів. Під час дослідження гемоглобін перетворюється на кислий гематин за допомогою соляної кислоти. Після цього кислий гематин розбавляють, поки колір розчину не збігається з кольором блоку порівняння. Це дозволяє клініцисту визначити концентрацію гемоглобіну, просто зчитуючи дані з калібрувальної пробірки. Метод відносно простий, недорогий і часто використовується для оцінки концентрації гемоглобіну, але він не завжди дає точні результати, через відмінності у кольоросприйнятті та ручне піпетування.

5) Гематологічний аналізатор. Як правило, автоматизований гематологічний аналізатор або аналізатор гемоглобіну у порівнянні з ручною технікою може досягати вищої точності та швидших результатів. Однак початкова вартість автоматизованого аналізатора є досить високою; також додаткових затрат коштів та часу потребує організація відповідних лабораторних умов, навчання персоналу лабораторії та регулярне обслуговування приладу. Це робить його непрактичним для використання поза лабораторією.

6) Аналізатор газів крові (АГК). Для такого аналізатора зазвичай використовують артеріальну кров для визначення комбінації параметрів електролітів, рН, газів крові та метаболітів. Хоча АГК також можуть використовуватися в деяких лабораторіях для тестування гемоглобіну, вони здебільшого використовуються у відділеннях невідкладної допомоги, відділеннях інтенсивної терапії та пологових палатах.

Визначення вмісту гемоглобіну за допомогою гемометра Салі (рис. 2.6).

Одним з найпростіших колориметров є **візуальний гемометр типу ГС-3 по Салі**, до цього часу поширений в мережі лабораторій країни.

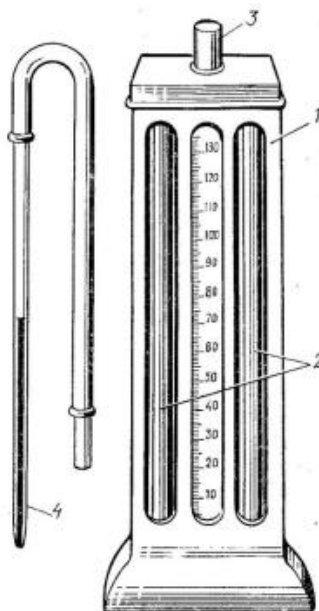


Рис. 2.6. Гемометр ГС-3. 1 – корпус, 2 – запаяні пробірки із стандартом, 3 – градуйована пробірка, 4 – капіляр для взяття крові.

За допомогою гемометра Салі можна визначити вміст гемоглобіну в діапазоні від 30 до 230 г/л. Для цього у пробірку гемометра, яка містить шкалу, до нижньої позначки вносять 0,1 % розчин соляної кислоти. У капіляр набирають 0,02 мл крові та вносять у пробірку гемометра, уникаючи піноутворення. Перемішують крові із кислотою струшуванням, залишають розчин на 5 хв, доки він не набуде характерного коричневого кольору. Після цього, за допомогою дистильованої води, слід поступово довести отриманий розчин до забарвлення у контрольних пробірках. Отриманий на шкалі результат помножити на 10.

Визначення вмісту гемоглобіну за портативного пристрою

Визначення вмісту гемоглобіну за допомогою портативного гемоглобінометра здійснюється за тим самим алгоритмом, що й визначення гематокриту (робота 2).

Завдання: виконайте дослідження гемоглобіну обома методами, порівняйте отримані результати. Вкажіть переваги та недоліки кожного з методів. Визначте, чи відповідають отримані результати нормі (враховуючи стать та вік досліджуваного).

Робота 4. Розв'яжіть ситуаційні задачі

1. Під час експедиції в умови високогір'я було виявлено, що в середньому гематокрит у місцевих жителів становить 54%, що значно перевищує норму. Чим можна пояснити підвищений гематокрит у мешканців високогір'я? Які фізіологічні механізми регулюють рівень гематокриту? Яке значення має підвищений гематокрит для транспорту кисню?

2. Молодий чоловік, який дотримується суворої вегетаріанської дієти, відчуває втому, зниження працездатності. Лабораторне дослідження крові показало: гемоглобін – 95 г/л. Які причини могли зумовити зниження рівня гемоглобіну? Чому гемоглобін має критичне значення для клітинного метаболізму? Які показники варто додатково дослідити, щоб підтвердити діагноз анемії?

3. У лабораторії досліджували кров з пуповини новонародженого та виявили, що гемоглобін новонародженого має більшу спорідненість до кисню, ніж гемоглобін дорослої людини. Як називається форма гемоглобіну, що переважає у плода? Чому така особливість важлива для ембріонального розвитку? Що відбувається з цим типом гемоглобіну після народження?

Тестові завдання для самоконтролю

1. Яка основна функція гемоглобіну в організмі людини?

А) Нейтралізація токсинів у плазмі.

Б) Транспорт кисню та вуглекислого газу.

В) Забезпечення згортання крові.

Г) Фагоцитоз бактерій.

2. Який структурний компонент гемоглобіну відповідає за безпосереднє зв'язування кисню?

А) Вуглекислий газ.

Б) Плазмозна мембрана еритроцита.

В) Атом двовалентного заліза у складі гема.

Г) Глобін (білкова частина).

3. Як називається форма гемоглобіну, яка утворюється переважно в артеріальній крові після приєднання кисню?

А) Карбгемоглобін (HbCO_2).

Б) Карбоксигемоглобін (HbCO).

В) Метгемоглобін (HbMet).

Г) Оксигемоглобін (HbO_2).

4. Що відображає показник гематокрит?

А) Об'ємну частку еритроцитів у загальному об'ємі цільної крові.

Б) Загальну кількість еритроцитів у 1 літрі крові.

В) Співвідношення лейкоцитів до плазми.

Г) Гематокрит — це відношення об'єму червоних кров'яних тілець до загального об'єму крові, виражене у відсотках або л/л.

5. Яке значення гемоглобіну (Hb) у дорослої жінки найімовірніше буде розцінено як анемія?

А) 145 г/л.

Б) 115 г/л.

В) 165 г/л.

Г) 130 г/л.

6. Який показник гематокриту вважається нормальним для дорослого чоловіка?

А) 25%–35%.

Б) 40%–52%.

В) 55%–65%.

Г) 35%–40%.

7. Що найімовірніше є причиною підвищеного гематокриту у жителів високогір'я?

А) Збільшення об'єму плазми крові.

Б) Дефіцит вітамінів групи В.

В) Переїдання.

Г) Адаптація до низького парціального тиску кисню (гіпоксії).

8. Як називається патологічна форма гемоглобіну, що утворюється при отруєнні чадним газом (СО) і блокує перенесення кисню?

А) Карбоксигемоглобін (HbCO).

Б) Метгемоглобін (HbMet).

В) Оксигемоглобін (HbO₂).

Г) Дезоксигемоглобін (HbH).

9. Чому у вагітних жінок допускається зниження рівня гемоглобіну (105–120 г/л) порівняно з невагітними?

А) Посилення синтезу еритроцитів.

Б) Збільшення загального об'єму плазми крові (гемодилуція).

В) Зменшення потреби тканин у кисні.

Г) Збільшення руйнування еритроцитів.

10. Який із перерахованих станів найімовірніше призведе до підвищення показника гематокриту (HCT)?

А) Хронічна крововтрата.

Б) Дефіцит заліза.

В) Велика втрата рідини організмом (зневоднення).

Г) Введення великої кількості сольових розчинів внутрішньовенно.

11. Окрім газового транспорту, гемоглобін виконує важливу функцію у підтриманні сталості внутрішнього середовища, відому як:

А) Дезінтоксикаційна функція.

Б) Осмотична функція.

В) Терморегуляторна функція.

Г) Буферна функція.

12. Яке співвідношення Гемоглобіну (*Hb*) та Гематокриту (*HCT*) характерне для залізодефіцитної анемії?

А) Знижений Hb та знижений HCT .

Б) Підвищений Hb при нормальному HCT .

В) Знижений Hb при нормальному або підвищеному HCT .

13. Білок Глобін у складі гемоглобіну представляє собою:

А) Небілкову залізовмісну частину.

Б) Молекулу жиру.

В) Молекулу гепарину.

Г) Чотири поліпептидні ланцюги.

14. Якщо результат аналізу гематокриту становить 45%, що це означає?

А) Концентрація гемоглобіну складає 45 г/л.

Б) 45% об'єму крові займають лейкоцити.

В) 45% об'єму крові займають еритроцити.

Г) 45% об'єму крові займає плазма.

15. Який діапазон рівня гемоглобіну вважається критичним і вимагає термінової медичної допомоги?

А) 90–110 г/л.

Б) 110–120 г/л.

В) 160–180 г/л.

Г) Нижче 70 г/л.

ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ, ВМІСТУ ЕРИТРОЦИТІВ У КРОВІ, ЕРИТРОЦИТАРНИХ ІНДЕКСІВ

Обладнання та матеріали: 7 пробірок Відаля (або звичайних лабораторних пробірок), штатив, 0,5 % розчин натрію хлориду, дистильована вода, кров, консервована 5 % розчином цитрату натрію; рахункова камера Горяєва, покривні скельця, мікроскоп, фільтрувальний папір, 3 % розчин натрію хлориду, змішувач для еритроцитів, скарифікатори, спиртові серветки.

Хід роботи

Робота 1. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів

Теоретичні відомості

Осмотична резистентність еритроцитів (ОРЕ) – це властивість еритроцитів чинити опір впливу різниці осмотичних тисків між внутрішнім і зовнішнім середовищем. Це відіграє ключову роль у підтримці стійкості форми та функцій еритроцитів в умовах змінного осмотичного середовища організму.

Показник осмотичної резистентності важливий для практичної медицини, оскільки він характеризує фізико-хімічні властивості еритроцитів, насамперед еластичність та щільність їх оболонки, що не однакові у старих і молодих клітин.

Аналіз на осмотичну резистентність еритроцитів застосовується для діагностики захворювань крові та оцінки їхніх характеристик і полягає у визначенні здатності червоних кров'яних тілець протистояти гемолізу (руйнуванню) під впливом гіпотонічних розчинів хлориду натрію (NaCl) різної концентрації.

Механізм: в основі стійкості лежить здатність еритроцита витримувати надходження води (за законами осмосу) до моменту, коли його об'єм стає критичним і клітинна мембрана руйнується. Чим нижча концентрація солі, за

якої починається або повністю завершується гемоліз, тим вища осмотична стійкість.

Клінічне значення: зниження OPE характерне для спадкових гемолітичних анемій (наприклад, мікросфероцитозу, коли клітини мають сферичну форму і меншу площу поверхні). Підвищення OPE спостерігається при деяких таласеміях, а також при залізодефіцитній анемії.

Осмотичний гемоліз еритроцитів у нормі має певні параметри, які дуже розширюються при різноманітних порушеннях функції червоного кісткового мозку.

Зменшення осмотичного тиску спричинює набряк еритроцитів, а потім їх руйнування (осмотичний гемоліз). Мірою осмотичної стійкості (резистентності) еритроцитів є концентрація NaCl, при якій починається гемоліз. У людини це відбувається в 0,45-0,52 % розчині (мінімальна осмотична резистентність), в 0,28-0,32 % розчині руйнуються всі еритроцити (максимальна осмотична резистентність)

Осмотична резистентність еритроцитів підвищується при раку шлунка та інших органів, набряках нирок, артеріосклерозі, механічній жовтяниці тощо. Вона знижується при анемії внаслідок кровотечі, при виразці шлунка, гемолітичній жовтяниці тощо.

Під впливом наркотиків уретанового та алкогольного ряду проникність еритроцитів для води, калію і гемоглобіну зменшується, а осмотичний гемоліз затримується.

Гемолітичні процеси відбуваються як у здоровому організмі, так і при різних захворюваннях. У здоровому організмі термін життя еритроцита в середньому становить 120 днів, після чого в селезінці, печінці, кістковому мозку і лімфатичних вузлах він піддається руйнуванню, яке супроводжується гемолізом. Після руйнування еритроцитів гемоглобін розпадається на білкову речовину — глобін і залізовмісний пігмент — гем. Шляхом складних хімічних

перетворень з гему утворюється білірубін. Звільнене в процесі розпаду гемоглобіну залізо насамперед депонується в ретикуло-ендотеліальних клітинах селезінки і печінки. Звідси після складних хімічних перетворень воно надходить у кровотік.

У походженні патологічного гемолізу велику роль відіграють певні порушення у внутрішньому і зовнішньому середовищі: вплив гемолітичних отрут, утворення гемаглютининів і гемолізинів у відповідь на різні зовнішні впливи (віруси, бактерії, хімічні агенти, низька температура навколишнього середовища тощо) — у хворих із набутою гемолітичною анемією, поява мікросфероцитарних еритроцитів — при вродженій гемолітичній анемії. При ускладненнях, пов'язаних із переливанням крові, несумісної за груповими властивостями і резус-приналежністю, виявляють внутрішньосудинний гемоліз.

Показання до призначення аналізу на осмотичну резистентність еритроцитів:

- діагностика спадкових порушень мембрани еритроцитів. Деякі захворювання можуть бути спричинені порушеннями у структурі чи функції мембрани червоних кров'яних клітин. Аналіз на осмотичну резистентність допомагає виявити ці спадкові захворювання;
- оцінка стану еритроцитів при порушеннях обміну речовин. Деякі порушення обміну речовин можуть впливати на структуру та функцію еритроцитів. Аналіз допомагає оцінити вплив цих порушень на клітини;
- моніторинг ефективності лікування. У деяких випадках, коли пацієнт проходить лікування анемії чи інших захворювань крові, аналіз на осмотичну резистентність використовується для моніторингу ефективності лікування й оцінки динаміки змін у клітинах;

Показання щодо аналізу на осмотичну резистентність встановлюються лікарем, виходячи із клінічної ситуації та медичної історії пацієнта. Цей аналіз є спеціалізованим і проводиться у межах загального аналізу крові.

Хід роботи

Промаркуйте пробірки числами від 1 до 7 та помістіть їх у штатив. З 0,5 % розчину хлориду натрію підготуйте ряд розведень за схемою, наведеною у таблиці 1. У кожную пробірку додайте по 1 краплі консервованої крові. Вміст пробірок обережно перемішайте до рівномірного забарвлення і залиште на 1 год у штативі.

Таблиця 3.1

Схема розведень

№ пробірки	Кількість крапель 0,5% NaCl	Кількість крапель дистильованої води	Одержана концентрація розчину NaCl
1.	25	-	0,5%
2.	24	1	0,48%
3.	22	3	0,44%
4.	20	5	0,40%
5.	18	7	0,36%
6.	16	9	0,32%
7.	14	11	0,28%

Через 1 год, не збовтуючи вмісту пробірок, спостерігайте, де відбулось руйнування оболонки еритроцитів (гемоліз). Наявність гемолізу оцінюють за

ступенем забарвлення розчину натрію хлориду, що міститься над осілими еритроцитами у пробірках (рис. 3.1).

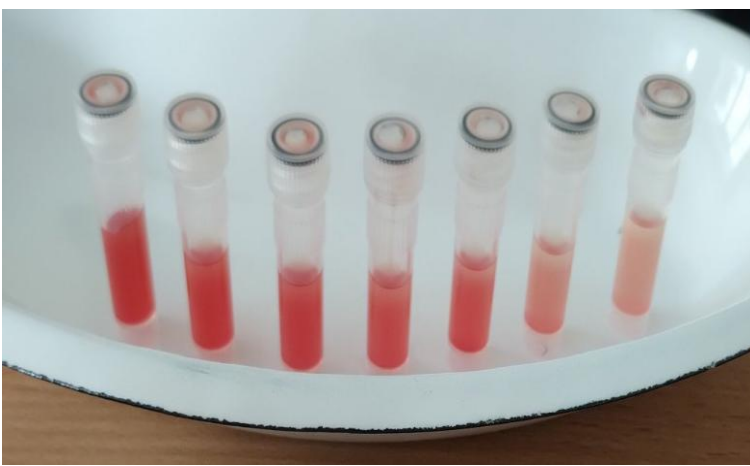


Рис. 3.1. Визначення осмотичної резистентності еритроцитів.

Завдання: за результатами дослідження визначте мінімальну та максимальну резистентність еритроцитів. Вкажіть, які чинники впливають на осмотичну стійкість, в яких випадках вона знижується/підвищується порівняно з нормою?

Робота 2. Визначення вмісту еритроцитів

Вміст еритроцитів - це кількість еритроцитів на певний об'єм крові. Його можна визначити в мільйонах клітин на мікролітр (мкл) крові або в трильйонах клітин на літр (л) крові.

Кількість еритроцитів визначається шляхом підрахунку їх у спеціальній камері (наприклад, камера Горяєва) або автоматично за допомогою гематологічних аналізаторів.

Принцип полягає у розведенні крові ізотонічним розчином у точній пропорції (наприклад, 1:200). Після цього розведену кров поміщують у рахункову камеру з відомим об'ємом сітки та під мікроскопом підраховують кількість клітин у певній кількості великих або малих квадратів. Використовуючи формулу, що враховує об'єм підрахованої рідини та ступінь розведення, розраховують кількість еритроцитів у 1 літрі (або 1 мкл) крові.

Нормальна кількість еритроцитів (також відома як референтний діапазон) залежить від статі та віку:

- Дорослі жінки: від 4,2 до 5,4 мільйонів/мкл
- Дорослі чоловіки: від 4,7 до 6,1 мільйонів/мкл
- Діти: від 4,0 до 5, мільйонів/мкл

Все, що вище або нижче цих рівнів еритроцитів, може вказувати на захворювання. Однак слід мати на увазі, що інші фактори можуть впливати на нормальні результати. Наприклад, якщо людина проживає у високогірному населеному пункті, то її показники крові будуть відрізнятися від показників людей, які живуть на низовині. З цієї причини діапазони не можна вважати жорсткими значеннями, а лише опорними точками.

Хід роботи

Рахункову камеру розмістіть під мікроскопом і розгляньте сітку Горяєва спочатку при малому, а потім при великому збільшенні.

Накрийте камеру покривним склом, притираючи його краю до скла камери до появи райдужних кілець Ньютона.

Дотримуючись усіх правил техніки безпеки та користуючись отриманими під час виконання лабораторної роботи 2 навичками, виконайте забір капілярної крові за допомогою змішувача для еритроцитів, тримаючи його вертикально. Наберіть кров до позначки 0,5, стежачи, щоб в капілярі не було бульбашок повітря. Витріть кінець капіляра фільтрувальної папером і швидко, поки кров не згорнулася, перенесіть його в чашку з 3% розчином натрію хлориду, продовжуючи тримати змішувач вертикально. Наберіть розчин до мітки 101 (тобто розведіть кров в 200 разів), після чого змішувач переведіть у горизонтальне положення і покладіть на стіл.

Для підрахунку еритроцитів візьміть заповнений меланжер, затискаючи нижній кінець пальцем, зніміть гумову грушу і, затиснувши обидва кінці змішувача третім і першим пальцями, протягом 1 хв перемішуйте кров. Оскільки еритроцити змішані з гіпертонічним розчином, вони зморщатся і стануть помітнішими для підрахунку.

Випустіть із змішувача на вату три краплі, а четверту нанесіть на середню площадку камери біля краю покривного скла. Капілярними силами крапля сама втягується в покривне скло і заповнює камеру. Надлишок розчину крові стікає в

жолобок. Якщо на сітку потрапило повітря або на бічних майданчиках виявився надлишок розчину, камеру слід промити дистильованою водою, висушити і заповнити знову.

Заповнену камеру поставте під мікроскоп і, якщо формені елементи розташовані рівномірно (що є показником хорошого перемішування крові), приступайте до підрахунку.

Підраховувати еритроцити краще при малому об'єктиві (x8), використовуючи при цьому окуляр x15.

Підрахуйте кількість еритроцитів в п'яти великих квадратах (розділених на 16 маленьких), розташованих по діагоналі від верхнього лівого квадрата вниз направо (рис. 3.2).

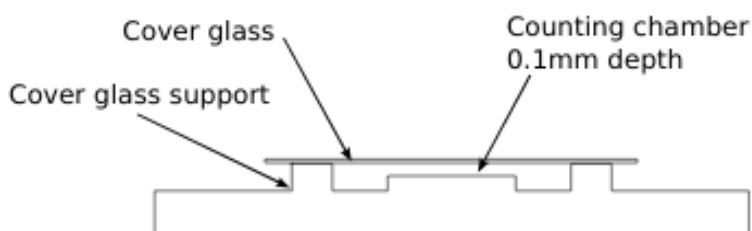


Рис. 3.2. Камера Горяєва з покривним склом (вигляд збоку).

Підрахунок виконуйте в межах маленького квадрата по рядах (від верхнього до нижнього). Щоб уникнути дворазового підрахунку клітин, що лежать на кордоні між малими квадратами, застосовуйте таке правило: «до даного квадрату відносяться еритроцити, що лежать як всередині квадрата, так і на його лівій і верхній межах; еритроцити, що лежать на правій і нижній межах, до даного квадрату не належать».

Підрахувавши суму еритроцитів в п'яти великих квадратах (що становить 80 маленьких), визначте середнє арифметичне значення кількості еритроцитів в одному маленькому квадраті. Знаючи, що обсяг простору камери над одним маленьким квадратом дорівнює $1/4000 \text{ мм}^3$, перемножте знайдене число на 4000. Ви отримаєте кількість еритроцитів в 1 мм^3 розведеної крові.

Помноживши на величину розведення (200), отримаєте кількість еритроцитів в 1 мм^3 цільної крові.

Таким чином, формула для обчислення кількості еритроцитів наступна:

$$X = \frac{E \times 4000 \times 200}{80},$$

де x - шукане число еритроцитів в 1 мм^3 цільної крові, E - сума еритроцитів в 80 маленьких квадратах, 80 - кількість маленьких квадратів, в яких зроблений підрахунок, 200 - розбавлення крові.

Потім отриману кількість еритроцитів запишіть в перерахунку на 1 л крові, тобто кількість мільйонів еритроцитів, знайдених в 1 мм^3 , перемножте на 10^{12} .

Причини помилок при підрахунку: утворення згустку, недотримання умов, які забезпечують правильну висоту камери (товщина покривного скла не менше 3 мм), несвоєчасний підрахунок клітин (час менше 1 хв після заповнення камери не забезпечує осідання на дно клітин, і тому результати отримуємо нижче дійсних), менша кількість підрахованих квадратів, погано вимиті та просушені пробірки і піпетки, недоброякісність реактивів, що викликають гемоліз.

Завдання: виконайте підрахунок кількості еритроцитів, згідно з запропонованим алгоритмом; результат запишіть; зробіть висновок щодо відповідності отриманого результату віковим нормам.

Робота 3. Розрахунок еритроцитарних індексів

Еритроцитарні індекси — це група показників, які розраховуються гематологічним аналізатором або за допомогою відповідних формул і використовуються для диференціальної діагностики анемій. Вони базуються на вимірюванні кількості еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту.

Якість еритроцитів характеризується їх середнім об'ємом (MCV), середнім вмістом гемоглобіну (MCH) і середньою концентрацією гемоглобіну (MCHC). Ці

параметри вимірюються безпосередньо за допомогою автоматичного аналізатора або розраховуються наступним чином:

1) Середній об'єм еритроциту (MCV) – обчислюється шляхом ділення гематокритної величини 1 мм³ крові на кількість еритроцитів у 1 мм³ за формулою:

$$MCV = \frac{\text{Гематокрит 1 мм}^3}{\text{Кількість еритроцитів в 1 мм}^3}$$

На практиці MCV обчислюють шляхом множення гематокриту (%) на 10 і діленням отриманого добутку на кількість еритроцитів в мільйонах в кубічному мілілітрі крові та виражають в фемтолітрах (фл):

$$MCV = \frac{\text{Гематокрит (\%)} \times 10}{\text{Кількість еритроцитів (млн. кл/мм}^3\text{)}}$$

2) Середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH) встановлюється за формулою:

$$MCH = \frac{\text{Гемоглобін (\%)} \times 10 (1 \text{ мм}^3)}{\text{Кількість еритроцитів (млн. кл/мм}^3\text{)}}$$

3) Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC) встановлюється за формулою:

$$MCHC = \frac{\text{Гемоглобін (г/дл)}}{\text{Гематокрит (\%)}}$$

Виражається в г/дл. MCH вказує на масу Hb в середньому еритроциті і виражається в частках грама. MCHC показує концентрацію Hb в середньому еритроциті, тобто співвідношення вмісту Hb до обсягу клітини. Відображає насичення еритроциту Hb. На відміну від MCH, MCHC не залежить від середнього клітинного обсягу.

Важливе діагностичне значення має RDW – ступінь варіації розмірів еритроцитів. Високий RDW вказує на значну різницю в розмірах еритроцитів,

тоді як низький RDW свідчить про однорідність. Ці варіації можуть дати зрозуміти основні проблеми зі здоров'ям, оскільки аномальні розміри еритроцитів часто корелюють із певними захворюваннями.

Існує два основних типи вимірювань RDW: RDW-CV (коефіцієнт варіації), який відображає стандартне відхилення розмірів еритроцитів відносно середнього розміру та RDW-SD (стандартне відхилення), який забезпечує абсолютне вимірювання варіабельності розміру еритроцитів у фемтолітрах.

При залізодефіцитній анемії високий RDW є поширеним явищем, оскільки дефіцит заліза викликає різні розміри еритроцитів. Дефіцит вітаміну B12 або фолієвої кислоти призводить до макроцитарної анемії з підвищеним рівнем RDW. RDW може підвищуватися при таких хронічних захворюваннях як діабет, серцева недостатність або запальні захворювання. Аномальні рівні RDW можуть сигналізувати про порушення функції печінки.

Завдання: використовуючи результати, отримані у лабораторних роботах 2 і 3, визначте еритроцитарні індекси; результати запишіть та зробіть висновки щодо відповідності цих результатів віковим нормам.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Що відображає показник осмотичної резистентності еритроцитів (ОРЕ)?
 - А) Кількість ретикулоцитів у периферичній крові.*
 - Б) Здатність еритроцитів протистояти руйнуванню в гіпотонічних розчинах.*
 - В) Середній вміст гемоглобіну в одному еритроциті.*
 - Г) Швидкість осідання еритроцитів у плазмі.*
2. При якій приблизній концентрації хлориду натрію (NaCl) зазвичай починається гемоліз (мінімальна резистентність) у здорової людини?
 - А) 0,6%–0,55%*
 - Б) 0,1%*

В) 0,9%

Г) 0,45%–0,52%

3. Який з еритроцитарних індексів використовується для класифікації анемій за розміром еритроцитів (мікроцитарна, нормоцитарна, макроцитарна)?

А) *RDW (Ширина розподілу еритроцитів).*

Б) *MCV (Середній об'єм еритроцита).*

В) *MCHC (Середня концентрація гемоглобіну).*

Г) *MCH (Середній вміст гемоглобіну).*

4. При якому патологічному стані зазвичай спостерігається зниження осмотичної резистентності еритроцитів?

А) *B12-дефіцитна анемія (мегалобластна).*

Б) *Апластична анемія.*

В) *Спадковий мікросфероцитоз.*

Г) *Залізодефіцитна анемія.*

5. Яка формула лежить в основі розрахунку середньої концентрації гемоглобіну в еритроциті (MCHC)?

А) *MCHC = Гематокрит / Кількість еритроцитів.*

Б) *MCHC = Кількість еритроцитів / Гематокрит.*

В) *MCHC = Гемоглобін / Гематокрит.*

Г) *MCHC = Гемоглобін / Кількість еритроцитів.*

6. Який з еритроцитарних індексів відображає ступінь анізоцитозу, тобто варіабельність розмірів еритроцитів у зразку крові?

А) *MCH.*

Б) *MCV.*

В) *RDW.*

Г) *MCHC.*

7. Який інструмент традиційно використовується для ручного підрахунку кількості еритроцитів при мікроскопічному дослідженні?

А) Камера Горяєва.

Б) Спектрофотометр.

В) Центрифуга.

Г) Гемометр Салі.

8. Який стан крові характеризується зниженням як середнього об'єму еритроцитів (MCV), так і середньої концентрації гемоглобіну (MCHC)?

А) Поліцитемія.

Б) Залізодефіцитна анемія.

В) Гемолітична анемія.

Г) В12-дефіцитна анемія.

9. Навіщо при ручному підрахунку еритроцитів кров розводять ізотонічним розчином (наприклад, 0,85% NaCl)?

А) Щоб запобігти гемолізу та агрегації еритроцитів, а також зменшити їх концентрацію для зручності підрахунку.

Б) Для прискорення їх осідання на дно камери Горяєва.

В) Для руйнування лейкоцитів, щоб не заважали підрахунку.

Г) Для забарвлення еритроцитів, щоб їх було краще видно.

10. Що означає, якщо у пацієнта виявлено підвищений показник RDW?

А) Наявність анізоцитозу (істотної різниці в розмірах еритроцитів).

Б) Низьку швидкість утворення нових еритроцитів.

В) Високий ризик розвитку тромбозу.

Г) Надмірну насиченість еритроцитів гемоглобіном (гіперхромію).

11. При якій концентрації NaCl гемоліз еритроцитів зазвичай повністю завершується (максимальна резистентність) у здорової людини?

А) 0,32%–0,28%.

Б) 0,44%.

В) 0,0% (дистильована вода).

Г) 0,9%.

Лабораторна робота 4

Тема: ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШКІРИ

Обладнання та матеріали: культура непатогенного штаму E.coly в МПБ, стерильні чашки Петрі з середовищем Ендо; автоматичний дозатор 10-200 мкл, лабораторний посуд, одноразові нітрилові; автоклав, термостат.

Короткі теоретичні відомості

Шкіра є першою лінією захисту організму, поєднуючи механічні, хімічні та біологічні бар'єри.

Механічний бар'єр формується за допомогою наступних структур. Епідерміс (роговий шар) – щільний, багат шаровий, зроговілий епітелій є основним фізичним щитом, він запобігає проникненню більшості мікроорганізмів, токсинів, хімічних речовин та захищає від механічних пошкоджень (тертя, тиск). Кератин – білок, що входить до складу рогового шару, забезпечує високу міцність і водонепроникність. Базальна мембрана – відокремлює епідерміс від дерми, запобігаючи проникненню чужорідних речовин у глибші шари.

Хімічний бар'єр формується за допомогою наступних структур. Кисла мантія (гідроліпідна мантія) – суміш шкірного сала, поту та продуктів розпаду кератину, яка покриває поверхню шкіри. Кисле середовище є несприятливим розмноження більшості патогенних бактерій та грибків. Секрет сальних залоз містить жирні кислоти, які мають бактерицидну та фунгіцидну дію. Секрет потових залоз містить лізоцим – фермент, що руйнує клітинні стінки бактерій.

Імунологічний та біологічний бар'єр забезпечується такими клітинами. Клітини Лангерганса – спеціалізовані імунні клітини в епідермісі (різновид дендритних клітин). Вони захоплюють антигени (бактерії, віруси) і транспортують їх до лімфатичних вузлів, запускаючи адаптивну імунну

відповідь. Резидентна мікрофлора – конкурентно пригнічує розмноження патогенних мікроорганізмів, займаючи екологічні ніші та виділяючи антимікробні речовини. Меланоцити – клітини, що виробляють меланін, який захищає ДНК клітин шкіри від пошкодження ультрафіолетовим випромінюванням.

Захист від втрати речовин та регуляція: запобігання дегідратації за рахунок ліпідного прошарку у роговому шарі (мінімізує трансепідермальну втрату води, підтримуючи внутрішній гомеостаз); захист від перегріву чи переохолодження (за допомогою потовиділення та зміни кровотоку) – терморегуляція.

Хід роботи

Завдання 1. Дослідження бактерицидних властивостей шкіри по відношенню до непатогенного штаму *E.coly*. Визначити бактерицидні властивості шкіри.

1) Обробити шкіру передпліччя стерильним ватяним тампоном, змоченим 1 млрд. суспензією добової культури *E.coli*. Звернути увагу на те, що ділянка шкіри, яку обробляють суспензією живих бактерій не повинна мати подряпин чи інших ушкоджень.

2) Через 5, 15 і 45 хв виконати забір з поверхні шкіри стерильним змоченим у дистильованій воді тампоном і зробити посів досліджуваного матеріалу на агар в чашці Петрі із середовищем Ендо. Для цього змоченим у дистильованій воді та витисненим до стінок пробірки стерильним ватним тампоном беруть матеріал для посіву і вносять у чашку, злегка відчинивши кришку. На поверхні живильного середовища матеріал розподіляють таким чином: з краю чашки частими штрихами утворюють овальний майданчик, на якому залишається значна частина матеріалу, потім проводять паралельні штрихи на відстані 0,5 см від одного краю чашки до іншого.

3) Чашку промаркірувати і розмістити вверх дном в термостат на 24-48 год за температури 37 °С. Ріст мікроорганізмів можна буде спостерігати приблизно через добу (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Приклад добової культури кишкової палички на середовищі Ендо. Чашка розділена на 4 сектори (контрольний, посів через 5 хв, посів через 15 хв, посів через 45 хв).

4) Підрахувати кількість колоній, що вирости через 24 год та через 48 год. Знайти різні типи колоній, визначити їх розмір, колір, форму, прозорість, характер поверхні (гладка, шорстка) і краю (рівний, зазублений). Ознаки колоній відмітити у протоколі.

6) Зробити висновок про бактерицидність шкіри.

Завдання 2. Дайте відповіді на запитання:

а) яким чином здійснюється природне видалення з поверхні шкіри мікробних та інших забруднень;

б) яка речовина забезпечує механічну міцність шкіри, у якому шарі шкіри вона розташована;

в) відмітьте ферменти, які входять до складу слини: 1) протеаза; 2) амілаза; 3) лактозопероксидаза; 4) ендонуклеаза; 5) ліпаза;

г) відмітьте білки, які входять до складу сироватки крові людини: 1) альбумін; 2) глобулін; 3) гемоглобін; 4) пепсин; 5) фібріноген;

д) назвіть клітини людського організму, здатні до фагоцитозу, вкажіть їхню локалізацію.

Зробіть висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Який структурний елемент шкіри є основним механічним бар'єром проти проникнення мікроорганізмів та зовнішніх загроз?

А) Роговий шар епідермісу.

Б) Сальні залози.

В) Підшкірна жирова клітковина.

Г) Дерма.

2. Яке значення має кисла реакція (pH 4,5–5,5) гідроліпідної мантії шкіри для її захисних властивостей?

А) Сприяє всмоктуванню водорозчинних вітамінів.

Б) Створює несприятливе середовище для розмноження патогенних бактерій.

В) Стимулює синтез колагену в дермі.

Г) Підтримує еластичність рогового шару.

3. Які спеціалізовані клітини в епідермісі відповідають за захоплення антигенів та запуск адаптивної імунної відповіді?

А) Кератиноцити.

Б) Меланоцити.

В) Клітини Меркеля.

Г) Клітини Лангерганса.

4. Який фермент, що міститься в секретах шкіри (поту), виконує бактерицидну функцію, руйнуючи клітинні стінки бактерій?

А) Ліпаза.

Б) Амілаза.

В) Пепсин.

Г) Лізоцим.

5. Яку захисну функцію виконує меланін, що виробляється меланоцитами шкіри?

А) Надає шкірі еластичності та пружності.

Б) Забезпечує регенерацію пошкоджених тканин.

В) Захищає ДНК клітин шкіри від пошкодження ультрафіолетовим випромінюванням.

Г) Регулює температуру тіла через потовиділення.

6. Як називається механізм, коли резидентна мікрофлора шкіри пригнічує ріст патогенних бактерій?

А) Фагоцитоз.

Б) Колонізаційна резистентність.

В) Аутофагія.

Г) Адаптивний імунітет.

7. Яку роль відіграє кератин у складі рогового шару епідермісу, посилюючи його захист?

А) Забезпечує високу механічну міцність та водонепроникність.

Б) Регулює проникність для лікарських речовин.

В) Запускає місцеву запальну реакцію.

Г) Забезпечує транспорт іонів та води через мембрану.

8. Який фактор найімовірніше знизить хімічні захисні властивості шкіри?

А) Часте миття шкіри лужним милом.

Б) Нанесення сонцезахисного крему з високим SPF.

В) Дієта з високим вмістом ненасичених жирних кислот.

Г) Посилене потовиділення під час фізичних навантажень.

9. До якого типу захисту (механічного, хімічного чи біологічного) належить функція базальної мембрани?

А) Біологічний бар'єр.

Б) Хімічний бар'єр.

В) Імунологічний бар'єр.

Г) Механічний бар'єр.

10. Що є основним компонентом шкірного сала, який забезпечує йому бактерицидні та фунгіцидні властивості?

А) Кератин.

Б) Вода.

В) Імуноглобуліни.

Г) Жирні кислоти.

Лабораторна робота 5

Тема: ЦЕНТРАЛЬНІ (ПЕРВИННІ) ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

Обладнання та матеріали: світловий мікроскоп, фіксовані мікропрепарати, гістологічний атлас.

Теоретичні відомості

До центральних імунних органів належать червоний кістковий мозок і тимус.

Червоний кістковий мозок — головний орган кровотворення. У новонароджених він заповнює всі кістковомозкові порожнини, а з 4–5 років заміщається жировою тканиною та перетворюється на жовтий кістковий мозок.

У дорослої людини червоний кістковий мозок зберігається лише в епіфізах довгих трубчастих кісток, у губчастих кістках і в губчастій речовині плоских кісток.

Червоний кістковий мозок має вигляд ніжної червоної маси і складається з мієлоїдної тканини, що містить ретикулярні волокна і стовбурові кровотворні клітини, які є родоначальниками всіх формених елементів крові. Ретикулярна тканина пронизана великою кількістю кровоносних судин, переважно капілярів, розширених у вигляді синусоїдів.

Процес гемопоезу (кровотворення) полягає в диференціюванні стовбурових клітин кісткового мозку за кількома напрямками: еритропоез — утворення еритроцитів; тромбоцитопоез — тромбоцитів; гранулопоез — гранулярних лейкоцитів; лімфоцитопоез — клітин імунної системи — лімфоцитів, які потім потрапляють у тимус, селезінку і лімфатичні вузли, де проходять подальшу диференціацію на Т- і В-лімфоцити.

Жовтий кістковий мозок міститься в діафізах трубчастих кісток і представлений переродженою ретикулярною тканиною, клітини якої містять ліпідні включення. На відміну від червоного кісткового мозку, не здійснює кровотворної функції, але при крововтратах і токсичних отруєннях у ньому з'являються стовбурові клітини з периферичної крові. На їх основі виникають вогнища гемопоезу. Отже, жовтий кістковий мозок - важливий резерв для червоного кісткового мозку. При крововтратах у нього заселяються гемопоетичні елементи, і він перетворюється на червоний кістковий мозок. Таким чином, жовтий і червоний кістковий мозок можна розглядати як два функціональних стани одного кровотворного органу.

Унікальною особливістю мікрооточення кісткового мозку є присутність там поліпотентних стовбурових клітин. Вихідною клітиною для всіх паростків кровотворення є стовбурова кровотворна клітина.

У розвитку клітин крові умовно виділяють класи клітин.

I - клас поліпотентних клітин-попередниць, включає стовбурові кровотворні клітини.

II - клас частково детермінованих поліпотентних клітин-попередниць.

III - клас уніпотентних клітин-попередниць, здатних до обмеженої самопідтримки (можуть існувати протягом 10-15 мітозів, потім гинуть).

IV - клас морфологічно проліферуючих клітин, які морфологічно відрізняються від попереднього класу, представлений бластними формами, що дають початок окремим рядам кровотворення - гранулоцитам, еритроцитам, моноцитам, мегакаріоцитам і лімфоцитам. Форма ядра бластних клітин, як правило, округла, рідше овальна або овально-витягнута. Ядро розташоване в центрі клітини або зміщене до одного з полюсів. Характерною особливістю клітин це переважання площі ядра над площею цитоплазми;

V - клас дозріваючих клітин;

VI - клас зрілих клітин з обмеженим життєвим циклом.

Стромою кісткового мозку є ретикулярна сполучна тканина, що утворює мікрооточення для кровотворних клітин. В даний час до елементів мікрооточення відносять також остеогенні, жирові, адвентиційні, ендотеліальні клітини і макрофаги.

Ретикулярні клітини завдяки своїм відросткам виконують механічну функцію, секретують компоненти основної речовини – преколлаген, глікозаміноглікани, проеластин, мікрофібрилярний білок і беруть участь у створенні кровотворного мікрооточення, специфічного для певних напрямків розвиваючих гемопоетичних клітин, виділяючи ростові фактори.

Остеогенні клітини також здатні виробляти ростові фактори, ініціювати родоначальні гемопоетичні клітини в місцях свого розташування до проліферації і диференціювання. Найбільш інтенсивно кровотворення відбувається поблизу ендоста, де концентрація стовбурових клітин приблизно

втричі вища, ніж у центрі кісткомозкової порожнини. Адипоцити є постійними елементами кісткового мозку.

Адвентиційні клітини супроводжують кровоносні судини і покривають більше 50% зовнішньої поверхні синусоїдних капілярів. Під впливом гемопоетинів (еритропоетин) та інших факторів вони здатні скорочуватися, що сприяє міграції клітин в кровотік.

Ендотеліальні клітини судин кісткового мозку беруть участь в організації стромы і процесів кровотворення, синтезують колаген IV типу, гемопоетини.

Макрофаги в кістковому мозку представлені неоднорідними за структурою і функціональними властивостями клітинами, але завжди багатими на лізосоми і фагосоми. Деякі з популяцій макрофагів секретують ряд біологічно активних речовин (еритропоетин, колонієстимулюючий фактор, інтерлейкіни, простагландини, інтерферон та ін.). Макрофаги за допомогою своїх відростків, що проникають через стінки синусів, вловлюють з кровотоку залізовмісні з'єднання (трансферин) і далі передають його еритробластним клітинам, що розвиваються для побудови гемінової частини гемоглобіну.

Основні властивості та характеристики стовбурової кровотворної клітини:

1. Поліпотентність – здатність диференціюватися в різних напрямках і утворювати всі типи клітин крові і лімфи;
2. Самопідтримка – здатність зберігати в процесі ділення пул стовбурової кровотворної клітини;
3. Рециркуляція – здатність стовбурової кровотворної клітини виходить в кровоплин, потім після циркуляції в крові повертатися у різні кровотворні органи;
4. Стовбурові кровотворні клітини знаходяться поза мітотичного циклу, вкрай рідко діляться, не відповідають на чинники диференціювання, тому кровотворення підтримується за рахунок їх нащадків;

5. Низька концентрація стовбурових кровотворних клітин в кровотворних органах (1:103) і крові (1:104).

У загально-біологічному сенсі, термін «стовбурова клітина», має здатність до самопідтримання популяції і одночасного диференціювання у бік того чи іншого клону. У червоному кістковому мозку при поділі материнської стовбурової клітини крові утворюється одна клітина за всіма властивостями тотожна материнській і одна уніпотентна напівстовбурова, що дає початок певному виду формених елементів крові.

Тимус — центральний орган імуногенезу, в якому відбувається розмноження та дозрівання (антигеннезалежна диференціація) Т-лімфоцитів. У тимусі виробляються тимозин, тимулін, тимопоетин та інші регуляторні пептиди, які забезпечують дозрівання та проліферацію Т-лімфоцитів у центральних та периферійних органах імуногенезу, а також низку інших біологічно-активних речовин: інсуліноподібний фактор (знижує рівень цукру в крові), кальцитоніноподібний фактор (знижує рівень кальцію в крові), фактор росту (забезпечує ріст тіла).

Тимус людини складається із двох частин. Основу становить видозмінена епітеліальна тканина, представлена епітеліоретикулоцитами. Від сполучнотканинної капсули всередину відходять перегородки, що розділяють залозу на часточки. У кожній часточці розрізняють коркову і мозкову речовину. Коркова речовина містить велику кількість Т-лімфоцитів. Нові генерації лімфоцитів з'являються в тимусі кожні 6–9 год.

У корковій частині часточки тимуса компактно розміщені малі й середні лімфоцити в оточенні макрофагів та епітеліоретикулоцитів, а також Т-лімфобласти, останні локалізуються переважно в субкапсулярній зоні. Епітеліоретикулоцити, макрофаги та дендритні клітини часто називають клітинами-няньками, оскільки вони створюють мікрооточення і необхідні умови

для дозрівання Т-лімфоцитів. У коркову частину тимуса з червоного кісткового мозку переносяться попередники Т-лімфоцитів. Тут відбувається їх проліферація, дозрівання під впливом тимозину, який продукують епітеліоретикулоцити, і вибіркового фагоцитозу частини новоутворених клітин макрофагами.

Тільки 3-5 % клітин виходять з тимуса. Інші гинуть шляхом апоптозу. Селекція лімфоцитів відбувається за участю епітеліоретикулоцитів. Виживають клітини, які не реагують на власні білки головного комплексу гістосумісності МНС, а клітини, що мають рецептори до власних антигенів організму, гинуть. Відібрані Т-лімфоцити мігрують у мозкову речовину, звідки можуть надходити у периферійний кровотік.

Мозкова речовина тимуса утворена диференційованими Т-лімфоцитами. Тут лімфоцити розміщені менш компактно, порівняно з корковою зоною. Лімфоцити з мозкової частини потрапляють у кровотік по венулах та виносних лімфатичних судинах.

Характерною морфологічною ознакою тимуса є наявність в мозковій речовині особливих концентричних нашарувань епітеліальних клітин (тілець Гассала).

Лімфоцити коркової частини тимуса відмежовані від просвіту гемокапілярів так званим гематотимусним бар'єром, утвореним суцільним шаром епітеліоретикулоцитів. Цей бар'єр закриває доступ антигенам з судинного русла до лімфоцитів, що дозрівають в корковій речовині, які мають циторецептори до власних антигенів організму, що запобігає розвитку автоімунних реакцій. У мозковій речовині тимуса такий бар'єр відсутній, що створює передумови для рециркуляції Т-лімфоцитів.

Протягом усього життя людини у тимусі відбуваються зміни, які отримали назву вікової інволюції. Остання полягає у поступовому заміщенні паренхіматозних елементів тимуса жировою та пухкою сполучною тканиною,

збагаченні тільцями Гассала при майже незмінній загальній масі органа. У віковій інволюції тимуса розрізняють чотири фази: швидку (до 10-річного віку), повільну (у проміжку з 10 до 25 років), прискорену (від 25 до 40 років) і сповільнену (після 40 років). Швидкість вікової інволюції тимуса значною мірою визначається гормональним статусом організму.

Хід роботи

Робота 1. Дослідження структури та функцій кісткового мозку.

Завдання 1. Розгляньте мікрофотографії кісткового мозку (рис. 5.1–5.3). Розгляньте зразок тканин кісткового мозку під мікроскопом. Складіть схему фрагменту кісткового мозку

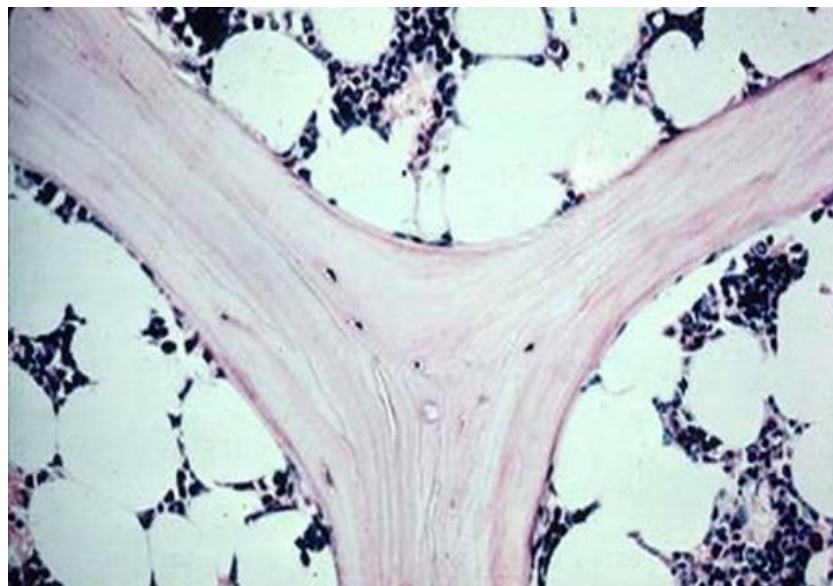


Рис. 5.1. Світлова мікрофотографія червоного кісткового мозку. В центрі поля зору оксифільна кісткова трабекула, що утворює грубу строму органу. Міжтрабекулярний простір заповнений ретикулярною тканиною (ніжна строма) та мієлоїдною і лімфоїдною тканиною (паренхіма органа). Найінтенсивніше гемопоез відбувається саме біля ендосту кісткових трабекул, так як остеобласти здатні активувати гемопоез, виділяючи різні класи гемопоетинів.

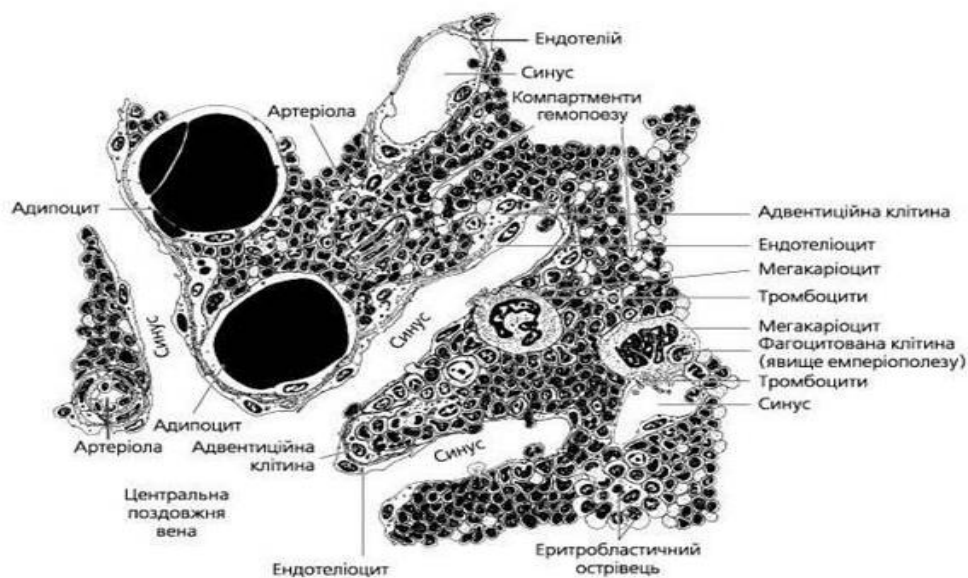


Рис. 5.2. Схематичне відтворення фрагменту червоного кісткового мозку.

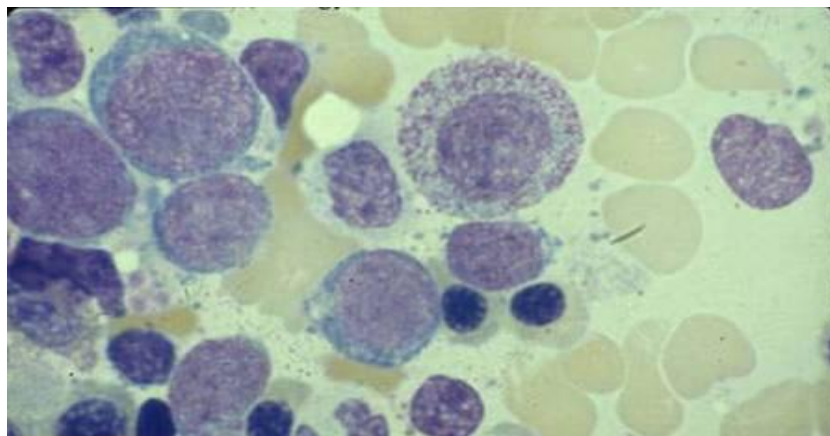


Рис. 5.3. Світлова мікрофотографія фрагмента червоного кісткового мозку. Забарвлення згідно Романовського-Гімзі. У верхньому лівому кутку – група промієлоцитів. Вгорі в центрі зображення – нейтрофільний мієлоцит. Під ним – група клітин еритробластичного ряду.

Робота 2. Дослідження структури та функцій тимусу

Завдання 1. Розгляньте мікрофотографії тимусу (рис. 5.4–5.8). Розгляньте зразок тканин тимусу під мікроскопом. Визначте на знімку часточку тимусу, сполучнотканинні перегородки, коркову та мозкову зони тимусу.

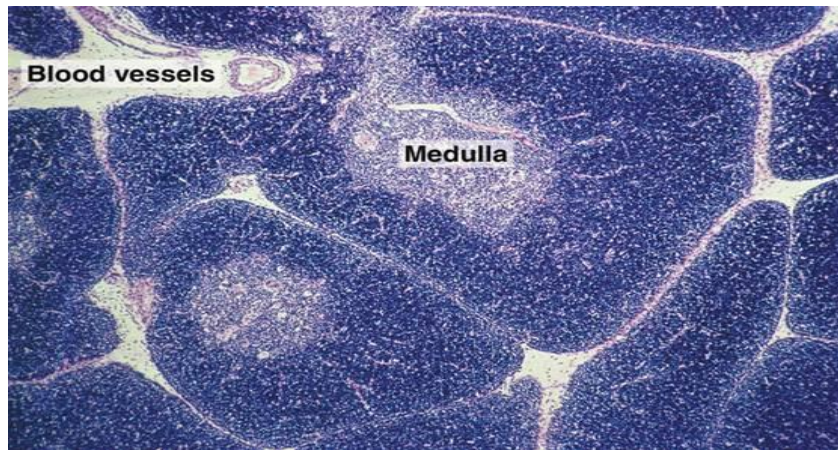


Рис. 5.4. Мікрофотографія фрагменту тимуса. В кожній часточці видно центральну світлу зону – мозкову речовину і периферійну темну, інтенсивно базофільну – кіркову речовину. Між часточками знаходяться септи – сполучнотканинні перегородки. Зabarвлення гематоксиліном-еозином.

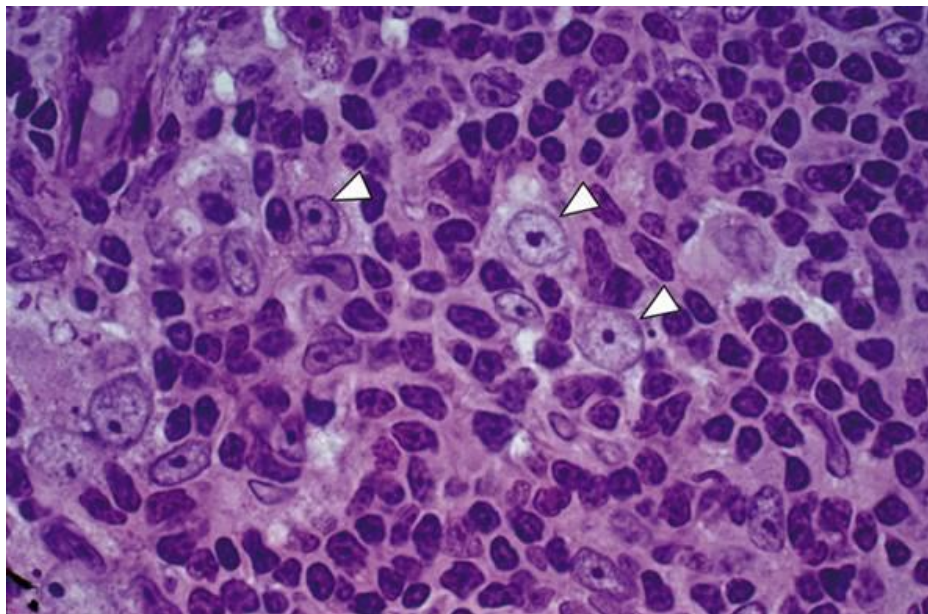


Рис. 5.5. Мікрофотографія кіркової речовини тимуса. Стрілками показані ядра стромальних клітин – епітеліоретикулоцитів. Зabarвлення гематоксиліном-еозином.

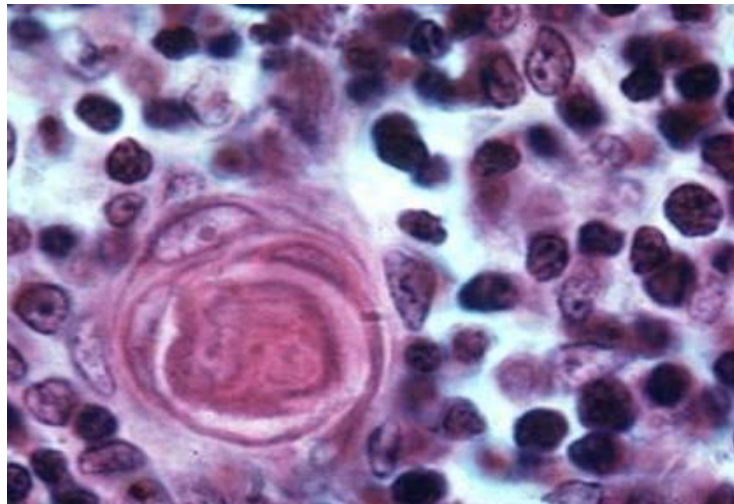


Рис. 5.6. Світлова мікрофотографія мозкової речовини часточки тимуса із сформованим тільцем Гассаля. В центрі епітеліального тільця видно клітинний детрит, оточений концентрично нашарованими епітеліо-ретикулярними клітинами. Зabarвлення гематоксиліном-еозином.

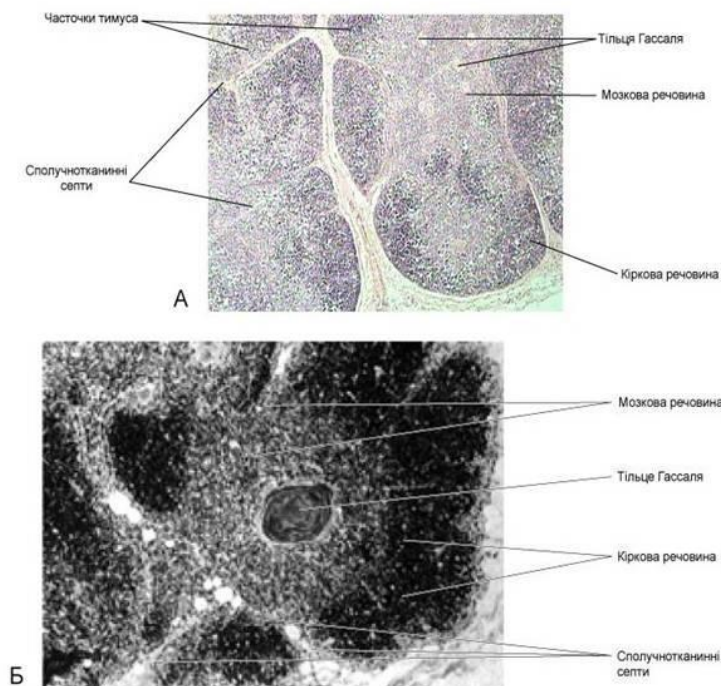


Рис. 5.7. Світлова мікроскопія тимуса: А – загальний план будови часточок; Б – фрагмент часточки тимуса дитини із сформованим тільцем Гассаля в мозковій речовині.

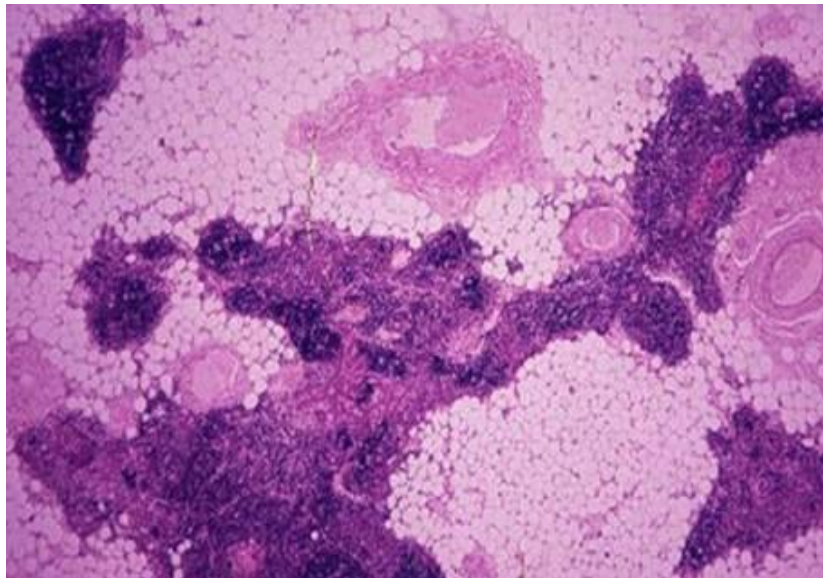


Рис. 5.8. Світлова мікрофотографія тимуса чоловіка 40 років. Забарвлення гематоксиліном-еозином. Внаслідок вікової інволюції відбулось заміщення паренхіматозних та стромальних елементів органу білою жирОВОЮ тканиною.

Робота 3. Розв'яжіть ситуаційні задачі:

1. На препараті є зріз трубчастої кістки дитини 3-5 років, юнака 12-18 років і літньої людини. Як з віком змінюється стан і топографія червоного кісткового мозку?

2. У лабораторному експерименті провели тимектомію (видалення тимуса) у новонароджених мишей. Через 2 місяці після операції у крові тварин виявлено значне зниження кількості Т-лімфоцитів, знижену відповідь на введення чужорідного білка, тоді як у контрольної групи таких змін не було. Яке значення має тимус для дозрівання Т-клітин? Чому видалення тимуса в неонатальному періоді викликає серйозні імунні порушення? Чи виникли б подібні ефекти при тимектомії у дорослих мишей? Чому?

3. Групі мишей провели експериментальне опромінення, після чого було проведено гістологічне дослідження кісткового мозку. Виявлено значне зниження кількості стовбурових клітин, зменшення загальної клітинності, підвищений вміст жирової тканини. Рівень циркулюючих клітин крові також

значно знижений. Які функції виконує червоний кістковий мозок у фізіології ссавців? Чому при опроміненні спостерігається зменшення кількості формених елементів крові? Які потенційні механізми відновлення клітинного складу кісткового мозку після пошкодження?

4. Під час культивування стовбурових клітин крові *in vitro* без участі клітин стромы тимуса не відбувалося формування зрілих Т-лімфоцитів. При додаванні тимоцитів і епітеліальних клітин тимуса спостерігалось утворення функціональних Т-клітин. Чому мікрооточення є критично важливим для дозрівання і диференціації імунних клітин? Які типи клітин тимуса створюють сприятливе середовище для дозрівання тимоцитів?

Зробіть висновки до виконаної роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Які два органи належать до центральних (первинних) органів імунної системи?

- А) Печінка і нирки.*
- Б) Селезінка і лімфатичні вузли.*
- В) Мигдалики і пейєрові бляшки.*
- Г) Червоний кістковий мозок і тимус.*

2. Яка основна функція червоного кісткового мозку як центрального органу імунної системи?

- А) Головний орган кровотворення, де утворюються стовбурові кровотворні клітини — родоначальники всіх формених елементів крові.*
- Б) Антигензалежна проліферація лімфоцитів.*
- В) Забезпечення диференціювання стовбурових клітин до зрілих Т-лімфоцитів.*
- Г) Депонування крові та руйнування старих еритроцитів.*

3. Які клітини є родоначальниками всіх формених елементів крові, включаючи імунні клітини, і розташовані в червоному кістковому мозку?

А) Стовбурові кровотворні клітини.

Б) Еритроцити.

В) Клітини стромы.

Г) Зрілі Т- і В-лімфоцити.

4. Яке найважливіше значення має тимус (загруднинна залоза) для імунної системи?

А) Участь у згортанні крові.

Б) Фільтрація лімфи та захоплення антигенів.

В) Місце дозрівання та селекції Т-лімфоцитів.

Г) Виробництво антитіл (імуноглобулінів).

5. Яка тканина утворює основу червоного кісткового мозку і містить стовбурові кровотворні клітини?

А) Хрящова тканина.

Б) Епітеліальна тканина.

В) Жирова тканина.

Г. Мієлоїдна тканина.

6. Чому культивування стовбурових клітин крові *in vitro* без участі клітин стромы тимуса не призводить до формування зрілих Т-лімфоцитів?

А) Клітини стромы тимуса регулюють надходження кисню в середовище.

Б) Клітини стромы тимуса продукують чинники, необхідні для проліферації В-лімфоцитів.

В) Клітини стромы тимуса створюють спеціалізоване мікрооточення і продукують гормони (тимозини), необхідні для диференціювання Т-клітин.

Г) Клітини стромы тимуса фагоцитують попередники Т-лімфоцитів.

Лабораторна робота 6

Тема: ПЕРИФЕРИЧНІ (ВТОРИННІ) ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

Обладнання та матеріали: світловий мікроскоп, фіксовані мікропрепарати, гістологічний атлас.

Теоретичні відомості

Периферичними імунними органами вважають селезінку та лімфатичні вузли. До периферичної частини імунного захисту відносять також лімфоїдну тканину слизових оболонок (MALT) та лімфоїдну систему шкіри (SALT). Лімфоцити розміщуються дифузно у пухкій сполучній тканині або формують лімфатичні вузлики. До лімфоїдної тканини шкіри належать внутрішньоепідермальні лімфоцити та дендритні клітини, що формують імунний захисний бар'єр.

У вторинних лімфоїдних органах відбувається антигензалежна диференціація і проліферація субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів, які формують конкретну імунну відповідь організму.

Селезінка – непарний орган, розміщений у черевній порожнині. У селезінці кровоносна система тісно взаємодіє з лімфоїдною тканиною, завдяки чому кров тут збагачується свіжим запасом лейкоцитів, які розвиваються в селезінці. Кров, що проходить через селезінку, звільняється завдяки фагоцитарній діяльності макрофагів селезінки від віджиганих червоних кров'яних тілець («цвинтар» еритроцитів) і від хвороботворних мікробів, які потрапили в кров'яне русло, сторонніх часток і т. ін.

Розміри селезінки можуть досить значно змінюватися в однієї й тої ж людини, залежно від більшого чи меншого наповнення судин кров'ю. В середньому довжина селезінки дорівнює 12 см, ширина 8 см, товщина 3-4 см, маса близько 170 г (100-200 г). Під час травлення спостерігається збільшення

селезінки. Колір селезінки на поверхні темно-червоний з фіолетовим відтінком. За формою селезінку порівнюють з кавовим зерном. На вісцеральній увігнутій поверхні, на ділянці, що прилягає до шлунку, є поздовжня борозна – ворота, через які в селезінку входять судини і нерви. Позаду від увігнутої ділянки знаходиться поздовжньо розташована плоска ділянка, так як тут селезінка стикається з лівими наднирником і ниркою (рис. 6.1).

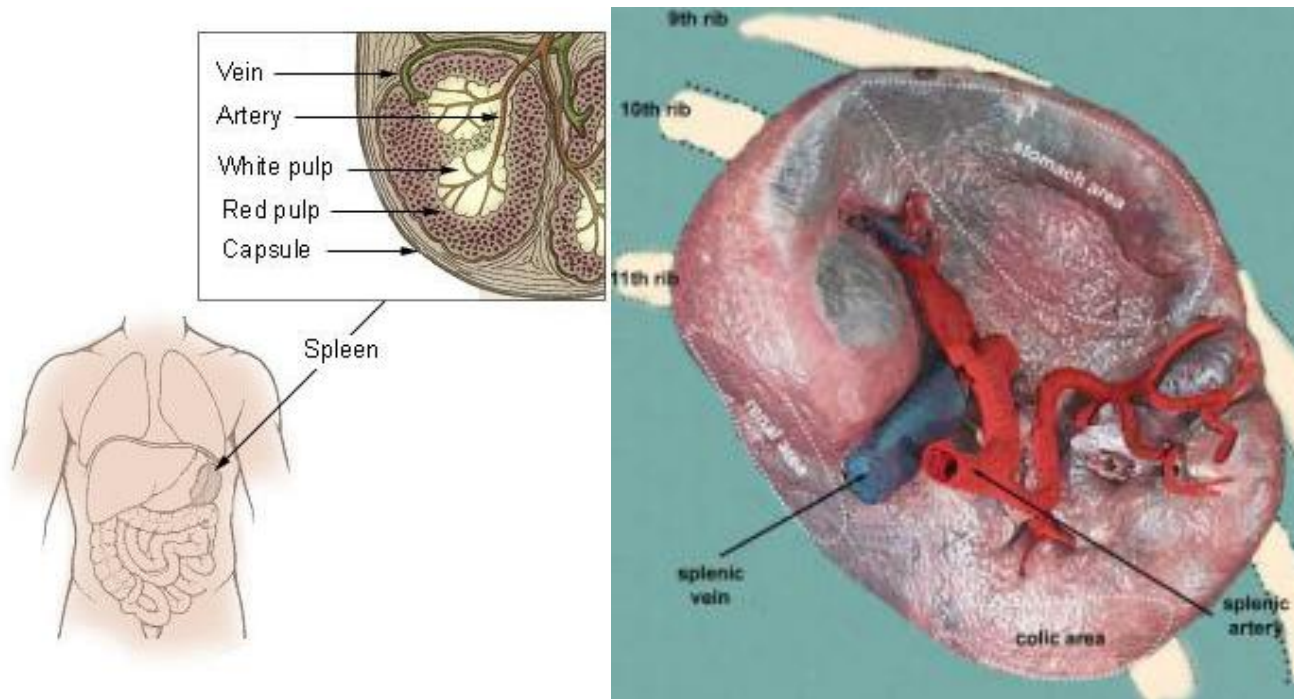


Рис. 6.1. Топографія селезінки

Селезінка зовні вкрита серозною оболонкою, що складається з одного шару мезотеліальних клітин, під нею розташовується фіброзна оболонка від якої відходять сполучнотканинні перетинки - трабекули. Між трабекулами знаходиться паренхіма – пульпа селезінки.

Пульпа має темно-червоний колір. На свіжозробленому розрізі в пульпі видно більш ясно пофарбовані вузлики. Вони представляють собою лімфоїдні утворення круглої або овальної форми, що сидять на стінках артеріальних гілочок. Розрізняють білу і червону пульпу.

Біла пульпа складається в основному з лімфоцитів, на неї припадає від 6 до 20% ваги селезінки. Між вільними клітинами білої пульпи (лімфоцити,

моноцити, макрофаги і незначна кількість гранулоцитів) розташовуються ретикулярні волокна, які виконують опорну функцію.

Червона пульпа складається з ретикулярного остова, артеріол, капілярів, синусового типу венул і вільних клітин (еритроцитів, тромбоцитів, лімфоцитів, плазматичних клітин), а також нервових сплетень, на неї припадає від 70 до 80% ваги селезінки.

У лімфоїдній тканині селезінки містяться лімфоцити, що беруть участь в імунологічних реакціях. У пульпі здійснюється загибель частини формених елементів крові, термін діяльності яких минув. Залізо гемоглобіну із зруйнованих еритроцитів направляється по венах в печінку, де служить матеріалом для синтезу жовчних пігментів.

Лімфатичні вузли розташовані на шляхах протікання лімфи від органів і тканин організму до лімфатичних стовбурів і проток. Вони є біологічними фільтрами, в яких знешкоджуються антигени, відбувається антигензалежна проліферація і диференціація Т- і В-лімфоцитів і формується конкретна імунна відповідь на їхню дію.

Лімфатичні вузли найчастіше мають бобоподібну форму. Вони розташовані в пухкій сполучній тканині, найчастіше групами, у яких налічується до кількох десятків вузлів. Вузли, які приймають лімфу від певної ділянки організму, називаються ділянковими лімфатичними вузлами. Вони поділяються на пристінкові, нутрощеві та змішані. Відповідно у пристінкові лімфатичні вузли впадають приносні лімфатичні судини від шкіри, підшкірної клітковини і опорно-рухового апарату, в нутрощеві – від внутрішніх органів, а в змішані вузли – від тіла і внутрішніх органів.

Лімфатичний вузол вкритий сполучнотканинною капсулою, від якої вглиб органа відходять трабекули. Трабекули утворюють своєрідний сполучнотканинний каркас. У трабекулах проходять судини і нерви. Простір між

трабекулами заповнений строною, що утворена ретикулярними клітинами і ретикулярними волокнами. У цій сітці зі строми розташована лімфоїдна паренхіма, що складається з клітин лімфоїдного ряду, макрофагів тощо (рис. 6.2).

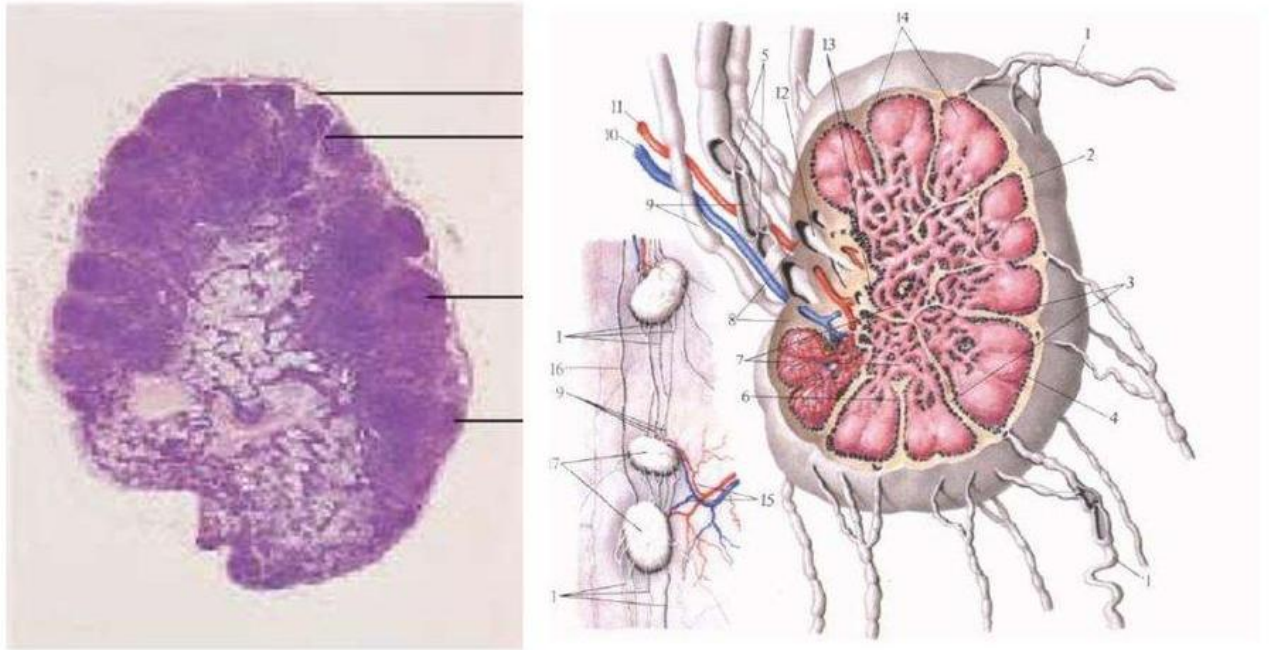


Рис. 6.2. Лімфатичний вузол (гістологічний препарат та схема будови).

У найопуклішу частину лімфатичного вузла впадає 4–8, а інколи й більше приносящих лімфатичних судин. З протилежного боку вузол має невелике втиснення – ворота лімфатичного вузла, через які проходять кровоносні судини і нерви, а також виходять 2–4 виносні лімфатичні судини, що прямують до наступного лімфатичного вузла або лімфатичного колектора.

Паренхіма лімфатичного вузла складається з коркової і з мозкової речовин. Вона пронизана численними вузькими каналами – лімфатичними проміжними пазухами, по яких лімфа протікає від крайової пазухи до ворітної пазухи. Між ендотеліоцитами, що вистеляють лімфатичні пазухи, можуть проникати з паренхіми лімфатичного вузла в лімфу і навпаки лімфоцити, макрофаги та інші клітини. У просвіті пазух міститься дрібнопетлиста сітка,

утворена з ретикулярних волокон і клітин. У петлях цієї сітки можуть затримуватись сторонні частинки (вугільний і тютюновий пил), мікроби, злаякісні клітини тощо, які потрапили в лімфатичний вузол разом з лімфою. Часточки пилу переносяться макрофагами в паренхіму лімфатичного вузла і там відкладаються. Залишки зруйнованих клітин, що потрапили в лімфу, знищуються, а із злаякісних клітин можуть виникати вторинні пухлини – метастази.

У периферійній частині кори розташовані численні лімфоїдні вузлики діаметром 0,5–1 мм – це скупчення лімфоїдних клітин, в основному В-лімфоцитів, тому ці структури називають В-залежними зонами. Розрізняють первинні лімфоїдні вузлики, які не мають зародкового центру, або центру розмноження, бо щільність лімфоцитів у них однакова і вторинних лімфоїдних вузликів із зародковим центром, або центром розмноження. У центрах розмноження відбувається антигензалежна проліферація і диференціація різноманітних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Там є багато лімфобластів і клітин, що мітотично поділяються, а також середніх лімфоцитів, тому на гістологічних препаратах ці центри видаються світлішими. Периферійна частина лімфоїдних вузликів називається крайовою зоною, або плащовою зоною. На гістологічних зрізах крайова зона забарвлена інтенсивніше (темніше), бо щільно заповнена малими і середніми лімфоцитами. Через крайову зону постійно мігрують лімфоїдні клітини, макрофаги та інші клітини. Зокрема, «молоді» плазматичні клітини виходять із центра розмноження і мігрують через паракортикальну зону у мозкові тяжі, де вони контактують з іншими лімфоцитами, макрофагами і ретикулярними клітинами, обмінюючись з ними відповідною інформацією. Кількість вторинних лімфоїдних вузликів із центром розмноження збільшується після дії антигенів.

Частина периферійної кори, що розміщена між лімфоїдними вузликами і крайовою пазухою, називається підкапсульною частиною, або крайовою

частиною. Дифузна лімфоїдна тканина, яка розміщена між лімфоїдними вузликами, утворює міжвузликову частину. Тут розташовані в основному малі і середні лімфоцити. Глибокі відділи кіркової речовини, що межують з мозковою речовиною, називаються прикірковою ділянкою, раніше її називали паракортикальною зоною. Це Т-залежна зона, бо там містяться переважно малі субпопуляції Т-лімфоцитів. Характерною морфологічною особливістю цієї зони є наявність в ній численних венул з високим ендотелієм, через які здійснюється рециркуляція лімфоцитів у паренхімі лімфатичного вузла із крові.

Паренхіма мозкової речовини представлена мозковими тяжами, які мають різноманітну форму і напрямок, а на гістологічному зрізі утворюють складні переплетення і острівці. У мозкових тяжах переважають В-лімфоцити. Зокрема, там розташовані «зрілі» плазмочити, які виконують свою основну функцію – синтезують антитіла, обов'язковою є також присутність макрофагів.

У структурних компонентах лімфатичних вузлів постійно відбуваються процеси міграції, диференціації та проліферації субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів. Значна частина лімфоцитів з лімфою через виносні лімфатичні судини потрапляє у наступний лімфатичний вузол або у лімфатичні стовбури і протоки, що впадають у венозні судини. У подальшому лімфоцити рециркулюють із крові у вторинні лімфоїдні органи і тканини.

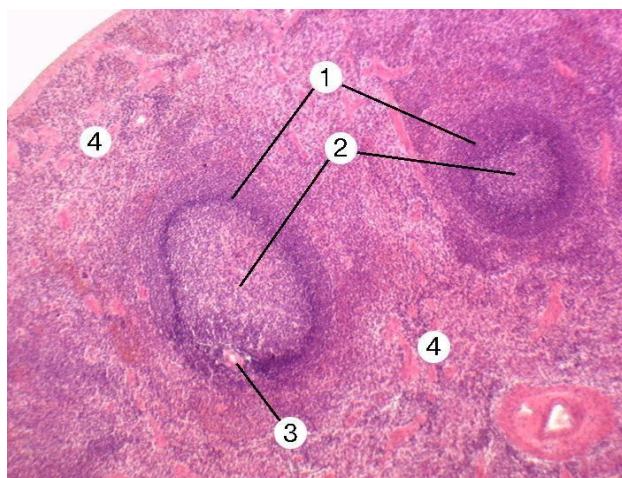
Розрізняють неспецифічну захисну функцію лімфатичних вузлів за рахунок елімінації мікробів з лімфи і специфічну, що виражається в імунній відповіді на антигени. Ці органи виконують і кровотворну функцію. Хоча стовбурові клітини в них практично відсутні, але проліферація лімфобластів, диференціювання В-лімфоцитів у плазмочити відбувається. Лімфа, протікаючи через лімфатичні вузли, збагачується лімфоцитами.

Паракортикальна зона лімфатичного вузла знаходиться на кордоні між кірковою і мозковою речовиною. Вона називається тимусзалежною зоною, або Т-зоною, так як при видаленні тимуса відбувається її зникнення. У

паракортикальній зоні здійснюються трансформації Т-лімфоцитів, їх проліферація і перетворення у спеціалізовані клітини системи імунітету. Тут багато дендритних клітин. На своїй поверхні вони несуть антигени і представляють їх Т-лімфоцитам (хелперам). Крім того, в цій зоні знаходяться особливі венули, вистелені ендотеліоцитами кубічної форми. Через стінку цих венул відбувається перехід Т-і В-лімфоцитів з крові в строму лімфатичного вузла.

Лімфа протікає через лімфатичні вузли по синусах – порожнинах, що містять ретикулярну тканину, обмежені капсулою і трабекулами з одного боку і вузликами і мозковими тяжами – з іншого. У просвіті синусів виявляються ретикулярні клітини, макрофаги, лімфоцити, плазматичні клітини.

Завдання 1. Розгляньте під мікроскопом тканини селезінки, мікрофотографії тканин селезінки. Визначте локалізацію червоної та білої



пульпи, фолікулів (рис. 6.3).

Рис. 6.3. Селезінка.

Завдання 2. Розгляньте під мікроскопом лімфатичний вузол кішки, пацюка, мікрофотографії лімфатичних вузлів. Позначте відповідні структури (капсулу, трабекули, коркову зону, паракортикальну зону, фолікули, медулярну зону) на знімках, зроблених за допомогою мікроскопа (рис. 6.4).

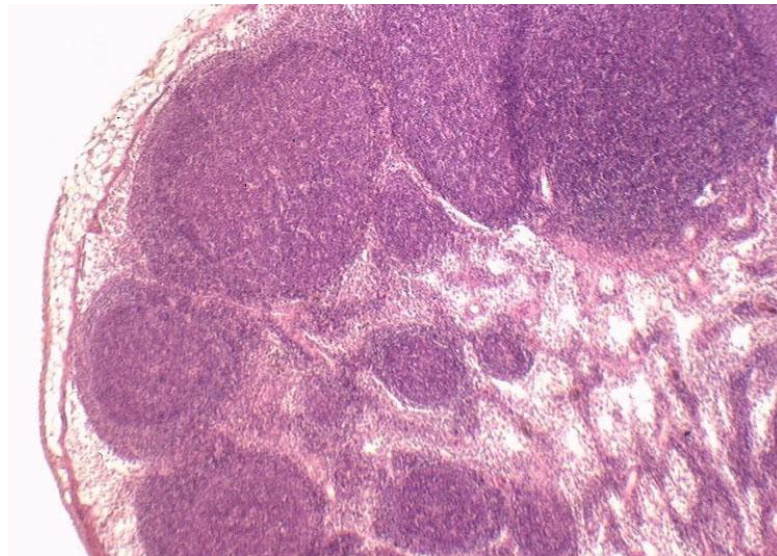


Рис. 6.4. Лімфатичний вузол

Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Які два органи є основними периферичними (вторинними) органами імунної системи?
 - А) Селезінка і лімфатичні вузли.*
 - Б) Печінка і підшлункова залоза.*
 - В) Червоний кістковий мозок і тимус.*
 - Г) Шкіра та слизові оболонки.*
2. Яка основна функція білої пульпи селезінки?
 - А) Руйнування старих еритроцитів і тромбоцитів.*
 - Б) Фільтрація лімфи та збагачення її лімфоцитами.*
 - В) Місце антигензалежної проліферації лімфоцитів та формування імунної відповіді на антигени, що надійшли з кров'ю.*
 - Г) Депонування заліза та синтез білків плазми.*
3. Яка зона лімфатичного вузла є тимусзалежною і відповідає за проліферацію та трансформацію Т-лімфоцитів?
 - А) Коркова зона.*
 - Б) Паракортикальна зона.*

В) Мозкова зона.

Г) Капсула.

4. Яка структура лімфатичного вузла відповідає за фільтрацію лімфи і містить макрофаги, що захоплюють антигени?

А) Лімфатичні вузлики.

Б) Центральна артерія.

В) Трабекули.

Г) Синуси.

5. Яка ділянка лімфатичного вузла є місцем локалізації переважно В-лімфоцитів та містить гермінативні центри (центри розмноження) під час активної імунної відповіді?

А) Паракортикальна зона.

Б) Мозкові тяжі.

В) Коркова речовина (лімфатичні вузлики).

Г) Ворота вузла.

6. Які клітини, розташовані в паракортикальній зоні лімфатичного вузла, захоплюють і презентують антигени Т-лімфоцитам (хелперам)?

А) Т-лімфоцити.

Б) Плазматичні клітини.

В) Дендритні клітини.

Г) Еритроцити.

7. Що відбувається у вторинних лімфоїдних органах після зустрічі лімфоцитів з антигеном?

А) Утворення стовбурових кровотворних клітин.

Б) Антигензалежна диференціація і проліферація субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів.

В) Руйнування імунних комплексів.

Г) Синтез еритроцитів та тромбоцитів.

8. Яка з перелічених лімфоїдних структур належить до лімфоїдної тканини слизових оболонок (MALT)?

А) Базальна мембрана шкіри.

Б) Пейєрові бляшки в кишечнику.

В) Червона пульпа селезінки.

Лабораторна робота 7

Тема: ГРУПОВІ АНТИГЕНИ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ. ВИЗНАЧЕННЯ ГРУПИ КРОВІ (СИСТЕМИ АВ0) ЗА ДОПОМОГОЮ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ТА СТАНДАРТНИХ СИРОВАТОК

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

Теоретичні відомості

Антиген (АГ) — це будь-яка речовина, яка, потрапляючи в організм, здатна викликати специфічну імунну відповідь.

Ключові властивості антигенів: імуногенність — здатність антигену викликати імунну відповідь, тобто стимулювати утворення антитіл або сенсibilізованих лімфоцитів; специфічність — здатність антигену вибірково взаємодіяти лише з тими антитілами або рецепторами Т-лімфоцитів, які були сформовані у відповідь на його введення.

Структурні елементи антигену: епітопи (або антигенні детермінанти) — найменші частини макромолекули антигену, які розпізнає імунна система і з

якими безпосередньо зв'язується активний центр антитіла (паратоп) або Т-клітинний рецептор (TCR); високомолекулярний носій – виконує роль каркасу, визначає просторову структуру антигена.

Гаптени – це низькомолекулярні сполуки, які мають специфічність, але не мають імуногенності самі по собі. Вони можуть набути імуногенності лише якщо ковалентно зв'язуються з великою молекулою-носієм (зазвичай білком).

Здатність речовини бути імуногенною залежить від:

1. Чужорідності - що більша різниця між молекулою і власними молекулами організму, то вища імуногенність.
2. Хімічного складу – найкращими імуногенами є білки, потім полісахариди, потім ліпіди та нуклеїнові кислоти.
3. Молекулярної маси – із зростанням молекулярної маси зростає імуногенність антигена.
4. Складності структури – складніші структури (третинна/четвертинна) з різноманітними епітопами є сильнішими імуногенами.
5. Дози і способу введення – оптимальна доза та наявність ад'ювантів (речовин, що підсилюють імунну відповідь) можуть посилити імуногенність.

Розпізнавання антигенів відбувається за допомогою специфічних рецепторів.

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

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

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

Система АВ0 представлена двома груповими антигенами А і В (аглютиногенами) та груповим олігосахаридом Н, останній знаходиться на еритроцитах групи 0 і не має антигенної детермінанти (рис. 7.1). У межах антигену А спостерігається дальша антигенна диференціація на підгрупи А1, А2 та інші. Різновиди антигену В з'являються дуже рідко. У сироватці крові людей без відповідного антигену наявні природні (постійні, регулярні) антитіла класу IgM до групових антигенів А і В: анти-А (α (альфа)) та анти-В (β (бета)). Таким чином, різні співвідношення групових антигенів еритроцитів та алоантитіл (ізоаглютинінів) сироватки крові дають чотири групи крові: $0\alpha\beta$, (II) $A\beta$ з підгрупами $A1\beta$ та $A2\beta$, (III) $B\alpha$, (IV) $AB0$ з підгрупами $A1B0$ та $A2B0$.

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

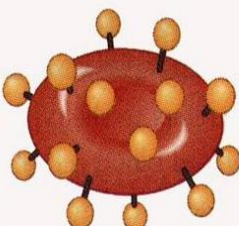
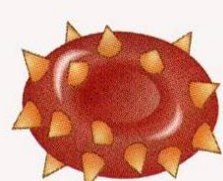
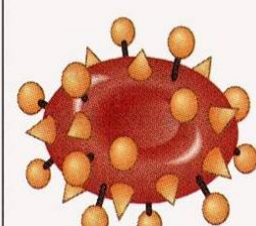
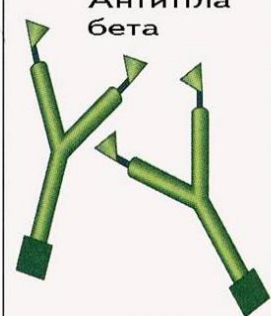
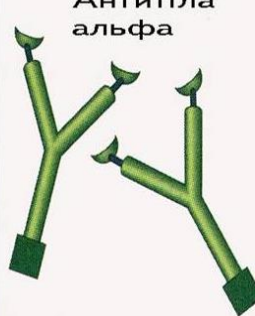
	II	III	IV	I
Еритроцити	Антигени А 	Антигени В 	Антигени А і В 	Антигени Н 
Плазма	Антитіла бета 	Антитіла альфа 	Антитіла відсутні 	Антитіла альфа і бета 

Рис. 7.1. Розподіл антигенів (аглютиногенів) та аглютининів у системі АВ0.

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

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

Хід роботи

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

Визначення груп крові ціклонами – порівняно новий метод дослідження. Для здійснення лабораторного дослідження не потрібно багато

часу, достатня наявність всіх необхідних хімічних речовин (цоліклони) і простого обладнання (рис. 7.2).



Рис. 7.2. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Цоліклони по суті є одним з видів імуноглобулінів (тип М). Це моноклональні антитіла, які були утворені за допомогою генної інженерії. Цоліклони отримані в результаті впливу сироватки на стерильних лабораторних мишей. Утворюється скупчення рідини в черевній порожнині гризуна, яка містить ці антитіла.

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

У сучасній лабораторній діагностиці використовується три види стандартних цоліклонів для визначення групи крові і резус фактора. Реагент

типу «Анти-А» забарвлений в червоний колір, також пофарбований і флакон, ковпачок або етикетка флакона. Тип «Анти-В» забарвлюється синім, а «Анти-АВ» не позначається кольоровим маркером.

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

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

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

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

Стерильною паличкою реагенти змішують з біологічним зразком.

Спостерігати за ходом реакції з моноклональними реагентами візуально при легкому погойдуванні пластини або планшету протягом 3-5 хв. Аглютинація еритроцитів зазвичай настає у перші 3-5 сек, але спостереження слід вести протягом 5 хв, бо можливий більш повільний початок аглютинації з еритроцитами, що містять слабкі різновиди антигенів.

Як зрозуміти результат

Результат реакції в кожній краплі може бути позитивним або негативним. Позитивний результат виражається в аглютинації (склеюванні) еритроцитів. Аглютинацію видно неозброєним оком у вигляді дрібних червоних агрегатів, що швидко зливаються у великі пластівці або в один великий аглютинат (рис. 7.3-7.5).

- Відсутність будь-якої реакції склеювання у всіх зразках означає, що в клітинах еритроцитів пацієнта немає аглютиногена досліджуваного типу. Зразок крові зараховується до I групи (тип 0).

- Якщо еритроцитарні клітини пацієнта вступили в реакцію з реагентами типу «Анти-А» і «Анти-АВ», то у пацієнта II група крові (тип А).
- Помітна аглютинація зразка досліджуваної крові з реагентами типу «Анти-АВ» і «Анти-В» означає, що пацієнт має III групу крові (тип В).
- Якщо кров пацієнта вступила в реакцію з усіма реагентами, то досліджуваний зразок належить до IV групі (тип АВ).

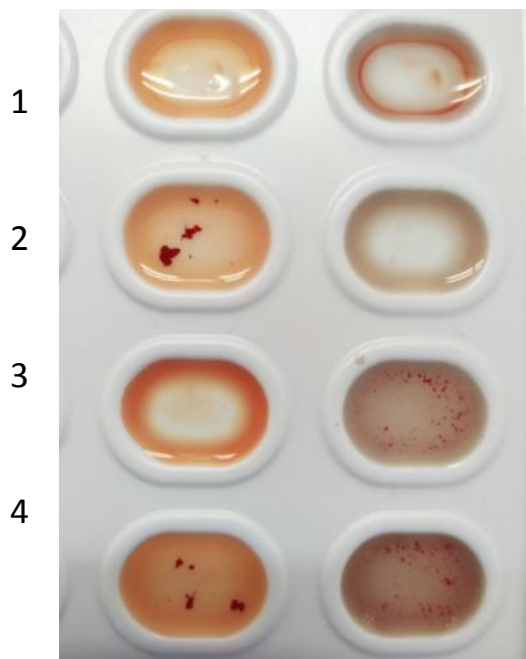


Рис. 7.3. Аглютинація еритроцитів різних груп крові за допомогою моноклональних реагентів анти-А та анти-В.

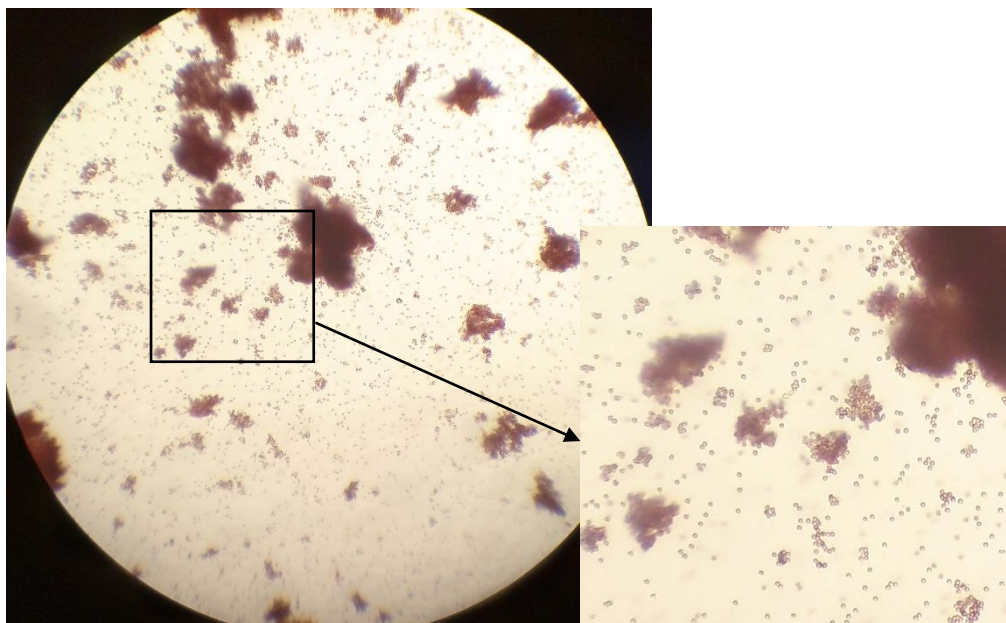


Рис. 7.4. Аглютинація еритроцитів моноклональним реагентом анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

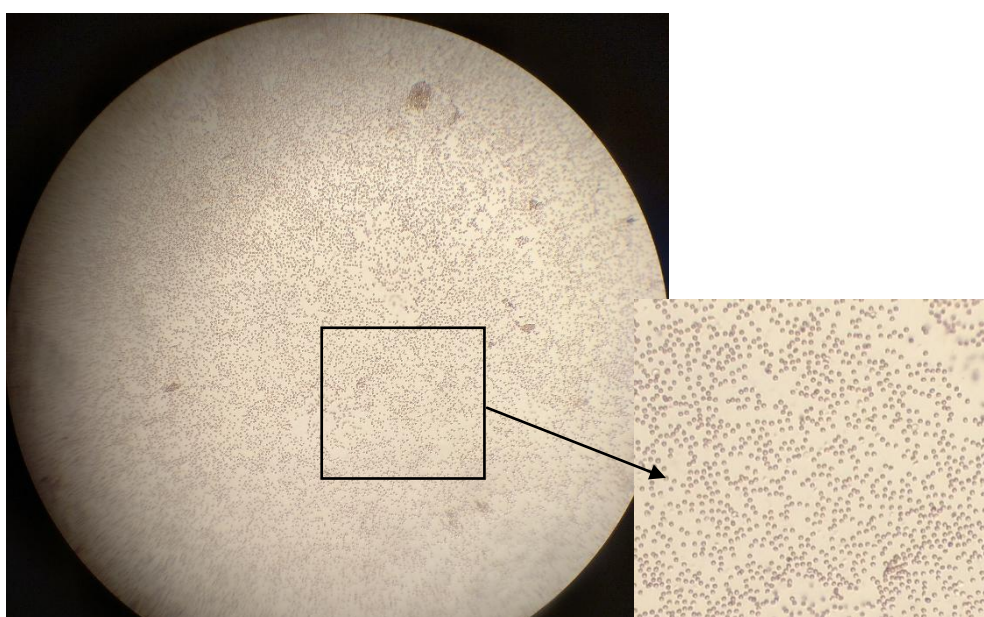


Рис. 7.5. Відсутність аглютинації еритроцитів при невідповідності антигенів еритроцитів та моноклонального реагента анти-А. Світлова мікроскопія, мале збільшення.

При позитивному результаті реакції аглютинації з усіма моноклональними реагентами необхідно виключити спонтанну неспецифічну

аглотинацію досліджуваних еритроцитів. Для цього необхідно змішати на площині 1 краплю досліджуваної крові (еритроцитів) з 1 краплею фізіологічного розчину. Кров можна віднести до IV групи тільки за відсутності аглотинації еритроцитів у фізіологічному розчині.

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

Завдання. Виконайте дослідження групи крові за допомогою моноклональних реагентів анти-А, анти-В, анти-АВ.

Робота 2. Визначення групи крові за допомогою стандартних сироваток

Визначення групи крові проводять у добре освітленому приміщенні при температурі від +15 до +20 °С (рис. 7.6).



Рис. 7.6. Підготовка реагентів для виконання дослідження

Сироватку наносять на пластину повздовжніми рядами: I крапля - 0 (I), II крапля - А (II), III крапля – В (III). У кожену краплю додають еритроцити досліджуваної крові. Так поступають з двома серіями сироваток. Краплини

перемішують скляною паличкою, погойдуючи, спостерігають 5 хвилин (рис. 7.7).



Рис. 7.7. Аглютинація еритроцитів різних груп крові за допомогою стандартних сироваток. Примітка: у правому нижньому кутку – контрольне дослідження зі стандартною сироваткою АВ (IV) групи крові.

Як зрозуміти результат

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

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

Завдання. Виконайте визначення групи досліджуваної крові/еритроцитів.

Використовуючи отримані відомості, заповніть таблицю.

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

Примітка: знаком «плюс» позначте наявність аглютинації, знаком «мінус» - відсутність.

Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Яка з перелічених властивостей антигенів означає здатність речовини викликати імунну відповідь, тобто стимулювати утворення антитіл або сенсibilізованих лімфоцитів?

- A) Специфічність.
- B) Толерогенність.
- C) Імуногенність.
- D) Антигенність.

2. Який структурний компонент антигену є найменшою частиною, що безпосередньо розпізнається імунною системою (зв'язується з антитілом або TCR)?

- A) Гаптен.*
- B) Молекула-носії.*
- C) Епітоп (антигенна детермінанта.*
- D) Гідрофобний домен.*

3. Гаптени — це низькомолекулярні сполуки, які самі по собі є:

- A) Імуногенними та специфічними.*
- B) Неімуногенними, але специфічними.*
- C) Неімуногенними та неспецифічними.*
- D) Імуногенними, але неспецифічними.*

4. Які антигени (аглютиногени) системи ABO розташовані на поверхні еритроцитів особи з III групою крові?

- A) Тільки A.*
- B) Тільки B.*
- C) A і B.*
- D) Жодного.*

5. Які антитіла (аглютиніни) системи ABO містяться у плазмі крові особи з II групою крові?

- A) Тільки alpha.*
- B) Тільки beta.*
- C) alpha і beta.*
- D) Жодного.*

6. Яка група крові (за системою ABO) колись використовувалась як універсальний реципієнт (людина, яка теоретично може приймати кров усіх груп), і чому?

- A) I – не містить антигенів на еритроцитах.*

B) IV – не містить антитіл у плазмі.

C) II – містить антиген A, що є найменш реактивним.

D) IV – містить обидва антигени (A і B) на еритроцитах.

7. Чому при переливанні крові від донора I групи реципієнту з II групою не відбувається масивна аглютинація?

A) Еритроцити донора I групи містять антигени, які є толерантними для II групи.

B) У плазмі реципієнта II групи відсутні антитіла beta.

C) Антитіла (alpha і beta) донора сильно розводяться в крові реципієнта і не встигають викликати масивну аглютинацію.

D) Антитіла донора є неспецифічними.

8. Яка група крові характеризується наявністю alpha і beta аглютинінів у плазмі та відсутністю аглютиногенів на еритроцитах?

A) I.

B) II.

C) III.

D) IV.

Лабораторна робота 8

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ГРУПИ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ ПЕРЕХРЕСНОГО МЕТОДУ

Обладнання і матеріали: пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички гумові, нирковидні лотки, стандартні еритроцити підгруп O(I), A(II), B(III), стандартні сироватки I, II, III, IV груп двох серій, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

Теоретичні відомості

Стандартні еритроцити готують із крові донорів. Кров від донорів беруть у кількості 2-4 мл у пробірку, що містить 0,25-0,50 мл 3,8 % або 5,0 % розчину натрію цитрату, або гепарин, або консервант крові. Далі в пробірку (на 10,0 мл) до верху доливають 0,9 % розчин натрію хлориду, перемішують її вміст і центрифугують протягом 5 хв. при швидкості обертання ротора 1500 об./хв., або відстоюють до повного осадження еритроцитів. Надосад зливають, додають 0,9 % розчин натрію хлориду до початкового об'єму крові і використовують як стандарт при визначенні групи крові перекресним методом. Стандартні еритроцити зберігають у холодильнику при температурі $+6 \pm 2$ °C. Термін зберігання - до 3 діб.

Стандартні тест-еритроцити можна одержати в готовому вигляді в закладах служби крові, які виготовляють ці стандарти.

Хід роботи

Визначення групи крові перекресним методом базується на паралельному визначенні наявності або відсутності групових антигенів на еритроцитах і наявності або відсутності групових ізоаглютининів у сироватці обстежуваної крові. Паралельне визначення ізоаглютининів у сироватці з стандартними еритроцитами А та В обов'язкове у донорів і реципієнтів.

Для визначення групи крові використовують стандартні сироватки груп О(I), А(II) і В(III) двох серій кожної групи, сироватку групи АВ0(IV) і стандартні еритроцити груп О(I), А(II) і В(III).

Під відповідними позначками груп крові на пластинку наносять по одній великій краплі (0,1 мл) стандартних сироваток груп О(I), А(II) і В(III) послідовно зліва направо.

На нижню частину пластинки (третій ряд) під відповідними написами наносять по одній маленькій (0,01 мл) краплі стандартних еритроцитів у такій

послідовності зліва направо: O(I), A(II) і B(III). З пробірки, що містить кров досліджуваного, піпеткою знімають сироватку і наносять її по одній великій краплі (0,1 мл) на підготовлені стандартні еритроцити (третій ряд). Після цього тією ж піпеткою набирають з дна пробірки еритроцити обстежуваної крові і наносять їх по маленькій краплі (0,01 мл) в 6 точок (другий і перший ряд) - по одній краплі поряд з кожною краплею підготовленої стандартної сироватки.

У всіх краплях сироватку старанно перемішують з еритроцитами чистою скляною паличкою. Пластинку періодично погойдують, проводячи спостереження за ходом реакції протягом 5 хв. У процесі аглютинації, але не раніше ніж через 3 хв., в ті краплі, в яких вона з'явилася, додають по одній краплі (0,05 мл) 0,9 % розчину натрію хлориду і продовжують спостереження при погойдуванні пластинки до 5 хв.

Як зрозуміти результат

Трактування результатів реакцій проводять за оцінкою і співставленням результатів, отриманих за допомогою стандартних сироваток (два верхні ряди) і за допомогою стандартних еритроцитів (нижній ряд).

Результати реакцій, отриманих за допомогою стандартних сироваток і стандартних еритроцитів, повинні співпадати, тобто вказувати на наявність аглютиногенів та аглютинінів відповідно до однієї й тієї ж групи крові.

При встановленні групи крові AB(IV) необхідно провести контрольне дослідження цих еритроцитів з сироваткою групи AB(IV). Підтвердженням належності до цієї групи є відсутність аглютинації.

Завдання. Визначте групи двох зразків крові за допомогою перехресного методу. Встановіть, чи може один із досліджуваних бути донором для іншого? Відповідь обґрунтуйте.

Сформууйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Який антикоагулянт або консервант використовується для забору донорської крові при приготуванні стандартних еритроцитів?
- A) 0,9% розчин натрію хлориду.*
 - B) 3,8% розчин калію хлориду.*
 - C) Натрію цитрат або гепарин.*
 - D) Гідрохлоридна кислота.*
2. Після змішування донорської крові з 0,9% розчином натрію хлориду (сольовим розчином) з метою осадження еритроцитів, центрифугування проводиться протягом:
- A) 3 хвилин при 3000 об./хв.*
 - B) 10 хвилин при 500 об./хв.*
 - C) 5 хвилин при 1500 об./хв.*
 - D) До повного осадження без центрифугування.*
3. На якому принципі базується визначення групи крові перехресним методом?
- A) Лише на визначенні наявності групових антигенів на еритроцитах.*
 - B) Лише на визначенні наявності групових ізоаглютининів у сироватці.*
 - C) На паралельному визначенні антигенів на еритроцитах і ізоаглютининів у сироватці обстежуваної крові.*
 - D) На визначенні лише резус-фактора.*
4. Через який мінімальний час спостереження, дозволяється додавати 0.9% розчин натрію хлориду в ті краплі, де з'явилася аглютинація?
- A) Не раніше, ніж через 1 хв.*
 - B) Не раніше, ніж через 3 хв.*
 - C) Відразу після перемішування.*
 - D) Після закінчення 5 хв.*
5. Який результат є обов'язковим для підтвердження належності крові до IV групи за перехресним методом?

А) Відсутність аглютинації еритроцитів обстежуваної крові з сироваткою I групи.

В) Аглютинація еритроцитів обстежуваної крові з сироваткою I групи.

С) Аглютинація стандартних еритроцитів А з сироваткою обстежуваної крові.

Д) Відсутність аглютинації в усіх краплях.

6. Що є головною умовою для правильної трактовки результатів, отриманих за допомогою стандартних сироваток та стандартних еритроцитів?

А) Аглютинація повинна бути сильно виражена у всіх випробуваннях. В) Аглютинація повинна настати не пізніше, ніж через 1 хв.

С) Результати реакцій, отриманих обома методами, повинні співпадати, вказуючи на ту саму групу крові.

Д) Додавання NaCl повинно припинити аглютинацію.

Лабораторна робота 9

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗУС-НАЛЕЖНОСТІ КРОВІ

Обладнання і матеріали: пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, ізотонічний фізіологічний розчин, рукавички гумові, нирковидні лотки, центрифужні або будь-які інші тонкостінні пробірки ємністю 10 - 15 мл; пробірки висотою 2-2,5 см і діаметром 0,5-0,6 см з гладким дном заокругленої форми або планшети з заглибинами такої ж конфігурації; водяна баня при температурі від 46 до 48 °С; лупа з 6 - 8-кратним збільшенням; термостат (37° С); 10 % розчин желатину (желатин можна зберігати з консервантами: натрію сульфацилом (альбуцидом) з розрахунку 100 мг альбуциду на 10 мл 10 % розчину желатину або з натрію азидом з розрахунку 10 мг на 10 мл 10 % розчину желатину); стандартні

сироватки груп двох серій з неповними антитілами; стандартні сироватки антирезус з повними антитілами; контрольні еритроцити + і – фенотипу; моноклональні реагенти анти-D Супер, анти-E, анти-C Супер; капілярна або венозна кров, або еритроцити.

Теоретичні відомості

Система резус включає 3 пари антигенів еритроцитів: D і d, C і c, E і e, які генетично зумовлені і представлені трьома парами алеломорфних генів на парі хромосом. Різні комбінації антигенів системи Rh на поверхні еритроцитів створюють 18 теоретично можливих фенотипів, тобто груп крові за системою Rh.

У трансфузіологічній практиці підлягають обліку, в першу чергу, три антигени – D, C і E. Особливе значення має антиген D, який є сильним імуногеном. Ці антигени можуть знаходитися на еритроцитах людей разом або окремо, утворюючи сім різних співвідношень, а також можуть бути взагалі відсутніми (генотип ccddee). Ці відмінності дозволяють умовно розділити еритроцити людей на 8 груп. З них 4 групи, в яких знаходиться антиген D, є резус-позитивними (Rh+), а 4 групи, які не мають антигену D, - резус-негативними.

На відміну від системи AB0, у сироватці крові людей практично не буває природних антитіл до антигенів системи Rh. Антитіла системи Rh мають виключно імунний характер і утворюються в результаті Rh-несумісної трансфузії чи вагітності.

Врахування груп крові за системою Rh є важливим для практики трансфузійної медицини.

Визначення резус-належності проводять у реакції аглютинації за допомогою алоімунних сироваток або моноклональних реагентів.

Визначення резус-належності крові донорів проводять у два етапи: спочатку кров донорів досліджують стандартною сироваткою анти-D або моноклональними реагентами анти-D-супер, а потім кров тих донорів, які дали негативну реакцію з сироваткою анти-D, досліджують додатково із стандартними сироватками антирезус, що містять, крім анти-D, антитіла анти-C і анти-E. Антитіла анти-C і анти-E можуть знаходитись у сироватці як у чистому вигляді, так і в суміші з антитілами D, наприклад: анти-D + C, анти-D + E або анти-D + C + E.

Таблиця 9.1

Найбільш поширені групи крові за системою резус серед європейського населення

Резус-позитивні (Rh+) 86 %	Резус-негативні (Rh-) 14 %
CDE	Cde
CDe	Cde
cDE	cdE
cDe	CdE

Дослідження фенотипу резус необхідно проводити у жінок з підозрою на ізосенсибілізацію та у вагітних жінок з підозрою на резус-конфліктну вагітність.

Сироватки антирезус виготовляють звичайно у вигляді універсальних, тобто позбавлених групових антитіл. Такі сироватки придатні для визначення резус-належності крові людей будь-якої групи за системою AB0. Однак за певних обставин сироватки антирезус виготовляють з крові різних груп за системою AB0. У цих випадках у разі визначення резус-фактора необхідно враховувати групову специфічність сироватки. Сироваткою антирезус групи 0(I) визначається резус-фактор тільки в еритроцитах групи 0(I); сироваткою антирезус групи A(II) визначається резус-фактор тільки в еритроцитах 0(I) і A(II); сироваткою антирезус групи B(III) визначається резус фактор тільки в еритроцитах груп 0(I) і B(III); сироваткою антирезус групи AB(IV) і спеціально

виготовленою - універсальною, визначається резус-фактор в еритроцитах групи АВ(IV) і будь-якої іншої групи крові.

Під час кожного дослідження для перевірки специфічності і активності сироватки антирезус необхідно ставити контроль.

Для контролю застосовують стандартні резус-позитивні еритроцити групи О(I) або тієї ж групи, що і досліджувана кров, і стандартні резус-негативні еритроцити обов'язково тієї ж групи, що і досліджувана кров.

Стандартні сироватки для визначення резус-належності можуть мати різні за формою резус-антитіла - повні і неповні. Кожні з цих антитіл активні тільки в особливих умовах, тому методика визначення резус-фактора залежить від того, які резус-антитіла знаходяться в стандартній сироватці.

Визначення резус-фактора обов'язково треба проводити двома серіями стандартних сироваток антирезус. Якщо стандартні сироватки активні в різних умовах (наприклад, одна з них містить повні антитіла і тому активна в сольовому середовищі, а друга містить неповні антитіла і активна в колоїдному середовищі - в желатині або поліглюкіні), то визначення резус-належності слід проводити різними методами, як вказано в супровідній інструкції для кожної серії сироватки.

Таким чином, метод визначення резус-фактора залежить від форми резус-антитіл у стандартній сироватці та способу її виготовлення. Видаючи сироватку антирезус, до неї прикладають коротку супровідну інструкцію з описом того методу, для якого призначена ця сироватка.

Під час визначення резус-належності двома серіями стандартних сироваток у тих випадках, коли вони використовуються різними методами, результат враховують як вірогідний за умови співпадання його в обох серіях досліджень після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність кожної серії сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної

групи і наявності аглютинації зі стандартними резус-позитивними еритроцитами однойменної або групи O(I) і в контрольних пробах без сироватки (реагенту) антирезус.

Якщо під час визначення резус-належності спостерігається слабка або сумнівна реакція, то слід повторно досліджувати кров даної особи тими ж та іншими серіями сироватки антирезус або моноклональними реагентами, а також використовувати сироватку, що вміщує повні антитіла.

Якщо за таких умов усі серії сироваток, що містять неповні антитіла, дадуть також слабку або сумнівну реакцію, а з повними антитілами реакція буде негативною, це означає, що еритроцити мають слабку різновидність антигену резус, так званий фактор D^U , який зустрічається в популяції з частотою близько 1 %. У цих випадках резус-належність крові хворого або вагітної жінки оцінюють, як резус-негативну (Rh-), а резус-належність крові донора - як резус-позитивну (Rh+), не допускаючи, таким чином, переливання його крові резус-негативним реципієнтам.

Інколи зустрічаються зразки еритроцитів, що дають слабку виражену реакцію. У цих випадках слід повторно досліджувати їх кількома серіями сироваток антирезус високої активності або моноклональними антитілами (реагенти анти-D-супер).

Для визначення резус-належності крові донорів недостатньо розділення їх тільки на резус-позитивних і резус-негативних за сироваткою анти-D(Rh₀), а необхідно додатково досліджувати сироватками, що мають антитіла анти-C і анти-E, або моноклональними антитілами.

До резус-негативних донорів зараховують тільки тих осіб, кров яких не має жодного з вказаних антигенів.

Визначення антигенів резус-C, E, c і e проводять сироватками, що мають антитіла відповідної специфічності, або моноклональними реагентами. Ці

антитіла можуть бути в сироватці як у чистому вигляді, так і в різних співвідношеннях.

Ці дослідження проводять тими ж методами, що і визначення резус-фактора - D. Як позитивний контроль використовують стандартні еритроцити, що мають відповідний антиген.

Хід роботи

Робота 1. Визначення резус-належності за допомогою реакції конглютинації із застосуванням желатину (в пробірці з підігрівом до 46 – 48 °C).

Попередня обробка досліджуваної крові і стандартних еритроцитів: кров для дослідження слід брати в кількості 2-5 мл в пробірку без стабілізатора. Звичайно після зсідання крові на дні пробірки лишається невелика кількість вільних еритроцитів, які слід використовувати для дослідження. Якщо цих еритроцитів недостатньо, слід струснути згусток для відділення більшої кількості еритроцитів. Якщо брати кров з 3,8-5,0 % розчином натрію цитрату (0,25 мл натрію цитрату на 1 мл крові), гепарином або іншим стабілізатором, еритроцити необхідно відмити. Для цього в пробірку доливають до верху 0,9 % розчин натрію хлориду, вміст її перемішують і центрифугують при 1500 об./хв протягом 5 хв за кімнатної температури. Для дослідження потрібно використовувати відмиті еритроцити. Для визначення резус-належності кров можна брати з місця проколу пальця скляною паличкою і негайно вводити в пробірку з сироваткою антирезус, змішаною з желатином у співвідношенні 1:2. Для визначення резус-належності кров можна зберігати в холодильнику протягом трьох діб за температури $+6 \pm 2$ °C.

Техніка визначення: у разі використання двох серій сироватки антирезус у штативі розміщують три ряди центрифужних або будь-яких інших пробірок (об'ємом не менше 10 мл) у кожному ряді: досліджуваний зразок еритроцитів і по дві пробірки для стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів. В перші пробірки кожного ряду вводять по одній краплі (0,05 мл) досліджуваних еритроцитів, а в контрольні - по одній краплі (0,05 мл) стандартних (Rh_0^+) і (Rh_0^-) еритроцитів.

У всі пробірки додають по дві краплі (0,1 мл) 10 % розчину желатину, попередньо підігрітого до розчинення на водяній бані при температурі від 46 до 48 °С.

У всі пробірки першого ряду додають по одній краплі (0,05 мл) сироватки антирезус однієї серії, у всі пробірки другого ряду – по 1 краплі (0,05 мл) сироватки антирезус другої серії. Третій ряд є контролем для виключення можливого неспецифічного склеювання досліджуваних еритроцитів, наприклад, за рахунок ауто-, теплових або холодних антитіл, і туди сироватку антирезус не додають.

Вміст пробірок перемішують струшуванням, і штатив з пробірками ставлять на водяну баню при температурі від 46 до 48 °С на 5-10 хв або в сухо-повітряний термостат при тій же температурі на 30 хв.

Після виймання пробірок з водяної бані або з термостату до них додають 5-8 мл 0,9 % розчину натрію хлориду і перемішують вміст шляхом 1–2-кратного перекидання пробірок.

Як зрозуміти результат

Пробірки переглядають на світлі неозброєним оком або через лупу з двократним збільшенням. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів. За умови позитивного результату аглютинати легко розрізняються у вигляді червоних грудочок на прозорому, майже знебарвленому, тлі рідини. За умови негативного результату в пробірці видно

рівномірно забарвлену рідину. Зразки еритроцитів, що дали аглютинацію з сироваткою анти-D(Rh₀), є резус-позитивними (Rh₀+). Зразки еритроцитів, що не дали аглютинації з сироваткою анти-D(Rh₀), - резус-негативні (Rh₀).

Результати враховують як вірогідні за умови співпадання їх в обох серіях сироватки антирезус і після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної групи і наявності аглютинації зі стандартними резус-позитивними еритроцитами однойменної групи і групи 0(I). У пробірках третього (контрольного) ряду аглютинації не повинно бути. Наявність аглютинації в будь-якій пробірці контрольного ряду свідчить про неспецифічність реакції. За цих умов позитивний результат з сироваткою антирезус не може бути врахований як вірогідний. У таких випадках для визначення резус-належності слід використовувати сироватку антирезус з повними антитілами або попередньо відмити еритроцити теплим 0,9 % розчином натрію хлориду для вимивання з них аутоантитіл. За сумнівного результату необхідно проводити мікроскопічне дослідження.

Робота 2. Визначення резус-належності за допомогою стандартного універсального реагенту (в пробірках без підігріву)

Попередня обробка досліджуваної крові не потрібна. Може бути використана кров, взята безпосередньо перед дослідженням з місця уколу пальця, консервована кров і осад еритроцитів в пробірці після утворення згустку крові, взятої без стабілізатора. Дозволяється зберігати кров протягом 3 діб за температури $+6 \pm 2$ °C.

Техніка виконання: у штатив ставлять 2 ряди пробірок з досліджуваних зразків еритроцитів у кожному ряді і по 2 пробірки для контрольних досліджень - стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів. У

всі пробірки 1-го ряду вносять по 2 краплі (0,1 мл) стандартного універсального реагенту антирезус. У всі пробірки 2-го ряду вносять по 2 краплі (0,1 мл) 0,9 % розчину натрію хлориду і по одній краплі (0,05 мл) 33 % розчину поліглюкіну.

У кожену пару пробірок вносять по 1 краплі (0,05 мл) досліджуваної крові, стандартних резус-позитивних і резус-негативних еритроцитів.

Вміст пробірок перемішують струшуванням і потім поволі повертають, нахилиючи майже до горизонтального положення так, щоб вміст розпливався по стінках. Таке розпливання крові по стінках пробірок робить реакцію більш вираженою. Як правило, аглютинація настає вже протягом першої хвилини, але для утворення стійкого комплексу антиген-антитіло і чітко вираженої реакції, а також зважаючи на можливість сповільненої реакції у разі слабкої аглютинабельності еритроцитів, контакт еритроцитів з реагентом при повертанні пробірок має тривати не менше 3 хв. Через 3 хв в пробірки додають по 2-3 мл 0,9 % розчину натрію хлориду і перемішують вміст 2–3-кратним повертанням пробірок (не струшувати!).

Як зрозуміти результат

Пробірки передивляються на світлі неозброєним оком або через лупу з 2-кратним збільшенням. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів. За наявності аглютинації у вигляді великих грудочок або пластівців із склеєних еритроцитів на тлі освітленої рідини досліджувану кров можна вважати резус-позитивною. У разі відсутності аглютинації (в пробірці зберігається гомогенне забарвлення) досліджувану кров можна вважати резус-негативною. Однак ці результати слід вважати вірогідними тільки після перевірки контрольних зразків, тобто у разі позитивної реакції зі стандартними резус-позитивними еритроцитами і негативної – з резус-негативними, а також після перегляду результатів у 2-му контрольному ряді. У всіх пробірках 2-го контрольного ряду аглютинації не повинно бути. Наявність аглютинації в будь-якій пробірці контрольного ряду вказує на неспецифічне

склеювання еритроцитів і не дозволяє враховувати результат дослідження як вірогідний. У таких випадках для визначення резус-належності слід застосовувати іншу сироватку антирезус, включаючи сироватку з повними антитілами, або відмити еритроцити теплим 0,9 % розчином натрію хлориду для вимивання з них аутоантитіл.

Робота 3. Визначення резус-фактора за допомогою реакції аглютинації в соловому середовищі в маленьких пробірках або в планшеті для імунологічних реакцій (реакція придатна для роботи тільки з сироваткою, що має повні резус-антитіла)

Попередня обробка досліджуваної крові і стандартних еритроцитів: кров для дослідження беруть у кількості 2-3 мл у звичайні пробірки, в яких знаходиться 0,25 мл (5 крапель) 3,8 - 5,0 % розчину цитрату натрію або іншого стабілізатора. Еритроцити необхідно відмити, для цього в пробірки доливають доверху 0,9 % розчин натрію хлориду, зміст їх перемішують і центрифугують при швидкості обертання ротора 1500 об./хв протягом 5 хв. Можна брати кров без стабілізатора. У такому разі після зсідання в пробірці залишається деяка кількість вільних еритроцитів. Одержані за такою методикою еритроцити відмивають, як вказано вище. З відмитих еритроцитів готують 2 % завис, для цього одну краплю еритроцитів переносять у відповідно позначену пробірку, в якій знаходиться 49 крапель 0,9 % розчину натрію хлориду. Припустимо зберігати кров у холодильнику протягом 3 діб за температури $+6 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Техніка визначення: у штатив встановлюють два ряди маленьких пробірок, у кожному ряді досліджуваний зразок еритроцитів і дві пробірки для контролю. У всі пробірки першого ряду вносять по 1 краплі (0,05 мл) сироватки антирезус однієї серії, у всі пробірки другого ряду – по 1 краплі (0,05 мл) сироватки антирезус другої серії, у всі пробірки обох рядів – по 1 краплі 0,9 % розчину натрію хлориду. У перші пробірки рядів додають по 1 краплі (0,05 мл) 2

% завису досліджуваних еритроцитів, а в контрольні пробірки – по 1 краплі (0,05 мл) 2 % завису контрольних (стандартних резус-позитивних і резус-негативних) еритроцитів. Вміст пробірок ретельно перемішують струшуванням, штатив з пробірками ставлять у термостат за температури 37 °С на 1 год. За цей час еритроцити осідають на дно, попередньо увійшовши в контакт з сироваткою антирезус.

Як зрозуміти результат

Пробірки слід розглядати по повздовжній осі над джерелом світла, закритим матовим склом. Результат оцінюють за наявністю або відсутністю аглютинації еритроцитів, що проявляється в різній формі їх осаду на дні пробірки. У разі позитивного результату осад еритроцитів розташовується на дні пробірки нерівномірним шаром. Видно шорсткість, губчастість або зернистість його структури. Контури осаду ніколи не бувають рівними, вони зігнуті, іноді згорнуті до середини. У деяких випадках еритроцити розташовуються у вигляді хвилястого віночка навколо більш світлої центральної частини.

У разі негативного результату осад еритроцитів розташовується рівномірним шаром без шорсткостей, інколи з невеликим просвітленням у центрі. Межі його виглядають як правильно окреслене коло. Діаметр осаду у разі негативного результату завжди менший, ніж у разі позитивного.

Зразки еритроцитів, що дають аглютинацію із сироваткою анти-D, є резус позитивними, зразки еритроцитів, що не дають аглютинації з сироваткою анти-D є резус-негативними. Однак результати вважають вірогідними за умови їх співпадання в обох серіях сироватки антирезус і після перевірки контрольних зразків, які підтверджують специфічність і активність сироватки антирезус, тобто за відсутності аглютинації зі стандартними резус-негативними еритроцитами однойменної групи і наявності аглютинації зі стандартними

резус-позитивними еритроцитами однойменної групи. Слід зазначити, що повні антитіла не виявляють слабкий різновид фактора D^U.

Робота 4. Визначення антигенів системи резус за допомогою моноклональних антитіл

Моноклональні реагенти (антитіла) призначені для виявлення окремих антигенів системи резус на еритроцитах людини. Їх можна застосовувати замість ізоімунних сироваток або паралельно з ними. Моноклональні тест-реагенти – це моноклональні антитіла, які виробляються гетерогібридомою. Одержують моноклональні антитіла з культуральної рідини гібридомних клітин-продуцентів. Технологія виготовлення тест-реагентів виключає можливість їх контамінації патогенними для людини вірусами.

Моноклональні антитіла анти-D-супер призначені для виявлення на еритроцитах людини антигену D і використовуються в серологічних тестах замість або паралельно з імунною анти-D-сироваткою. Моноклональні анти-D-антитіла випускають у вигляді повних (IgM) та неповних (IgG) антитіл. Оскільки IgM-антитіла не аглютинують деякі зразки еритроцитів із слабким варіантом D (зокрема, D^U), необхідно такі «негативні» еритроцити додатково досліджувати в желатиновому тесті або непрямій пробі Кумбса з використанням анти-D-реагентів, що мають IgG-антитіла. Такими реагентами є поліклональні сироватки або моноклональні анти-D-IgG-реагенти.

Анти-D-IgM-антитіла викликають пряму аглютинацію еритроцитів, які мають D-антиген, і можуть використовуватись в будь-якій модифікації прямої аглютинації: в пробірках, на площині, в мікроплатах.

Моноклональні антитіла анти-C-супер вміщують антитіла, здатні викликати пряму аглютинацію еритроцитів, що несуть на собі C-антиген системи резус. Даний реагент не має антитіл іншої специфічності і тому придатний для виявлення C-антигену в еритроцитах будь-якої групи крові за

системою АВ0. Моноклональні анти-С-антитіла можуть бути використані в реакціях прямої аглютинації в пробірках, на площині, в мікроплатах. У разі застосування тесту на площині, скло необхідно попередньо злегка підігріти.

Моноклональні анти-CDE антитіла виготовляють із моноклональних антитіл (IgM та IgG) для виявлення в еритроцитах антигену С (один IgM-клон), D-антигену (один IgM-клон та один IgG-клон) і антигену Е (один IgM-клон) шляхом прямої аглютинації в пробірках, на площині та в мікроплатах.

Слід підкреслити, що D^U -позитивні еритроцити також аглютинуються цим реагентом. Проте в разі негативної реакції слабкий D^U фенотип можна виявити в непрямому тесті Кумбса з використанням IgG-компонентів анти-CDE моноклональних антитіл.

Реакцію з моноклональними анти-резус-тест-реагентами можна ставити в пробірках, на площині та в мікроплатах.

Техніка виконання тесту в пробірках: одну краплю 3-5 % завису еритроцитів сполучають з краплею моноклонального рідкого тест-реагенту. Пробірки струшують до повного перемішування реагентів, після чого центрифугують при швидкості ротора 1000 об./хв протягом 1 хв. Допускається попередня (перед центрифугуванням) інкубація при кімнатній температурі або при температурі 37° С протягом 30 хв. Обережно струшують осад у пробірках. У разі негативного результату осад еритроцитів легко розбивається, створюючи гомогенну непрозору суспензію. Якщо результат позитивний, осад не розбивається, залишаючись у вигляді одного або декількох великих аглютинатів на тлі прозорої рідини.

Техніка виконання тесту на площині : на скляну площину зі змочуваною поверхнею наносять дві краплі тест-реагенту анти-резус (0,1 мл), 1 краплю досліджуваної крові (0,05 мл) і ретельно змішують. Через 20–30 секунд починають погойдувати площину. Чітка аглютинація починається і

спостерігається досить чітко за 60 сек. Результат реакції слід враховувати через три хвилини, уникаючи висихання краплини (рис. 9.1).

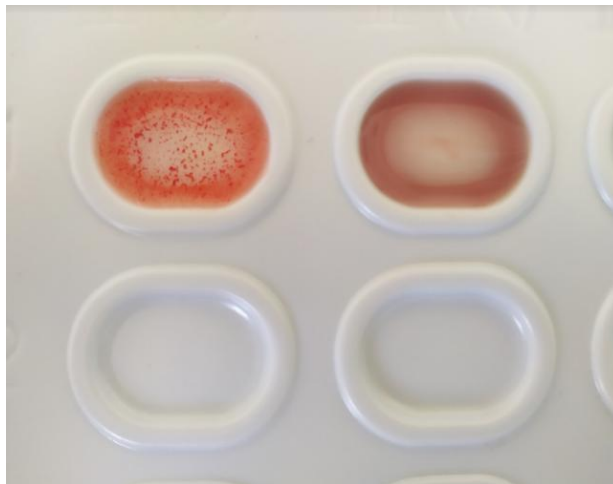


Рис. 9.1. Результат взаємодії резус-позитивної (ліворуч) та резус-негативної (праворуч) крові з моноклональним реагентом анти-D-супер.

Техніка виконання тесту в мікроплатах: в комірку мікроплати капають одну краплину тест-реагенту анти-резус і додають до неї одну краплю 3–5 % завису еритроцитів. Ретельно перемішують вручну або вібратором для мікроплат. Центрифугують за швидкості обертання ротора 1000 об./хв протягом 1 хв або попередньо інкубують 30 хв за кімнатної (від 20 до 27 °C) температури. Злегка струшують мікроплату. Якщо результат негативний, осад розбивається у вигляді рівномірного забарвлення рідини. У разі позитивного результату осад залишається у вигляді великих аглютинатів. Зчитування результатів необхідно проводити у прохідному світлі з дзеркалом або з використанням спеціального обладнання, наприклад, апарату автоматичного обліку мікроплат.

Робота 5. Непрямий тест Кумбса для визначення D^U-антигену

Техніка виконання тесту: готують 3–5 % суспензію досліджуваних еритроцитів в 0,9 % розчині натрію хлориду. У пробірці сполучають 1 краплю суспензії еритроцитів з 1 краплею моноклональних анти-CDE-антитіл і ретельно перемішують реагенти. Ставлять на водяну баню за температури 37° C на 15 хв.

Після інкубації еритроцити тричі відмивають 0,9 % розчином натрію хлориду. Для цього в пробірки доливають до верху 0,9 % розчин натрію хлориду, зміст їх перемішують і центрифугують за швидкості 1500 об./хв протягом 5 хв. Додають до осаду еритроцитів 2 краплі антиглобулінової сироватки Кумбса, ретельно перемішують. Центрифугують протягом 1 хв за швидкості обертання ротора 1000 об./хв за кімнатної температури. Струшують пробірку та враховують аглютинацію. Аглютинація еритроцитів свідчить про наявність антигена D^U. У разі негативного результату реакції ставлять паралельний контроль з D-позитивними та D-негативними еритроцитами в пробі Кумбса.

Завдання: визначте групову приналежність досліджуваної крові двома із запропонованих методів на вибір, порівняйте результати.

Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Система резус включає такі основні пари антигенів:

- A) *A i B.*
- B) *M i N.*
- C) *D i d, C i c, E i e.*
- D) *K i k.*

2. Який антиген системи Rh є найбільш імуногенним?

- A) *C.*
- B) *E.*
- C) *D.*
- D) *c.*

3. Скільки теоретично можливих фенотипів системи Rh існує?

- A) *4.*
- B) *8.*
- C) *12.*
- D) *18.*

4. У сироватці крові людей природні антитіла до антигенів системи Rh:
- A) Завжди присутні.
 - B) Відсутні.
 - C) Є тільки в Rh+.
 - D) Є тільки в Rh-.
5. Слабкий різновид антигену D (DU) визначають за допомогою:
- A) Прямої реакції аглютинації в сольовому середовищі.
 - B) Непрямого тесту Кумбса.
 - C) Реакції преципітації.
 - D) Групоспецифічної сироватки анти-A.
6. Моноклональні анти-D-IgM антитіла:
- A) Завжди виявляють слабкий DU.
 - B) Не можуть використовуватися в пробірках.
 - C) Викликають пряму аглютинацію D-позитивних еритроцитів.
 - D) Використовуються лише при 48 °C.
7. Який реагент використовують у методі конглоїтинації з підігрівом?
- A) Поліглюкін.
 - B) Желатин.
 - C) Декстран.
 - D) Антиглобулінова сироватка.
8. Зразок еритроцитів є резус-негативним, якщо:
- A) Є аглютинація з анти-D.
 - B) Немає аглютинації з анти-D.
 - C) Аглютинація є лише з анти-C.
 - D) Аглютинація є лише в контролі.

**Тема: МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ, ДІАГНОСТИКА ТА ПРОФІЛАКТИКА
ІЗОНЕСУМІСНОСТІ МАТЕРІ Й ПЛОДУ**

Обладнання і метериали: пластини або планшети білі плоскі для аглютинації, секундомір, палички скляні або пластикові, фізіологічний розчин, рукавички гумові, нирковидні лотки, контрольні еритроцити + і – фенотипу, моноклональні реагенти анти-А, анти-В, анти-АВ, анти-D Супер, анти-Е, анти-С Супер, капілярна або венозна кров, або еритроцити.

Теоретичні відомості

Термін «тип крові» відображає антигенний фенотип людини (повний антигенний «портрет», або антигенний профіль) – сукупність усіх групових антигенних характеристик крові. Еритроцити однієї людини можуть переносити молекули, що діють як антигени (речовини, які організм людини розглядає як чужорідні або потенційно небезпечні агенти й проти яких починає виробляти власні антитіла), у той час як в іншій людини еритроцити можуть не містити таких антигенів. Антигенні детермінанти груп крові виконують функцію транспортних молекул, каналів для води, аніонів.

Групові аглютиногени знаходяться у стромі та оболонці еритроцитів. Антигени системи АВ0 виявляються не лише на еритроцитах, але і на клітинах інших тканин або навіть можуть бути розчиненими в слині чи інших рідинах організму. Розвиваються вони на ранніх стадіях внутрішньоутробного розвитку, у новонародженого вже містяться у значній кількості. Кров новонароджених дітей має вікові особливості – у плазмі може ще не бути характерних групових аглютинінів, які починають вироблятися пізніше (постійно виявляються після 10 місяців) і визначення групи крові у новонароджених в цьому випадку проводиться лише за наявності антигенів системи АВ0.

Окрім ситуацій, пов'язаних із необхідністю переливання крові, визначення групи крові, резус-фактора, а також наявності алоімуних антиеритроцитарних антитіл повинно проводитися при плануванні або під час вагітності для виявлення вірогідності імунологічного конфлікту матері та дитини, який може призводити до гемолітичної хвороби новонароджених.

Гемолітична хвороба новонароджених – гемолітична жовтяниця новонароджених, обумовлена імунологічним конфліктом між матір'ю і плодом через несумісність за еритроцитарними антигенами. Хвороба обумовлена несумісністю плода та матері за D-резус чи АВ0-антигенами, рідше має місце несумісність за іншими резус- (С, Е, с, d, е) чи М-, М-, Kell-, Duffy-, Kidd-антигенами. Будь-який із указаних антигенів (частіше D-резус-антиген), проникаючи у кров резус-негативної матері, викликає утворення в її організмі специфічних антитіл. Останні через плаценту надходять у кров плода, де руйнують відповідні антигенвмісні еритроцити.

Сприяють розвитку гемолітичної хвороби новонароджених порушення проникності плаценти, повторні вагітності та переливання крові жінці без урахування резус-фактора та ін. При ранній появі захворювання імунологічний конфлікт може бути причиною передчасних пологів чи викиднів. Існують різновиди (слабкі варіанти) антигена А (в більшій мірі) і рідше - антигена В. Щодо антигена А, існують варіанти: сильний А1 (більше 80%), слабкий А2 (менше 20%), та ще більш слабкі (А3, А4, Ах – рідко). Це теоретичне поняття має значення для переливання крові та може викликати нещасні випадки при віднесенні донора А2 (II) до групи 0 (I) чи донора А2В (IV) – до групи В (III), оскільки слабка форма антигена А іноді обумовлює помилки при визначенні групи крові системи АВ0. Правильне визначення слабких варіантів антигена А може потребувати повторних досліджень зі специфічними реагентами.

Зниження чи повна відсутність природних аглютинінів альфа і бета іноді спостерігається при імунодефіцитних станах:

- ✓ новоутворення і хвороби крові – хвороба Ходжкіна, множинна мієлома, хронічна лімфатична лейкемія;
- ✓ уроджені гіпо- та агамоглобулінемія;
- ✓ у дітей раннього та людей похилого віку;
- ✓ імуносупресивна терапія;
- ✓ важкі інфекції.

Система Резус

Система антигенів резус (Rhesus; Rh^+ та Rh^-) представлена 6 антигенами, які успадковуються і не змінюються протягом усього життя; локус резус-системи міститься в 1-й хромосомі. Після антигенів АВ0 система антигенів резус має найбільше значення у клінічній практиці, оскільки резус-фактор є важливим чинником у виникненні гемолітичної жовтяниці немовлят та резус-конфлікту між матір'ю та плодом унаслідок того, що імунна система організму матері починає виробляти антитіла проти власної дитини (у разі, коли еритроцити резус-позитивного плода потрапляють у кров резус-негативної матері).

При переливанні резус-позитивних еритроцитів резус-негативним особам або навпаки виникають імунні реакції гемолітичного типу внаслідок аглютинації (склеювання) та гемолізу (руйнування) еритроцитів.

Понад 90% ускладнень при переливанні крові пов'язані з резус-несумісністю донора і реципієнта за антигеном Rh^0 (D). За загальноприйнятою номенклатурою наявність антигену резус позначають знаком «+», а його відсутність — знаком «-». Резус-належність еритроцитів визначається за наявністю у людини антигену Rh^0 (D). Людей, в еритроцитах яких цей антиген наявний, відносять до резус-позитивних, за його відсутності – до резус-негативних.

Є невелика категорія резус-позитивних осіб, здатних утворювати анти-резус антитіла. Це особи, еритроцити яких характеризуються значно зниженою експресією нормального антигена Rh на мембрані («слабкий» D, Dweak) чи

експресією зміненого антигена Rh (частковий D, Dpartial). Ці слабкі варіанти антигена D в лабораторній практиці об'єднують у групу Du, частота якої складає близько 1%. Реципієнти, які містять антиген Du, повинні бути віднесені до резус-негативних, і їм повинна бути перелита лише резус-негативна кров, так як нормальний антиген D може викликати у таких осіб імунну відповідь. Донори із антигеном Du кваліфікуються як резус-позитивні донори, так як переливання їх крові може викликати імунну відповідь у резус-негативних реципієнтів, а у випадку попередньої сенсibilізації до антигена D – і тяжкі трансфузійні реакції.

При оцінці резус-належності донорів до резус-позитивних зараховують усіх осіб, еритроцити яких містять антигени D, C і E. Резус-негативними називають донорів, еритроцити яких не містять жодного з цих антигенів. Така оцінка резус-належності дозволяє уникнути можливої сенсibilізації реципієнта до будь-якого з цих антигенів, що володіють високою імуногенною активністю. Обидва антигени C і c мають значно меншу імуногенність, ніж D-антиген. Антиген e трапляється частіше, ніж E. E має сильніші імуногенні властивості, ніж e.

У випадках виникнення ризику розвитку гемолітичної хвороби новонароджених, велике значення для підтвердження діагнозу (частіше за все під час вагітності) та при необхідності динамічного нагляду за появою і зміною титру антитіл є результати прямого та непрямого антиглобулінових тестів. Гемолітична хвороба новонародженого найчастіше пов'язана з несумісністю матері та плоду по антигену D. Антитіла, які з'являються при конфлікті чітко виявляються у непрямому антиглобуліновому тесті. Вірно встановлений титр антитіл та їх специфічність при даному захворюванні дає можливість прогнозувати тяжкість гемолітичної хвороби. Перевагою антиглобулінових тестів, за думкою багатьох авторів, є їх висока чутливість, яка значно перевищує чутливість альтернативних методів досліджень.

У даний час існує можливість медичної профілактики розвитку резус-конфлікту та гемолітичної хвороби новонароджених. Усі резус-негативні жінки в період вагітності повинні перебувати під наглядом лікаря. Необхідно також контролювати в динаміці рівень резус-антитіл.

Гемолітична хвороба новонародженого при Rh-несумісності проявляється звичайно після другої вагітності. Перша дитина народжується здоровою, другий з ознаками слабо вираженої анемії і тільки після третьої вагітності народжуються діти з явними ознаками гемолітичної хвороби. Тільки у попередньо сенсибілізованих жінок ще при першій вагітності може народитися дитина з симптомами гемолітичної хвороби. У деяких випадках імунізація викликає аборти і народження мертвих дітей. Для розвитку і тяжкості захворювання мають значення стан плаценти і тривалість впливу материнських аглютининів на плід. При появі аглютининів за 10-14 тижнів до пологів у дитини зазвичай спостерігаються субклінічні форми. Рання поява аглютининів, за 15-26 тижнів до пологів, викликає важкі форми захворювання. При всіх формах захворювання основним процесом є гемоліз. Наслідок реакції антиген-антитіло - гемоліз, ураження печінкових і мозкових капілярів. Залежно від того, яке ураження переважає, спостерігаються і різні форми захворювання. небезпечні і деякі анафілактичні явища. Вони призводять до утворення гістаміноподібних субстанцій, що викликають важкі ураження печінки і особливо гангліонарних клітин базальних ядер, довгастого мозку і навіть кори головного мозку. При ураженнях печінкових клітин діти гинуть при важких явищах ядерної жовтяниці. Якщо вони виживають, залишаються симптоми уражень нервової системи (порушення з боку екстрапірамідальної системи з хореоатетозними рухами, своєрідною танцюючою ходою, примусовими рухами голови, іноді розладом координації довільних рухів з частим падінням, підвищеним тонусом м'язів, розумовою відсталістю).

Система Kell

Система Kell є однією з найважливіших груп крові у трансфузіології та акушерській практиці. Система антигенів Kell (також відома як система Kell-Cellano) – група антигенів на поверхні еритроцитів, що є важливими детермінантами крові і мішенню для багатьох аутоімунних або аллоімунних захворювань, що знищують червоні кров'яні клітини крові. Показник Kell позначається як K, k і Kp. Білок Kell також недавно був позначений як CD238 (кластер диференціювання 238). Група Kell була названа по імені першого пацієнта, описаного з антитілами K1, вагітної жінки місис Cellano у 1945 році. Вона була першою вагітною жінкою з антитілами K2, яка вперше була описана.

Антигени Kell важливі в трансфузіології, в тому числі при переливанні крові, при аутоімунній гемолітичній анемії і гемолітичній хворобі новонароджених. У людей з браком специфічного антигену Kell можуть вироблятися антитіла проти антигенів Kell, коли робиться переливання крові, що містить цей антиген. При наступних переливаннях крові можуть відзначатися руйнування нових клітин цими антитілами (гемоліз еритроцитів). Особам, які не мають антигенів Kell (K0), при необхідності еритроцити переливаються тільки від Kell-негативних донорів, для запобігання гемолізу. З цієї причини від Kell-позитивних донорів в загальному випадку заготовлюються тільки ті препарати крові, в яких немає еритроцитів: плазма, тромбоконцентрат або кріопреципітат. Особи ж з негативним антигеном Kell є універсальними за цією ознакою реципієнтами еритроцитів, так як не відбувається їх відторгнення. Переливання еритроцитів від Kell-позитивного донора Kell-негативному хворому може викликати серйозні ускладнення – точно так само, як і при переливанні еритроцитів від резус-позитивного донора резус-негативному хворому.

Аутоімунна гемолітична анемія відбувається, коли організм виробляє антитіла проти антигенів групи крові на своїх власних еритроцитах. Антитіла призводять до руйнування червоних кров'яних клітин з наступною анемією.

Крім того, вагітні жінки можуть виробляти антитіла проти еритроцитів плоду, що призводить до ГХН. Як аутоімунна гемолітична анемія, так і гемолітична хвороба новонароджених можуть мати дуже серйозні наслідки, викликані анти-Kell антитілами, оскільки вони є найбільш імуногенними антигенами після системи ABO і резус-фактора.

Методи дослідження

Дослідження систем Rh (C, E, c, e) та Kell проводять методами реакції з моноклональними антитілами та гель-фільтрації. У першому методі використовують спеціальні моноклональні суміші, призначені тільки для прямого тестування і не використовуються в антиглобуліновому тесті. Rh-типуювання також виконується з використанням гель-фільтрації. Антисироватка розподіляється рівномірно по всіх часточках гелем. Антиген-позитивні еритроцити реагують з антисироваткою, при цьому аглютиніни зв'язуються і не можуть звільнитись з гелю під час центрифугування.

Дослідження призначають перед плановими гемотрансфузіями з метою зниження частоти трансфузійних реакцій; додаткові обстеження під час вагітності з метою оцінки статусу за системами Rh та Kell; діагностика, оцінка ризику виникнення гемолітичної хвороби новонароджених та рішення про своєчасне адекватне лікування даної патології; обстеження донорів.

Визначення групи крові за системами ABO та Rhesus за період вагітності проводять дворазово (відповідно до вимог проведення імуногематологічних досліджень у пацієнтів). Антиген D-слабкий зазвичай чітко виявляється в НАГТ (непрямий антиглобуліновий тест). Резус-належність крові вагітної, яка має антиген D-слабкий, вважається позитивною.

Якщо у вагітної жінки виявлений D-варіантний антиген, то резус-належність вважається негативною. Категорія жінок, яка має D-варіантний антиген, при вагітності резус-позитивним плодом може виробляти анти-D антитіла.

Вагітним, в яких виявлений варіантний антиген D, необхідно проводити профілактику імуноглобуліном анти-резус так само, як і вагітним із резус-негативним типом крові.

Дослідження фенотипу за антигенами системи Rhesus проводиться у вагітних з алоантитілами для уточнення їх специфічності і прогнозу ризику ГХП або ГХН.

Клінічне значення у розвитку ГХН (гемолітичної хвороби новонароджених) мають IgG антитіла. IgM антитіла не викликають гемолітичної хвороби плоду та новонародженого через більшу молекулярну масу, що унеможлиблює їх проникнення через плаценту. Якщо у вагітної виявлені IgM антитіла і їх специфічність направлено до антигенів, які можуть викликати ГХП або ГХН, в подальшому необхідно регулярно проводити моніторинг антитіл тому, що зі збільшенням строку вагітності, до антитіл IgM, як правило, додатково з'являються антитіла IgG.

У разі виявлення антитіл IgG додаткове дослідження на належність їх до субкласів IgG дасть змогу оцінити ризик розвитку ГХП або ГХН, так як вони мають різні біологічні властивості. Якщо у сироватці присутні IgG1 антитіла, то вони вільно проходять через плаценту. Легко взаємодіють з Fc-рецепторами фагоцитуючих клітин, але чи буде еритроцит гемолізований, залежить від кількості IgG1. Якщо в наявності IgG3 антитіла, то вони теж вільно проходять через плаценту, легко взаємодіють з Fc-рецепторами фагоцитуючих клітин, але гемоліз не залежить від кількості IgG, які пройшли через плацентарний бар'єр, і в них більше, ніж у IgG1, виражена здатність активувати систему комплементу. Але частіше у сироватці крові виявляється суміш IgG1 і IgG3 антитіл.

Вагітним з групою 0, A, B, які мають чоловіка з іншою групою належності, обов'язково проводиться визначення антитіл за системою AB0. Імунні анти-A і анти-B антитіла можуть викликати ГХН за системою AB0, але

тяжка форма цього захворювання зустрічається рідко (1 випадок на 3000 пологів).

Пояснюється цей факти тим, що висока концентрація розчинених А та В антигенів плода у тканинах плаценти, плазмі крові плода, навколоплідних водах забезпечує значну інгібіцію анти-А, анти-В антитіл матері, які проникають через плаценту; структура антигенів А та В у новонароджених відрізняється від структури антигенів дорослих, тому еритроцити плода зв'язують незначну кількість антитіл, навіть при великій їх концентрації; під час дослідження сироватки вагітних встановлено, що майже всі анти-А, анти-В антитіла, як правило, відносяться до субкласу IgG2. Fc-рецептори клітин тканин плаценти ефективніше зв'язують IgG1, ніж IgG2 антитіла, тому анти-А та анти-В IgG2, навіть, у високих титрах не викликають тяжку форму ГХН.

Цим пояснюється і те, чому у деяких випадках при позитивному ПАГТ (прямий антиглобуліновий тест) не спостерігаються ознаки ГХН.

З іншого боку, в деяких випадках за наявності клінічних ознак ГХН спостерігається негативний ПАГТ. Це обумовлено наявністю анти-А або анти-В антитіл субкласу IgG3, рівень яких може бути нижчим, ніж рівень чутливості реакції ПАГТ.

Хід роботи

Робота 1. Визначте групу крові вагітної жінки та її чоловіка за системою АВ0 за допомогою моноклональних антитіл. За результатами оцініть імовірність розвитку ізоімунного конфлікту матері й плоду.

Робота 2. Виконайте фенотипування досліджуваної крові вагітної жінки та її чоловіка за допомогою анти-D, анти-C та анти-E моноклональних антитіл. За результатами оцініть імовірність розвитку резус-конфлікту матері й плоду за умови успадкування батьківських антигенів еритроцитів.

Техніка проведення: моноклональний реагент анти-D Супер містить моноклональні антитіла IgM в титрі $\geq 1:128$, анти-C Супер – в титрі $\geq 1:8$, анти-E Супер – в титрі $1:16$. Реагенти мають високу гемаглютинуючу активність і надійно виявляють відповідні антигени як гомо-, так і гетерозиготних фенотипів у прямій реакції на площині. Для дослідження використовують нативну кров без консерванту або кров стабілізовану з консервантами (гепарин тощо). Моноклональні реагенти слід дістати з холодильника і витримати при кімнатній температурі 15 хв. Стандартні еритроцити, що зберігаються в консерванті, потрібно тричі відмити 0,9% фізіологічним розчином. Досліджувані еритроцити відмивати не обов'язково.

Приготування 5% суспензії еритроцитів: до 1 мл 0,9% фізіологічного розчину додайте 2 краплі крові або 1 краплю осаду еритроцитів.

В лунки планшета нанесіть 1-2 краплі (50-100 мкл) моноклональних реагентів анти-D Супер, анти-C Супер, анти-E Супер та по 1 маленькій краплі досліджуваної крові або еритроцитів і змішайте за допомогою похитування планшета до повного перемішування реагентів. Через 20-30 сек після змішування похитайте пластинку або планшет. Оцініть результат візуально по наявності або відсутності аглютинації. Чітка реакція настає через 30-60 сек після змішування. Аглютинація еритроцитів з гетерозиготним фенотипом настає трохи повільніше, ніж з гомозиготним. Остаточний результат підраховують через 3 хв, але не пізніше, тому що при підсиханні краплини може спостерігатись дрібна неспецифічна аглютинація. У сумнівних випадках після закінчення 3 хв можна додати 1-2 краплі фізіологічного розчину і похитати планшет, неспецифічна реакція зникне.

Реакцію враховують при позитивній реакції аглютинації зі стандартними позитивними і відсутності її в негативних еритроцитами.

Робота 3. Визначити групу крові вагітної жінки та її чоловіка за системою Kell за допомогою моноклональних антитіл. За результатами оцінити ризик розвитку ізоімунного конфлікту за умови успадкування бітьківських антигенів еритроцитів.

Робота 4. Пряма та непряма проби Кумбса.

Антиглобуліновий тест був відкритий в 1945 році Р. Кумбсом, А. Морантом та Р. Рейсом. В 1945-1946 р.р. вперше було застосовано та описано антиглобуліновий реагент, а через декілька років антиглобуліновий тест почали застосовувати практично в кожній імуногематологічній лабораторії.

Складовою реагенту проби Кумбса є спеціальна сироватка, отримана із крові тварин, імунізованих імуноглобулінами (Ig G, Ig M, Ig A), компонентами компліменту або іншими білками крові людини. При фіксації антитіл на еритроцитах (in vivo або in vitro) імунна сироватка виявляє наявність неповних (або повних) антиеритроцитарних антитіл, тобто викликає аглютинацію еритроцитів, на яких абсорбований білок людини (будь яке антитіло). В залежності від того, чи фіксується антитіла на поверхні еритроцитів чи знаходяться у вільному стані у сироватці крові, застосовується пряма або непряма проба Кумбса (рис. 10.1).

The Antihuman Globulin Test (AHG)

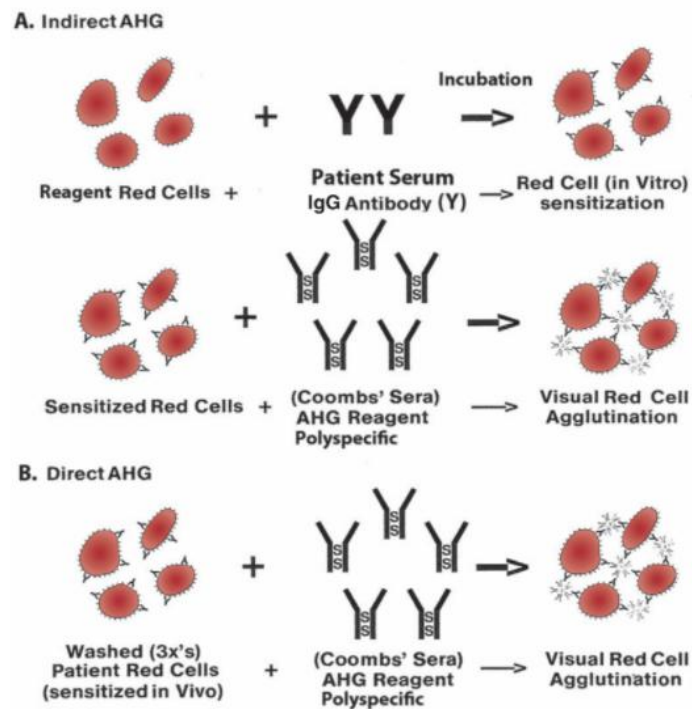


Рис. 10.1. Схема прямої та непрямої проб Кумбса

Пряма проба Кумбса проводиться у тих випадках, коли є припущення, що досліджувані еритроцити підлягали сенсibilізації відповідними антитілами *in vivo*, тобто перша фаза реакції – фіксація антитіла на поверхні еритроцита – пройшла в організмі, а додавання антиглобулінової сироватки викликає аглютинацію сенсibilізованих клітин. За допомогою непрямої проби Кумбса виявляють антитіла, не фіксовані на еритроцитах *in vivo*, а які вільно знаходяться в сироватці крові. В даному випадку реакція проходить два етапи. Перший етап – інкубація тест-еритроцитів з досліджуваною сироваткою, під час якої відбувається фіксація антитіл на поверхні еритроцитів. Другий етап – додавання антиглобулінової сироватки.

За допомогою цієї проби доводять наявність фіксованих еритроцитами дитини блокуючих антитіл. Позитивна пряма проба свідчить про сенсibilізацію і служить переконливою ознакою гемолітичної хвороби новонародженого ще до появи інших клінічних ознак. Як виняток і тільки в дуже важких випадках

пряма проба Кумбса може виявитись негативною у зв'язку з майже повним гемолізом сенсibiliзованих еритроцитів.

Пряма проба Кумбса виконується таким чином: 5 крапель крові, взятої з п'яти дитини, поміщають у пробірку і додають 5 мл фізіологічного розчину. Добре розмішують і центрифугують протягом 10 хв. Відокремлюють прозору рідину над осадом еритроцитів. Потім знову додають 5 мл фізіологічного розчину, змішують і центрифугують. Після триразового змішування з фізіологічним розчином еритроцити вже добре промиті. Після останнього відділення надосадової рідини еритроцитний осад у кількості 0,1 мл змішують з 0,9 мл фізіологічного розчину. Наносять 2-3 краплі цієї суміші на предметне скло і додають одну краплю сироватки Кумбса. Наявність аглютинації вказує на те, що реакція позитивна, (позитивна пряма проба Кумбса). Дослідження слід проводити при кімнатній температурі вище від 16 °С, щоб уникнути дії холодних аглютининів.

Непряма проба Кумбса служить доказом наявності вільних антитіл в сироватці матері і виконується з сироваткою крові матері.

Завдання: Користуючись теоретичним матеріалом та схемою встановити особливості проведення прямої та непрямої проб Кумбса.

Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Де локалізуються групові аглютиногени?

- А) Тільки в ядрі лейкоцитів.*
- В) У стромі та оболонці еритроцитів.*
- С) У тромбоцитах.*

2. Які імуноглобуліни здатні проникати через плаценту та викликати гемоліз еритроцитів плода?

- А) IgM.*

B) IgA.

C) IgG.

D) IgE.

3. Чому антитіла класу IgM не викликають гемолітичної хвороби плода?

A) Вони мають малу молекулярну масу.

B) Вони мають велику молекулярну масу і не проходять крізь плаценту.

C) Вони руйнуються ферментами плаценти.

D) Вони не взаємодіють з еритроцитарними антигенами.

4. Який антиген системи Резус є найбільш імуногенним і найчастіше викликає конфлікт?

A) Антиген C.

B) Антиген E.

C) Антиген D.

D) Антиген e.

5. Як кваліфікується донор, еритроцити якого містять слабкий варіант антигена D (Du)?

A) Як резус-негативний донор.

B) Як резус-позитивний донор.

C) Як універсальний донор.

D) Як донор, кров якого не можна переливати нікому.

6. Як слід розглядати реципієнта, у якого виявлено слабкий варіант антигена D (Du), при необхідності переливання крові?

A) Як резус-позитивного (можна переливати Rh+ кров).

B) Як резус-негативного (слід переливати тільки Rh- кров).

C) Йому можна переливати будь-яку кров.

D) Йому можна переливати тільки плазму.

7. Яка основна мета проведення прямої проби Кумбса у новонародженого?

A) Виявлення вільних антитіл у сироватці крові.

- В) Визначення групи крові за системою АВ0.*
- С) Виявлення антитіл, які зафіксовані на поверхні еритроцитів.*
- Д) Визначення рівня білірубину.*

8. Для чого використовується непрямі проба Кумбса під час обстеження вагітної жінки?

- А) Для виявлення вільних неповних антитіл у сироватці крові матері.*
- В) Для оцінки стану плаценти.*
- С) Для виявлення антитіл, фіксованих на еритроцитах матері.*
- Д) Для визначення резус-належності плода.*

9. Яка особливість системи Kell (K) у трансфузіології?

- А) Антигени Kell не є імуногенними.*
- В) Це найбільш імуногенна система після АВ0 та Rh.*
- С) Антигени Kell присутні тільки у чоловіків.*
- Д) Система Kell не викликає гемолітичної хвороби новонароджених.*

10. Який захід є основним для специфічної профілактики резус-конфлікту у резус-негативних жінок?

- А) Призначення вітамінів групи В.*
- В) Введення анти-D імуноглобуліну.*
- С) Переливання резус-позитивної крові малими дозами.*
- Д) Прийом антибіотиків під час вагітності.*

11. Коли зазвичай проявляється гемолітична хвороба новонароджених при Rh-несумісності у несенсибілізованих жінок?

- А) Під час першої вагітності.*
- В) Зазвичай після другої вагітності або після попередньої сенсибілізації.*
- С) Тільки якщо плід резус-негативний.*
- Д) Тільки якщо батько резус-негативний.*

12. Які клінічні наслідки для дитини може мати тяжка форма гемолітичної хвороби?

A) Розвиток цукрового діабету.

B) Ядерна жовтяниця та неврологічні розлади (ДЦП, глухота).

C) Вроджені вади серця.

D) Гіпертрофія м'язів.

13. Які антитіла зазвичай виявляються у сироватці вагітних при груповій несумісності (AB0), що рідко викликають тяжку ГХН?

A) IgG1.

B) IgG3.

C) IgG2.

D) IgE.

14. Що означає негативний результат прямої проби Кумбса у дитини при наявності клініки гемолітичної хвороби (як виняток)?

A) Хвороба відсутня.

B) Може бути пов'язано з майже повним гемолізом сенсibilізованих еритроцитів.

C) Це свідчить про конфлікт тільки за системою Kell.

D) Це помилка лабораторії, тест завжди позитивний.

15. Яка тактика щодо вагітних, у яких виявлено D-варіантний антиген?

A) Їм не потрібна профілактика.

B) Їм проводять профілактику анти-резус імуноглобуліном, як і резус-негативним.

C) Їх вважають резус-позитивними і профілактику не проводять.

D) Їм рекомендують переривання вагітності.

16. Який титр антитіл є більш небезпечним з точки зору прогнозу важкості ГХН?

A) Поява антитіл за 1-2 тижні до пологів.

B) Рання поява антитіл (за 15-26 тижнів до пологів).

C) Відсутність антитіл до 38 тижня.

D) Титр антитіл не має прогностичного значення.

Лабораторна робота 11

Тема: МЕТОДИ ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Обладнання і метериали: ІФА-набори для якісного виявлення антитіл класу IgG, деіонізована вода, фільтрувальний папір, контейнер для рідких відходів, лабораторний посуд, автоматична піпетка змінного об'єму та наконечники до неї, термостат, вошер (промивач), спектрофотометр для мікропланшетів на 450/620-695 нм, таймер, рукавички, дезінфікуючі засоби.

Короткі теоретичні відомості

Імуноаналізами називають такі методи якісного та кількісного визначення розчинних речовин, в основі яких лежить взаємодія антигенів з антитілом (тобто імунологічне розпізнавання), яке візуалізується за допомогою спеціальної мітки, заздалегідь кон'югованої або з антитілом, або з антигеном.

Методи імунного аналізу широко увійшли в медичну практику. У всіх областях сучасної медицини використовується імунний аналіз, переважно, з діагностичною та аналітичною цілями.

Імуноферментний аналіз (ІФА) (англ. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) – це високочутливий лабораторний метод, який використовується для якісного та кількісного визначення різноманітних речовин (антигенів, антитіл, гормонів, білків тощо) у біологічних рідинах.

В основі методу лежить специфічна реакція «антиген-антитіло». Унікальність методу полягає у використанні ферменту як мітки для реєстрації сигналу.

Процес аналізу зазвичай проходить у три основні стадії:

1. Стадія розпізнавання. Специфічне зв'язування антитіла з досліджуваною сполукою (антигеном), що веде до утворення імунного комплексу.
2. Стадія формування кон'югату. Приєднання компонента, міченого ферментом (кон'югату), до утвореного комплексу або вільних місць зв'язування.

Стадія детекції. Перетворення ферментної мітки на сигнал, що реєструється (зазвичай це кольорова реакція при додаванні субстрату, яку вимірюють спектрофотометрично).

Класифікація методів ІФА

Існує кілька підходів до класифікації:

1. За типом реагентів (на першій стадії):
 - Конкурентний: у системі одночасно присутні аналізована сполука та її мічений аналог, які конкурують за центри зв'язування.
 - Неконкурентний: у системі на першій стадії присутня тільки аналізована сполука та специфічні до неї центри.
2. За середовищем проведення:
 - Гетерогенний (твердофазний): аналіз проводиться на твердій фазі (наприклад, у лунках планшета). Вимагає стадії промивання для відокремлення компонентів.
 - Гомогенний: усі стадії проходять у розчині без додаткового розділення. Використовується переважно для низькомолекулярних речовин.
3. За форматом ("Дизайн" тесту):
 - Прямий метод: антиген виявляють безпосередньо міченим первинним антитілом (швидко, але менш чутливо).
 - Непрямий метод: використовується немічене первинне антитіло та мічене вторинне антитіло (висока чутливість, широко застосовується).

- «Сендвіч»-метод: антиген затискається між двома антитілами (захоплюючим та детектуючим). Дуже висока специфічність.

ІФА широко використовується у практичній медицині, біології та наукових дослідженнях для діагностики та моніторингу інфекційних захворювань (вірусні гепатити, ВІЛ-інфекція, TORCH-інфекції (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловірус, герпес), паразитарні інвазії, бактеріальні інфекції (хламідіоз, мікоплазмоз тощо), COVID-19 (визначення антитіл IgM, IgG). В ендокринології для визначення рівня гормонів (щитоподібної залози, статевих гормонів та ін.), в онкології для виявлення онкомаркерів. В імунології для діагностики аутоімунних захворювань та алергій (визначення імуноглобулінів IgE, IgG, IgM, IgA).

Переваги методу:

- Висока чутливість: здатність виявляти речовини в дуже низьких концентраціях.
- Специфічність: точне розпізнавання шуканої речовини.
- Швидкість: можливість отримання результатів у стислі терміни (експрес-методи).
- Доступність: Використання стандартного обладнання.

Особливо важливо, що імуноаналізи дають можливість ідентифікувати біологічні компоненти (гормони, ферменти, нейропептиди, продукти імунної системи, антигени і т.д.) в низьких і дуже низьких концентраціях.

Всі продукти, проти яких можливе отримання антитіл, виявляються цими методами. Оцінка реакції проводиться автоматично на спеціальній апаратурі, що дозволяє стандартизувати ці методи. Залежно від типу мітки і умов виконання тесту імунний аналіз позначається як імуноферментний (ІФА), радіоімунний (RIA), імунофлуоресцентний та інші.

Принцип твердофазного ІФА полягає у наступному: на тверду фазу сорбують або антиген, або антитіло. У якості такої фази використовують

наступні матеріали: пластмасу у вигляді стандартно штампованих мікропанелей (96 або 60 лунок), або кульки, ковпачки та т.п. для постановки одиничних проб у пробірках; пористі матеріали типу нітроцелюлози у вигляді наповнювачів в об'ємі або у вигляді плоских листів чи смужок. У пористих матеріалах частина реагентів фіксовано сорбована, інша частина дифундує по порах.

Метод базується на специфічному зв'язуванні АТ з АГ, при цьому один з компонентів кон'югований з ферментом. В результаті реакції з відповідним хромогенним субстратом утворюється забарвлений продукт, кількість якого можна визначити спектрофотометрично (рис. 11.1).

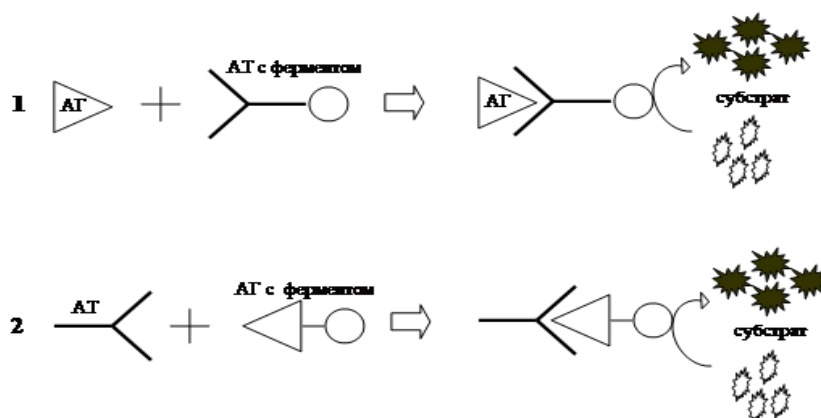


Рис. 11.1. Основний принцип ІФА. 1) Для виявлення антигенів. 2) Для виявлення антитіл.

Характеристика компонентів, що використовуються в ІФА.

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

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

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

IV. Утворення кон'югату. Кон'югат - це антиген або антитіло, мічені ферментної міткою. Утворення кон'югату - один з важливих етапів проведення ІФА. При формуванні кон'югату підбирають оптимальний метод введення ферментної мітки, щоб обидва компоненти кон'югату зберігали свою біологічну активність: фермент - здатність взаємодіяти з субстратом, а антиген або антитіло – антигенність або антигензв'язуючу активність, відповідно. Наявність міченого, високоочищеного антигену дозволяє використовувати **конкурентні методи**. У цьому випадку на кінцевому етапі можна вимірювати активність кон'югату, не пов'язаного з іммобілізованими антитілами, що дозволяє уникнути процедури відмивання і робить аналіз більш зручним. Однак антигени різноманітні за своїми фізико-хімічними властивостями і будовою, а значить неможливо розробити загальні механізми для отримання кон'югату з антигеном. У цьому випадку одержання кон'югату антигену з ферментом

представляє собою окрему складну задачу. Приготування мічених антитіл для ІФА методично більш доступне.

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

Варіанти постановки ІФА. В даний час використовується величезна кількість всіляких різновидів і модифікацій ІФА. Широке розповсюдження одержали різні варіанти твердофазного ІФА (ELISA) (рис. 11.2).

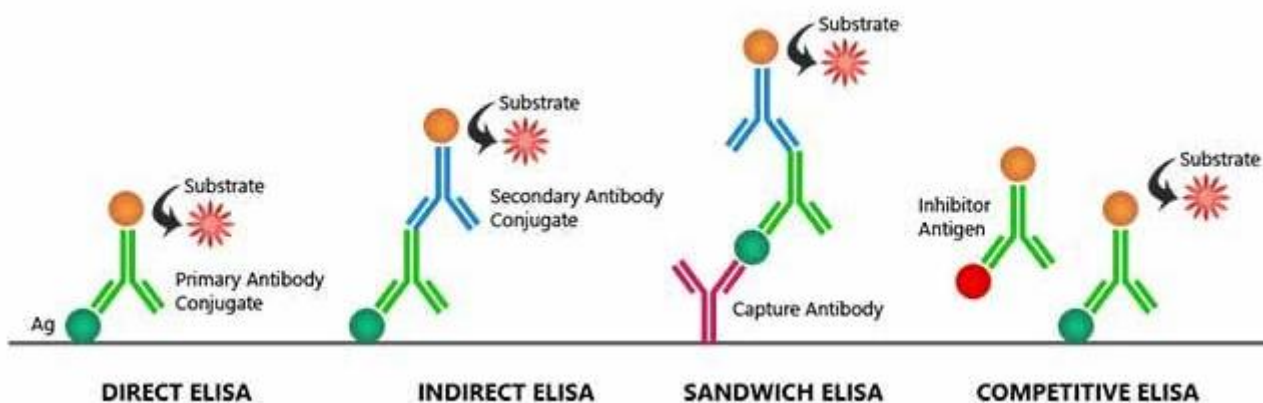


Рис. 11.2. Різновиди твердофазних ІФА

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

1. На 1 етапі реакції адсорбують антигени або антитіла на твердій фазі. При цьому всі не пов'язані з твердою фазою реагенти легко видаляються відмиванням.

2. У сенсibilізованих лунках інкубують досліджуваний зразок. У лунках з позитивним контролем - стандартні реагенти. При цьому на поверхні твердої фази формуються імунні комплекси. Незв'язані компоненти видаляють відмиванням.

3. При додаванні кон'югату антитіло-фермент або антиген-фермент і зв'язуванні його з іммобілізованим імунним комплексом активний центр ферменту залишається доступним для подальшої взаємодії з субстратом. Інкубація субстрату в лунках з іммобілізованим кон'югатом призводить до розвитку кольорової реакції. Цю реакцію можна зупинити на потрібній стадії, вираженість фарбування можна оцінити візуально або за оптичною щільністю.

Важливий етап будь-якого варіанту твердофазного аналізу - процедура відмивання від непов'язаних реагентів. Важливо не просто сполоснути фіксовані на твердій фазі компоненти, а видалити реагенти з усієї глибини шару. Це найбільш тривалі і трудомісткі етапи аналізу. Промивання проб може проводитися в автоматичному режимі за допомогою спеціального приладу - вошера або вручну, багатоканальною піпеткою.

Прямий ІФА.

1. У лунках панелей адсорбують антигени або антитіла (досліджуваний матеріал). АГ істотно відрізняються за здатністю адсорбуватися на різних видах пластику в залежності від того, до якого класу речовин (білків, вуглеводів або ліпопротеїнів) вони належать. Часто в прямому ІФА антиген, іммобілізований на твердій фазі, це клітини та інші корпускулярні антигени.

В якості контролю використовують лунки з адсорбованим позитивним контрольним зразком, в якому обов'язково міститься антиген, і негативним контрольним зразком, де свідомо не міститься досліджуваний антиген.

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

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

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

Непрямий ІФА. Цей варіант ІФА використовують зазвичай для виявлення специфічних антитіл. У лунках панелей адсорбують стандартний антиген і інкубують з зразками сироватки або іншого біологічного матеріалу, отриманого від хворого (спинномозкова рідина, слина та ін.) Специфічні антитіла, що зв'язалося з антигеном на твердій фазі, виявляють за допомогою антиглобулінового кон'югату (рис. 11.3).



Рис. 11.3. Схематичне зображення непрямого ІФА

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

1) Антиген адсорбують на твердій фазі, потім відмивають від незв'язаних компонентів.

2) Блокують вільні місця зв'язування. Відмивають.

3) В лунки вносять досліджуваний матеріал, інкубують і потім проводять процедуру відмивання. Паралельно ставлять проби з позитивним і негативним контролюми.

4. Додають антиглобулінової кон'югат, інкубують, відмивають від незв'язаних компонентів.

5. Вносять субстрат, інкубують. Після досягнення оптимального рівня фарбування в лунках з позитивним контролем реакцію зупиняють.

6. Вимірюють кількість продукту реакції на ІФА-рідері.

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

«Сендвіч» - варіант ІФА для виявлення антигенів.

Антигени, що визначаються за допомогою даного варіанту ІФА, повинні мати кілька епітопів, здатних зв'язувати антитіла. При проведенні цього варіанту ІФА високоспецифічні полі- або моноклональні АТ, адсорбовані на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком. Після процедури відмивання в лунки вносять мічені ферментом антитіла (кон'югат) до того ж антигену і далі проводять всі інші етапи реакції (рис. 11.4).

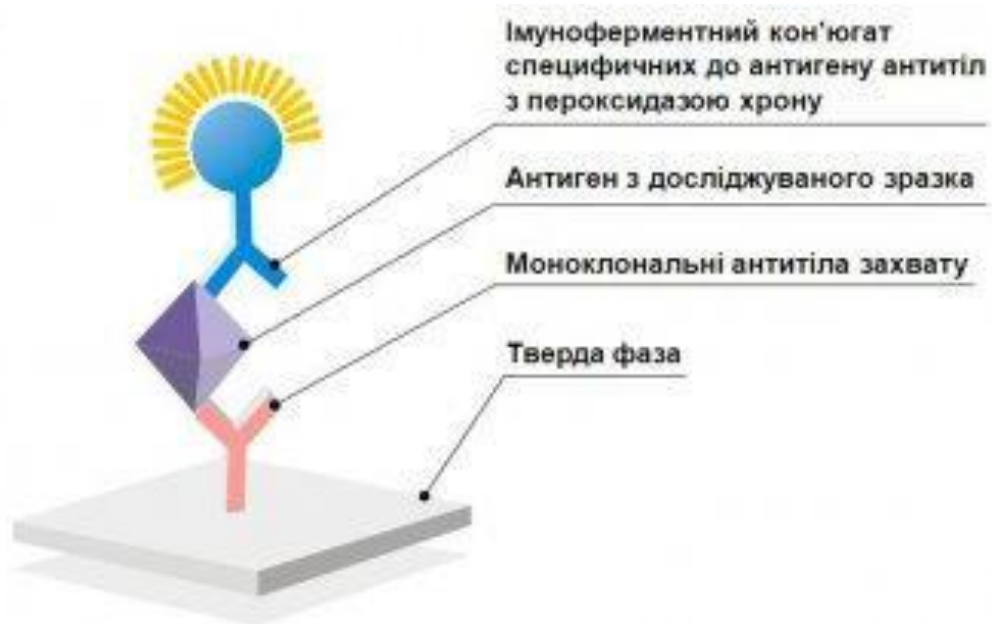


Рис. 11.4. Схематичне зображення сендвіч-ІФА.

Основні етапи аналізу:

1. На твердій фазі мобілізують АТ.

2. У лунки панелі вносять досліджуваний зразок, паралельно ставлять позитивний контрольний зразок і негативний контрольний зразок у різних розведеннях. Інкують і відмивають.

3. В лунки вносять мічені ферментом АТ - кон'югат. Після інкубації проводять відмивання.

4. Вносять субстрат, інкують. Реакцію зупиняють при досягненні оптимального фарбування в лунках з позитивним контролем.

5. Облік результатів здійснюють на ІФА-рідері.

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

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

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

Основні етапи аналізу для виявлення антигену:

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

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

Концентрація досліджуваного антигену обернено пропорційна ферментативній активності на твердій фазі. ІФА може використовуватися не

тільки для визначення розчинного антигену чи антитіла, але і клітин, що виробляють різні білки.

Завдання 1. Ознайомтесь з основними методами імунологічних досліджень. Складіть схему, яка відображала б основний принцип ІФА.

Завдання 2. Складіть схеми прямого та непрямого ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження.

Завдання 3. Схематично зобразіть сендвіч ІФА, конкурентний ІФА, інгібіторний ІФА, з'ясуйте відмінності цих методів дослідження.

Робота 2. Імуноферментний аналіз (ІФА). Якісне виділення антитіл класу IgG до вірусу SARS-CoV-2

Визначення антитіл класу IgG до SARS-CoV-2, який є причиною захворювання COVID-19, базується на принципі непрямого твердофазного аналізу у двоетапній інкубації. У лунках планшета адсорбовано рекомбінантні антигени SARS-CoV-2 - субдиниця S1 шипового глікопротеїну та нуклеопротеїн (NP). Під час першого етапу інкубації досліджуваних зразків у лунках планшета ІФА специфічні до SARS-CoV-2 антитіла, якщо вони присутні у зразках, зв'язуються з антигенами на твердій фазі. Лунки відмиваються для видалення незв'язаних антитіл, залишаються лише специфічні комплекси антиген-антитіло. Після цього додається кон'югат антивидових анти-IgG моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, який зв'язується з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси антиген-антитіло виявляються шляхом додавання розчину хромагену 3,3',5,5' - тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 20-хвилинної інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-розчину. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі за довжини хвилі 450/620-695 нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл у зразку.

Позитивний результат в ІФА-наборі є свідченням наявності у досліджуваного антитіл класу IgG специфічних до SARS-CoV-2. Наявність антитіл у новонароджених не є доказом інфікування. Негативний результат свідчить про відсутність у досліджуваному зразку IgG-антитіл, або їх концентрація нижча від межі чутливості аналізу.

Якщо зразок отримано через невеликий проміжок часу після інфікування, то антитіла класу IgG можуть не виявитись. За наявності клінічних симптомів необхідно провести повторне тестування через 5-7 днів.

Остаточний діагноз не може бути встановлений лише на підставі результатів серологічного тесту. При встановленні діагнозу слід враховувати результати комплексу лабораторних досліджень (зокрема ПЛР-аналізу), а також клінічні прояви захворювання. Не можна повністю виключити перехресні реакції з антитілами до антигенів інших коронавірусів. Крім того, з обережністю слід інтерпретувати результати досліджень в осіб з онкологічними захворюваннями та розладами імунної системи.

Хід роботи

Перед використанням витримайте всі компоненти ІФА-набору за кімнатної температури 18-25°C протягом 30 хвилин!

Склад набору: планшет ІФА, позитивний контроль - CONTROL+, негативний контроль – CONTROL-, розчин для розведення сироваток - DIL-SAMPLE, розчин кон'югату (антиглобулінові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, готовий до використання) - SOLN-CONJ, розчин ТМБ (стабілізатор, консервант, готовий до використання) - SOLN-TMB; розчин для промивання - TWEEN-WASH-20x (20-ти кратний концентрат фосфатного буфера, безбарвний), стоп-розчин - SOLN-STOP (0,5 mol H₂SO₄), клейка плівка.

I. Підготовка планшета ІФА

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте STRIPS лише після витримування 30 хвилин за кімнатної температури. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте з вологопоглиначем та зберігайте щільно закритими на замок zip-lock за температури 2-8°C. Зберігання у такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

II. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання розведіть TWEEN-WASH-20x 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад, 5 ml концентрату + 95 ml води, що достатньо для 8 лунок. При наявності кристалів у концентраті розчину для промивання прогрійте флакон за температури 37°C до повного розчинення кристалів (15-20 хвилин). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8°C не більше 7 діб.

III. Процедура аналізу

1) Підготуйте необхідну кількість лунок для аналізу (чотири лунки для контролів та необхідну кількість для досліджуваних зразків), вставте їх у рамку планшета ІФА. Лунки з контролями обов'язково включайте до кожної постановки аналізу.

2) Заповніть схему внесення зразків.

3) Приготуйте розчин для промивання згідно з пунктом II.

4) Внесіть у всі лунки по 90 мкл DIL-SAMPLE.

5) Внесіть у лунки по 10 мкл контролів та досліджуваних зразків. CONTROL+ у лунку A1. CONTROL- у лунки B1, C1, D1. У решту лунок досліджувані зразки. Під час внесення відбувається зміна кольору розчину з фіолетового на синій. Обережно піпетуйте суміші у лунках, не допускаючи піноутворення.

6) Заклейте стрипи клейкою плівкою та інкубуйте протягом 30 хвилин за температури 37°C.

7) По закінченні інкубації обережно зніміть клейку плівку та промийте лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- Видаліть вміст лунок у контейнер для рідких відходів.
- Наповніть лунки стрипів не менше ніж по 300 мкл розчином для промивання, залиште не менше ніж на 30 сек.
- Аспіруйте розчин з лунок. Залишковий об'єм розчину після кожного етапу аспірації має складати не більше 5 мкл.
- Повторіть процедуру промивання ще 4 рази.
- Після останньої аспірації позбавтесь зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

8) Внесіть у лунки по 100 мкл SOLN-CONJ. Стрипи накрийте новою клейовою плівкою та інкубуйте протягом 30 хв за кімнатної температури 18-25°C.

9) По закінченню інкубації обережно зніміть плівку та промийте лунки п'ять разів, як описано вище.

10) Внесіть у лунки по 100 мкл SOLN-TMB, не торкаючись дна та стінок лунок планшета.

11) Інкубуйте стрипи протягом 20 хв у темному місці за кімнатної температури 18-25°C. Не використовуйте клейку плівку на даному етапі.

12) Внесіть у лунки стрипів по 100 мкл SOLN-STOP для зупинення ферментативної реакції, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні SOLN-TMB. Під час внесення відбувається зміна кольору розчину з блакитного на жовтий, у лунках з прозорим розчином дещо змінюється відтінок.

13) Виміряйте на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. До проведення вимірювання переконайтеся у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок. Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому

режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку залиште лунку для встановлення бланку (в таку лунку внесіть лише SOLN-TMB та SOLN-STOP).

IV. Облік результатів та їх інтерпретація

Контроль достовірності результатів:

CONTROL+ $ОГ \geq 0,900$

CONTROL- $ОГ \leq 0,150$

Якщо у пробі $ОГ > 1,1$ – позитивний,

$0,9 \leq ОГ \leq 1,1$ – невизначений

$ОГ < 0,9$ – негативний

Невизначені зразки рекомендується дослідити повторно в двох лунках ІФА-набору. Якщо результати знову будуть у межах невизначених, слід провести відбір і аналіз нового зразка через 5-7 днів. У разі повторного одержання невизначених результатів, такі зразки вважати негативними.

Виконайте дослідження зразків сироватки крові відповідно до алгоритму, проаналізуйте отримані результати та зробіть висновки.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Яка реакція лежить в основі методу ІФА?

А) Кислотно-основна взаємодія.

В) Специфічна взаємодія «антиген-антитіло».

С) Реакція нейтралізації.

Д) Реакція окислення-відновлення.

2. Скільки основних стадій зазвичай включає процес аналізу?

А) Дві (зв'язування, детекція).

В) Три (упізнавання, формування кон'югату, детекція).

С) Чотири (підготовка, реакція, промивання, результат).

Д) П'ять (включаючи пре-аналітичний етап).

3. Що відбувається на стадії «Детекція»?

- А) Утворення імунного комплексу.*
- В) Приєднання ферменту до антитіла.*
- С) Відмивання незв'язаних компонентів.*
- Д) Перетворення ферментної мітки на сигнал.*

4. Який метод ІФА передбачає конкуренцію між аналізованою сполукою та її міченим аналогом за центри зв'язування?

- А) Неконкурентний.*
- В) Прямий.*
- С) Конкурентний.*
- Д) «Сендвіч»-метод.*

5. Чим характеризується гетерогенний ІФА?

- А) Усі реакції проходять у розчині без розділення фаз.*
- В) Аналіз проводиться на твердій фазі та вимагає стадії промивання.*
- С) Використовується виключно для виявлення газів.*
- Д) Не потребує використання ферментів.*

6. У чому полягає особливість «Сендвіч»-методу?

- А) Антиген виявляють безпосередньо міченим первинним антитілом.*
- В) Використовується лише одне антитіло.*
- С) Антиген затискається між двома антитілами (захоплюючим та детектуючим).*
- Д) Це найшвидший, але найменш чутливий метод.*

7. Який формат тесту вважається найбільш специфічним завдяки використанню двох видів антитіл до одного антигену?

- А) Прямий метод.*
- В) Непрямий метод.*
- С) Конкурентний метод.*
- Д) «Сендвіч»-метод.*

8. Яка з перелічених сфер не є типовою для застосування ІФА згідно з текстом?

- А) Діагностика інфекційних захворювань (ВІЛ, гепатиту).*
- В) Визначення рівня гормонів.*
- С) Виявлення онкомаркерів.*
- Д) Визначення групи крові за системою АВ0 (методом аглютинації).*

9. Яка з наведених переваг не стосується методу ІФА?

- А) Висока чутливість (виявлення низьких концентрацій).*
- В) Можливість автоматизації.*
- С) Використання виключно радіоактивних компонентів.*
- Д) Швидкість отримання результатів.*

Лабораторна робота 12

Тема: РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ ТА ПРЕЦИПІТАЦІЇ

Мета: з'ясувати особливості взаємодії антигенів з антитілами у реакції аглютинації; навчитись виконувати реакцію латексної аглютинації.

Обладнання і метериали: латексна суспензія; розчинник; позитивний контроль, який містить ревматоїдного фактору (РФ) більше 12 МОд/мл; негативний контроль, який містить РФ менше 12 Мод/мл; досліджувана сироватка крові; тестовий слайд; автоматичний дозатор фіксованого або варіабельного об'єму (10–100 мкл) з наконечниками; предметні скельця; палички для розмішування сироваток.

Робота 1. Реакція латексної аглютинації для напівкількісного визначення ревматоїдного фактора в сироватці крові людини

Короткі теоретичні відомості

У реакції аглютинації антигеном є бактеріальні клітини або еритроцити, перебіг реакції відбувається за наявності електrolітів, проявляється утворенням

видимого осаду – аглютиніну. Реакцію аглютинації можна ставити на склі (орієнтовна реакція та в пробірках (розгорнута реакція).

Реакція аглютинації є основним методом ідентифікації групових антигенів і скерованих проти них антитіл.

Аглютиніни – антитіла, що мають властивість спричиняти склеювання відповідних бактерій, еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, корпускулярних хімічних часточок з адсорбованими на них антигенами або антитілами з утворенням конгломератів (аглютинатів), видимих неозброєним оком.

Додавання відповідних імунних сироваток до зависі бактерій спричиняє їх аглютинацію і випадання в осад у вигляді пластівців або зерен. У реакції аглютинації беруть участь антитіла (аглютиніни) і корпускулярні антигени (аглютиногени); вони взаємодіють у певних кількісних співвідношеннях і за наявності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду).

Реакцію аглютинації використовують для ідентифікації виділених мікроорганізмів із застосуванням заздалегідь відомих аглютинуючих сироваток (рис. 12.1).

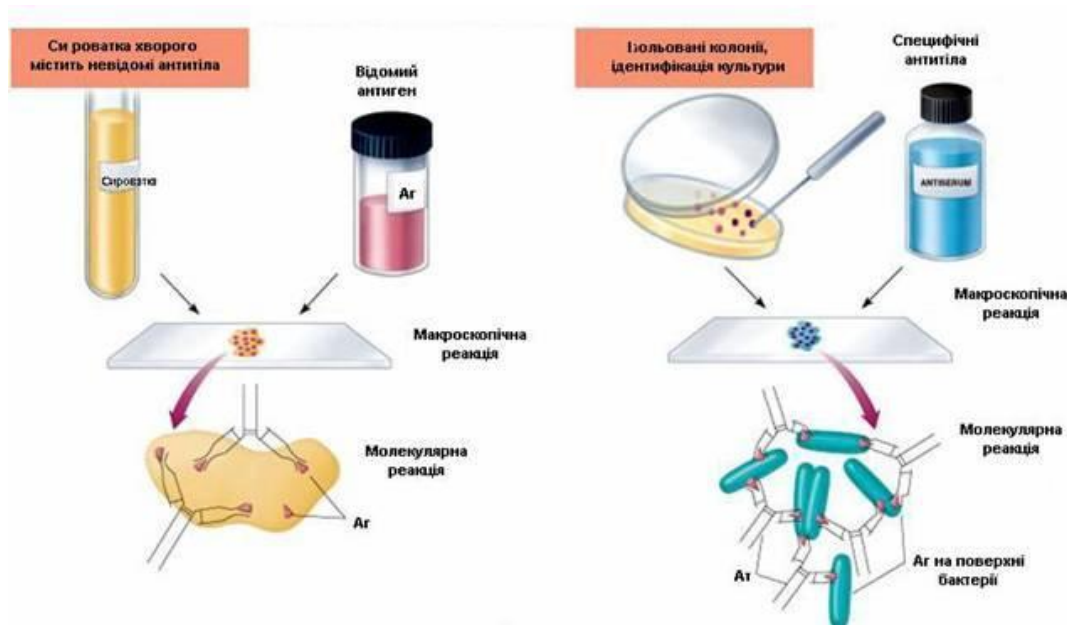


Рис. 12.1. Схематичне зображення реакції аглютинації.

Для діагностики інфекційних захворювань застосовують також реакцію непрямої гемаглютинації РНГА (антиген, який використовується для проведення РА з сироватками крові хворих, попередньо адсорбований на поверхні еритроцитів барана). Застосовують під час діагностики черевного, висипного тифів і паратифів, туберкульозу, токсоплазмозу та ін. (рис. 12.2).

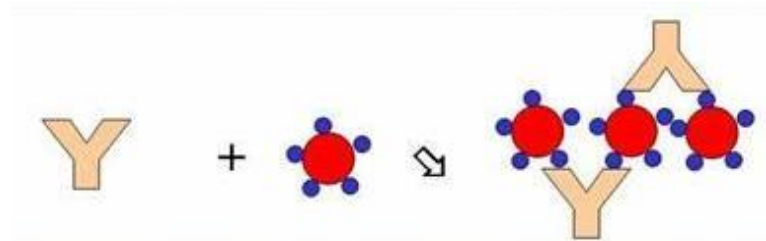


Рис. 12.2. Схематичне зображення реакції аглютинації.

Антитіла сироватки хворого аглютинують антигени, які утворили розетки з еритроцитами барана, і результаті помітний видимий неозброєним оком аглютинат.

Для постановки коаглютинації (КОА) використовують золотисті стафілококи (штам Cowan 1). У клітинній стінці цих мікроорганізмів міститься білок А, який має значну спорідненість до Fc фрагмента IgG людини і кролика. Тому молекули IgG після адсорбції на стафілококах, що мають білок А, орієнтовані в оточуюче середовище своїми вільними Fab фрагментами, в яких знаходиться активний центр антитіла.

Реакцію ставлять на скляних пластинках, змішуючи рівні об'єми (1-2 краплі) досліджуваного матеріала (кров, сеча, слина, фільтрати фекалій та інш.) і стафілококового діагностикumu. Суміш ретельно перемішують і через 2-5 хв на темному фоні враховують результати. На темному фоні повинна чітко буде проглядатись дрібнозерниста аглютинація стафілококів (рис. 12.3).

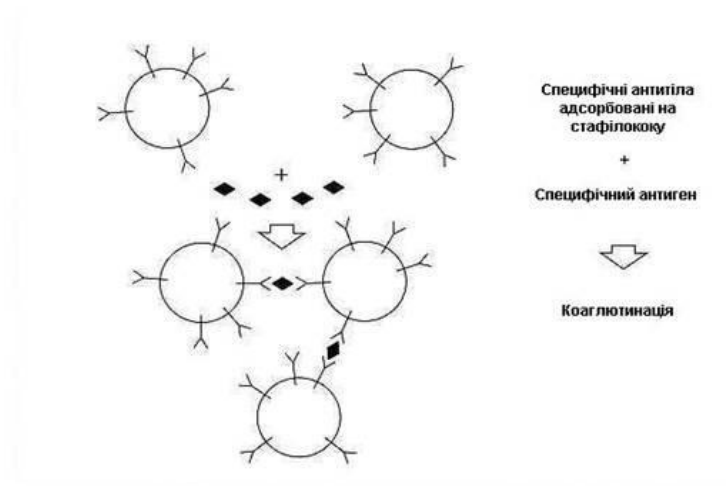


Рис. 12.3. Схематичне зображення реакції коаглютинації.

Хід роботи

У даному діагностикумі використовується принцип латексної аглютинації. Антиген, що адсорбований на нейтральних частинках латексу, вступає в реакцію аглютинації з ревматоїдним фактором (IgM проти Fc-фрагменту IgG). Інтенсивність реакції аглютинації прямо пропорційна кількості ревматоїдного фактору. Підвищення РФ характерне для ревматоїдного артриту (до 90% хворих); у нижчих титрах може спостерігатись під час інфекційного мононуклеозу, гострих запальних реакцій (бактеріального ендокардиту, сифілісу, туберкульозу, грипу і т.д.).

Підготовка реагентів: перед використанням всі реагенти необхідно витримати за кімнатної температури протягом 30 хв. Латексну суспензію слід перемішати перед використанням шляхом легкого струшування (рис. 12.4).



Рис. 12.4. Підготовка обладнання та реагентів для виконання латексної аглютинації

Техніка проведення дослідження: за допомогою розчинника приготувати розведення досліджуваної сироватки – 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 і т.д. На тестовий слайд нанести послідовно по 10 мкл позитивного контролю, негативного контролю, досліджуваної сироватки. Після цього додати по 10 мкл латексної суспензії в кожену краплю позитивного та негативного контролів та досліджуваного матеріалу, перемішати скліною паличкою. Похитувати пластину протягом 3 хв. Оцінити результати дослідження (рис. 12.5-12.6).

Як зрозуміти результат

Аглютинацію, яка відбулась після 3 хвилин, розуміють як неспецифічну. Реакцію вважають позитивною, коли спостерігається аглютинація частин латексу. Величину реакції оцінюють в «плюсах»: 4 плюси – всі частини аглютиновані, розчин прозорий; 3 плюси – 75% частин аглютиновані, розчин прозорий по краю; 2 плюси – половина частин аглютиновані, розчин трохи каламутний; 1 плюс – слабка аглютинація, розчин каламутний.

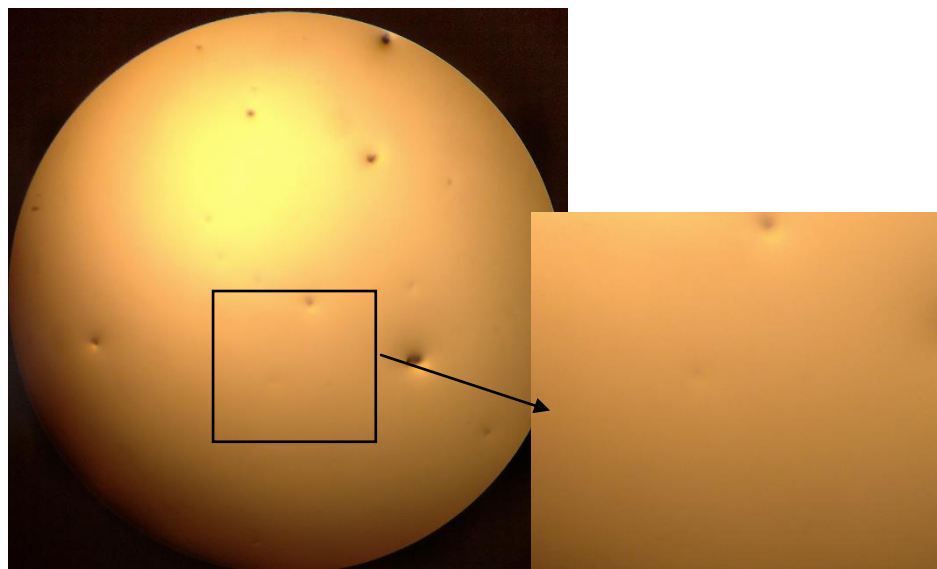


Рис 12.5. Відсутність аглютинації, немає аглютинованих часточок латексу (мале збільшення)

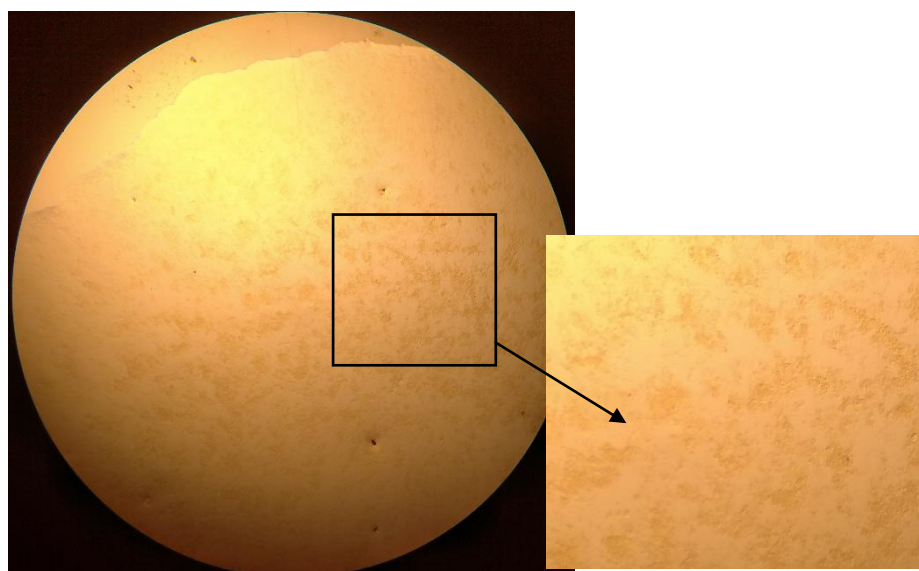


Рис 12.6. Аглютинація часточок латексу (мале збільшення)

При кількісному визначенні оцінку проводять згідно з останнім титром сироватки, який дав позитивний результат. Для визначення кількості ревматоїдного фактора в МОд/мл в пробі, необхідно найбільше розведення сироватки, що дало видиму аглютинацію, помножити на 12 МОд/мл. Наприклад, якщо аглютинація спостерігалась в титрі досліджуваної сироватки 1:20, то необхідно $20 \times 12 = 240$ МОд/мл. Нормальною величиною є показник до 12 МОд/мл. **Завдання:** виконайте реакцію латексної аглютинації.

Встановіть наявність/відсутність антитіл у досліджуваній сироватці. У випадку позитивного результату, встановіть кількість ревматоїдного фактора в МОд/мл.

Робота 2. Реакція преципітації

Теоретичні відомості

Реакція преципітації (РП) – взаємодія розчинного антигену (преципітиногену) й антитіла (преципітину) в присутності електроліту (0,85 % розчин натрію хлориду). РП відрізняється від аглютинації за характером антигенів: в реакції аглютинації вони корпускулярні, навіть цілі клітини, а в реакції преципітації – молекулярні, в розчинному стані. Антигенами можуть бути екстракти мікроорганізмів, тканин, органів, хімічні речовини.

У реакції преципітації антигеном є окремі молекули (білки, полісахариди, вони можуть бути як повними антигенами, так і гаптенами). Перебіг реакції відбувається за наявності електролітів. На нерозведену сироватку в пробірці нашаровують розведений антиген. Якщо антиген і антитіло відповідають один одному, то через кілька хвилин з'являється осад у вигляді каламутного кільця (кільця преципітації). Реакцію застосовують для діагностики менінгіту, збудника сибірки, для виявлення фальсифікації харчових продуктів. Реакцію преципітації можна ставити в гелі для виявлення токсикогенності збудників дифтерії. В судово-медичній експертизі її застосовують для визначення видової належності крові. За допомогою специфічних преципітуючих сироваток проти білка людини, різних тварин і птахів можна встановити, якому виду належить виявлена кров.

Реакція флокуляції є різновидом преципітації у рідкому середовищі. Використовується для виміру сили токсинів і анатоксинів бактерій, зокрема дифтерійного анатоксина. Для визначення специфічності взаємодії антигена і антитіла змішують у пробірках однакові об'єми цільної (або розведеної у 2 рази сироватки) і розведеного фізіологічним розчином антигена. В процесі інкубації

при 45 °С спостерігають, в якій пробірці раніше утворилися ніжні пластівці (ініціальна флокуляція). Кількість антитоксичних одиниць сироватки у пробірці з ініціальною флокуляцією відповідає кількості одиниць анатоксина. Реакцію можна урахувати точніше за допомогою вимірювання мутності реакційної суміші на фотоелектроколориметрі.

Кільцепреципітація – якісна реакція преципітації. Проводиться у спеціальних тонких преципітаційних пробірках, куди спочатку наливають нерозведену преципітуючу сироватку, а зверху на неї нашаровують розчин антигена у зростаючих розведеннях, не допускаючи змішування двох шарів. При позитивній реакції через декілька хвилин на межі розділу шарів сироватки і антигена з'являється чітке кільце білуватого кольору – преципітат. На відміну від аглютинації титр преципітуючої сироватки визначається по титру антигена, тобто по тій найменшій кількості антигена, яка ще дає преципітат. Реакція кільцепреципітації дуже чутлива і специфічна і дозволяє виявляти антигени, розведені у тисячі і навіть мільйони разів. Кільцепреципітація використовується для визначення збудників хвороб по наявності певних антигенів, а також для визначення видової приналежності крові тварин за допомогою людських, курячих та інших сироваток.

Реакція термопреципітації Асколі – різновид реакції кільцепреципітації. Вона базується на тому, що преципітиногени проявляють значну стійкість до високої температури, витримують довготривале кип'ятіння, зберігаючи при цьому здатність реагувати з антитілами. Реакція термопреципітації Асколі використовується в основному для діагностики сибірської виразки (сибірки).

Реакції преципітації в гелі проводяться на щільних середовищах – на 1% агарі чи агарозі у чашках Петрі або на скляних пластинках. Вперше цей метод запропонував Дж. Оудін ще у 1946 р., встановивши, що антитіла сироваток можуть здійснювати дифузію в гелі та зв'язуватись прямо в ньому з антигенами.

Іншими вченими були запропоновані модифікації методу преципітації в гелі. Деякі з них ми розглянемо нижче.

Зустрічна двомірна дифузія (метод Оухтерлоні) дозволяє аналізувати не одну пару «антиген – антитіло», а складні суміші мікробних антигенів і різних білків сироватки. На чашках Петрі з агаром роблять невеличкі (діаметром 5-6 мм) лунки: одна – в центрі, інші – по периметру, на відстані 1-2 см від центральної. В центральну лунку вносять антиген, а в інші – різні сироватки (або навпаки). Антигени і антитіла здійснюють дифузію у гель і починають рухатись назустріч один одному. Через 1-3 доби інкубації при кімнатній температурі в місцях, де зустрічаються специфічні антиген і антитіло, в гелі утворюються білуваті дугоподібні смужки – лінії преципітації. Якщо лінії преципітації з'являються біля декількох лунок, то в досліджуваному матеріалі є декілька компонентів, що вступають в реакцію.

Проста радіальна імунодифузія (метод Манчині) використовується в лабораторній практиці для визначення концентрації імуноглобулінів (IgM, IgG, IgA) у сироватках людей. Радіальна імунодифузія проводиться у гелі на спеціальних скляних або полістиролових пластинах. Постановка реакції передбачає наявність стандартної сироватки з відомою концентрацією імуноглобулінів (для побудування калібровочної кривої), а також моноспецифічних антисироваток проти IgM, IgG, IgA (для виявлення Ig у сироватці хворого). Антисироватку отримують шляхом імунізації тварини людськими імуноглобулінами певного класу (M, G чи A). Далі здійснюють очистку тваринної сироватки до такого стану, коли в ній залишаться антитіла тільки одного виду (наприклад, проти людських IgM).

Для постановки реакції завчасно готують гель на основі освітленого 1% агара (або агарози) з додаванням фізіологічного розчину (електроліта) і мертіюлята (консерванта). У розплавлений гель при температурі 48⁰С вносять моноспецифічні антисироватки: в одну пробірку – антисироватку проти IgM, в

другу – IgG, в третю – IgA. Кожний варіант гелю наносять на окрему спеціальну пластину і підписують її. Після застигання гелю в ньому роблять декілька горизонтальних рядів лунок з діаметром 2-3 мм. В них вносять по 20 мкл передчасно розведених проб досліджуваної сироватки хворого і стандартної сироватки. На одній пластині можна одночасно проаналізувати декілька сироваток хворих на наявність Ig певного класу. Пластини утримують у вологій камері при кімнатній температурі 48 годин. Завдяки дифузії в агар навколо лунок з'являються кільця преципітації з різним діаметром в залежності від розведення сироваток. Іноді для покращення візуалізації зон преципітації гелі профарбовують амідом-чорним. Після відмивки барвника преципітати набувають синього кольору. Вимірюють діаметр кілець зразків стандартної сироватки і для кожного виду Ig будують свою калібровочну криву, відкладаючи на осі абсцис концентрацію імуноглобуліна в пробі, а на осі ординат – квадрат діаметра зони преципітації. Вимірявши діаметри преципітатів досліджуваної сироватки на трьох пластинах, можна визначити концентрацію імуноглобулінів трьох класів у даній сироватці.

Імуноелектрофорез – варіант імунопреципітації в гелі, в якому поєднані електрофорез і метод зустрічної дифузії Оухтерлоні. Цей метод дозволяє визначати склад багатокomпонентних сумішей розчинних антигенів (до 30 компонентів). Спочатку на агаровій пластині здійснюють розділення суміші антигенів в електричному полі. Потім у канавку, вирізану в гелі паралельно напрямку електрофоретичного розділення, наливають преципітуючу сироватку. В результаті уздовж канавки утворюються дугоподібні лінії преципітації. Кількість цих ліній відповідає кількості специфічних пар “антиген – антитіло”.

Завдання 1. Перегляньте відеофільм з постановкою реакції преципітації для виявлення видової приналежності крові. Зробіть короткий аналіз переглянутого; визначте, реакції яких видів представлені.

Завдання 2. Проаналізуйте схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації, поясніть відмінності (рис. 12.7).

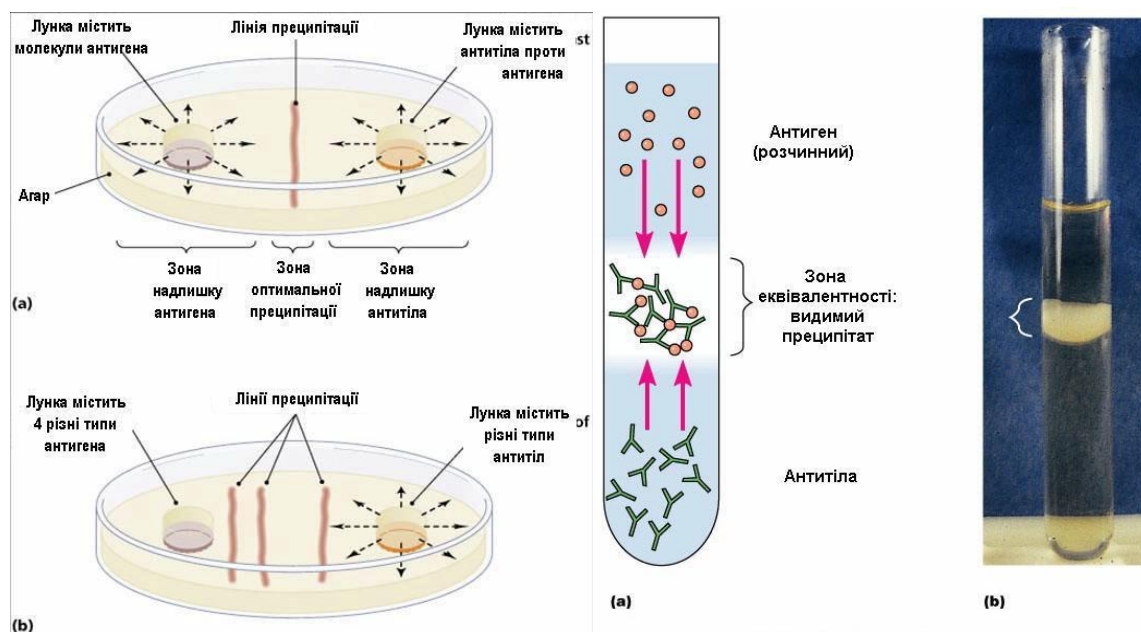


Рис. 12.7. Схематичне зображення двох варіантів реакції преципітації
Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Який тип антигену бере участь у класичній реакції преципітації?
 - A) Корпускулярний.
 - B) Розчинний (молекулярний).
 - C) Адсорбований на еритроцитах.
 - D) Вірусна частинка.
2. Який феномен лежить в основі реакції аглютинації?
 - A) Розчинення бактерій під дією комплементу.
 - B) Склеювання корпускулярних антигенів антитілами.
 - C) Осадження розчинних білків.
 - D) Руйнування еритроцитів.

3. Яка умова є обов'язковою для проходження реакцій аглютинації та преципітації (крім наявності антигену та антитіла)?

A) Наявність комплементу.

B) Відсутність електролітів.

C) Наявність електролітів.

D) Додавання барвника.

4. Як називається реакція термопреципітації, що використовується для діагностики сибірки?

A) Реакція Вассермана.

B) Реакція Асколі.

C) Реакція Відаля.

D) Реакція Райта.

5. При постановці реакції кільцепреципітації позитивний результат проявляється у вигляді:

A) Помутніння всього розчину.

B) Утворення пластівців на дні пробірки.

C) Утворення білуватого кільця на межі двох рідин.

D) Зміни кольору рідини на синій.

6. Який компонент клітинної стінки стафілокока забезпечує реакцію коаглютинації, зв'язуючись із Fc-фрагментом антитіл?

A) Пептидоглікан.

B) Ліпополісахарид.

C) Білок А.

D) Тейхоева кислота.

7. Що утворюється в гелі при позитивній реакції подвійної імунодифузії за Оухтерлоні?

A) Кольорові плями.

B) Зони лізису (просвітлення).

С) Дугоподібні лінії преципітації.

Д) Бульбашки газу.

8. Як називається найбільше розведення сироватки, яке ще дає видиму позитивну реакцію з антигеном?

А) Титр.

В) Еквівалент.

С) Концентрація.

Д) Преципітат.

9. Що використовують у реакції латекс-аглютинації як носій для антитіл або антигенів?

А) Еритроцити барана.

В) Синтетичні полімерні частинки.

С) Сироватку кролика.

Д) Фільтрувальний папір.

10. Метод імуноелектрофорезу є поєднанням двох методів:

А) Електрофорезу та аглютинації.

В) Електрофорезу та імунодифузії.

С) Електрофорезу та ПЛР.

Д) Електрофорезу та мікроскопії.

11. Для постановки реакції кільцепреципітації важливо:

А) Ретельно перемішати антиген і сироватку.

В) Нашарувати антиген на сироватку, не допускаючи змішування.

С) Додати комплемент.

Д) Нагріти суміш до 100°C.

12. Реакція аглютинації вважається специфічною, тому що:

А) Відбувається тільки у фізіологічному розчині.

В) Антитіла взаємодіють лише з гомологічним антигеном.

С) Вона проходить дуже швидко.

D) Вона вимагає використання барвників.

13. У якій зоні пробірки утворюється найбільша кількість преципітату?

A) У зоні надлишку антигену.

B) У зоні надлишку антитіл.

C) У зоні еквівалентності (оптимального співвідношення).

D) На дні пробірки незалежно від співвідношення.

Лабораторна робота 13

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ

Обладнання і матеріали: гепаринізована кров, фосфатний буфер, середовище №199, термостат, еритроцитарні діагностикуми «Анти-CD3», «Анти-CD4», «Анти-CD8», «Анти-CD22», «Анти-CD16», 0,12% розчин глютарового альдегіду, фарба Романовського-Гімза, центрифуга, пробірки (10 мл), автоматичні дозатори (20–200 мкл), лабораторний посуд, мікроскоп.

Теоретичні відомості

Лімфоцити — це центральні клітини імунної системи, які єдині в організмі здатні специфічно розпізнавати та розрізняти різноманітні антигени і відповідати активацією на контакт з ними. Вони є основою набутого (адаптивного) імунітету, забезпечуючи як клітинний, так і гуморальний захист, а також формування імунологічної пам'яті.

Морфологічно малі лімфоцити виглядають схожими, проте функціонально та за поверхневими маркерами вони поділяються на дві основні популяції: Т-лімфоцити (тимусзалежні) та В-лімфоцити.

В-лімфоцити складають основу гуморального імунітету. Їхня назва походить від органу птахів — сумки Фабриціуса (*Bursa Fabricius*), де вони були вперше описані. У ссавців та людини аналогом цього органу є кістковий мозок.

Утворення та дозрівання (Лімфопоез). У людини В-лімфоцити проходять повний цикл дозрівання в червоному кістковому мозку. У цьому процесі можна виділити три стадії:

1. Антигеннезалежна стадія: відбувається в кістковому мозку. Зі стовбурової кровотворної клітини утворюється про-В-клітина, потім пре-В-клітина. На цьому етапі відбувається перебудова генів імуноглобулінів (V(D)J-рекомбінація), що забезпечує унікальність рецепторів.
2. Селекція: незрілі В-клітини, які занадто сильно реагують на власні антигени організму, знищуються (негативна селекція) в кістковому мозку, щоб запобігти аутоімунним захворюванням.
3. Антигензалежна стадія: зрілі, але «наївні» (ті, що не зустрічали антиген) В-лімфоцити виходять у периферичну кров і мігрують у вторинні лімфоїдні органи (селезінка, лімфовузли, лімфоїдна тканина слизових). Там, після контакту з антигеном та (зазвичай) отримання сигналу від Т-хелперів, вони активуються, проліферують і диференціюються у плазматичні клітини та В-клітини пам'яті.

Структура та поверхневі маркери. Головною структурною особливістю В-лімфоцита є наявність на мембрані В-клітинного рецептора (BCR). BCR — це вбудована в мембрану молекула імуноглобуліну (спочатку IgM та IgD), яка здатна розпізнавати нативні (неперероблені) антигени.

Основні маркери (CD-антигени):

- CD19, CD20, CD22: Пан-В-клітинні маркери, присутні на всіх етапах розвитку (CD20 зникає на стадії плазматичної клітини).
- CD21: Рецептор для вірусу Епштейна-Барр та компонента комплексу C3d.

- CD40: Необхідний для взаємодії з Т-хелперами.
- МНС II класу: Молекули головного комплексу гістосумісності, необхідні для презентації антигену Т-клітинам.
- Поверхневі імуноглобуліни (slg): Виконують роль рецепторів до антигену.

Функції В-лімфоцитів:

1. Продукція антитіл (імуноглобулінів) – головна функція. Після перетворення на плазмоцит клітина стає «фабрикою» з виробництва антитіл, які нейтралізують токсини, віруси та опсонізують бактерії.

2. Антигенпрезентація – В-лімфоцити здатні захоплювати специфічний антиген, переробляти його і представляти на своїй поверхні в комплексі з МНС II для розпізнавання Т-хелперами.

3. Імунологічна пам'ять – В-клітини пам'яті зберігають інформацію про антиген роками, забезпечуючи швидку відповідь при повторному інфікуванні (вторинна імунна відповідь).

Субпопуляції В-лімфоцитів:

- В1-лімфоцити – локалізуються в порожнинах тіла (черевній, плевральній). Продукують поліспецифічні IgM («природні антитіла») без допомоги Т-клітин.

- В2-лімфоцити – основна популяція, що забезпечує високоспецифічну імунну відповідь за участю Т-хелперів.

Т-лімфоцити (Т-клітини) відповідають за клітинний імунітет та регуляцію всієї імунної відповіді. Назва походить від органу, де вони дозрівають — тимусу (вилочкова залоза).

Утворення та дозрівання (тимопоєз). Попередники Т-клітин мігрують з кісткового мозку в тимус, де проходять складний процес «навчання»:

1. Рекомбінація рецептора: формування унікального Т-клітинного рецептора (TCR).

2. Позитивна селекція: відбираються ті клітини, які здатні розпізнавати власні молекули МНС. Ті, що не здатні, гинуть.

3. Негативна селекція: знищуються ті Т-клітини, які занадто агресивно реагують на власні антигени організму (профілактика аутоімунітету).

4. Диференціація: клітини стають або CD4+ (хелпери), або CD8+ (цитотоксичні). Зрілі Т-клітини покидають тимус і заселяють Т-залежні зони лімфовузлів та селезінки.

Структура та поверхневі маркери. Основний рецептор — TCR (T-cell receptor). На відміну від В-клітин, Т-клітини не можуть розпізнавати нативний антиген. Вони бачать лише фрагменти антигену (пептиди), «подані» їм на молекулах МНС іншими клітинами.

Основні маркери:

- CD3: Маркер усіх зрілих Т-клітин, є частиною рецепторного комплексу, передає сигнал всередину клітини.
- CD4: Маркер Т-хелперів. Зв'язується з МНС II класу.
- CD8: Маркер Т-кілерів. Зв'язується з МНС I класу.
- CD28: Ко-стимулююча молекула (необхідна для активації).
- Рецептори до еритроцитів барана (CD2): використовуються в лабораторній діагностиці (реакція розеткоутворення).

Основні субпопуляції та їх функції

Т-хелпери (Th, CD4+) є регуляторами імунної відповіді. Вони не вбивають ворогів самостійно, а активують інші клітини. Розпізнають антигени в комплексі з МНС II. Серед Т-хелперів розрізняють:

- Th1 (хелпери 1-го типу): Продукують інтерлейкін-2 (IL-2), інтерферон-гамма (IFN- γ). Активують макрофаги, NK-клітини та Т-кілери. Відповідають за клітинний імунітет (проти вірусів, внутрішньоклітинних бактерій).

- Th2 (хелпери 2-го типу): Продукують IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Активують В-лімфоцити до вироблення антитіл. Відповідають за гуморальний імунітет та захист від паразитів.

Т-цитотоксичні лімфоцити (Т-кілери, CTL, CD8+) є ефекторами імунної відповіді, які розпізнають клітини організму, інфіковані вірусами або трансформовані в пухлинні (які представляють чужорідні пептиди на МНС I). При контакті з мішенню вони виділяють білки перфорин (робить дірки в мембрані) та гранзими (запускають апоптоз — самогубство клітини).

Т-регуляторні клітини (T-reg) - раніше відомі як Т-супресори. Їх функція — пригнічувати імунну відповідь, коли інфекцію подолано, та запобігати аутоімунним реакціям.

Взаємодія у формуванні імунної відповіді

Т- та В-лімфоцити не працюють ізольовано. Ефективна імунна відповідь потребує їх тісної кооперації:

1. Т-залежна активація В-клітин: для того щоб В-лімфоцит почав виробляти високоспецифічні антитіла (наприклад, IgG) і перетворився на клітину пам'яті, йому зазвичай потрібен сигнал від Т-хелпера (Th2). В-клітина «презентує» шматочок антигену Т-хелперу, і якщо Т-хелпер розпізнає його, він виділяє цитокіни (IL-4), які дають команду В-клітині ділитися.

- Регуляція: Т-хелпери через продукцію цитокінів визначають, як саме буде боротися організм. Якщо переважають віруси/бактерії всередині клітин -> активуються Th1 -> стимуляція Т-кілерів та макрофагів. Якщо бактерії/токсини у крові -> активуються Th2 -> стимуляція В-клітин до синтезу антитіл.

Хід роботи

Робота 1. Визначення Т-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами барана

Усі Т-лімфоцити мають рецептори до еритроцитів барана, тому за реакцією розеткоутворення (приєднання не менше трьох еритроцитів до одного Т-лімфоцита) визначають частку цих клітин у суспензії лімфоцитів (рис. 13.1).

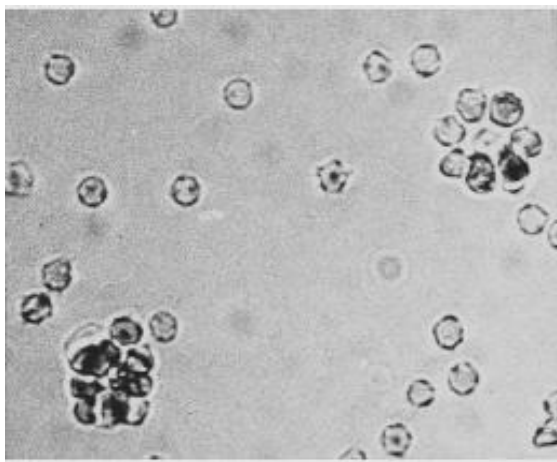


Рис. 13.1. Реакція розеткоутворення з еритроцитами барана

Для постановки реакції розеткоутворення потрібно взяти 3-6 мл гепаринізованої крові, додати таку ж кількість фосфатного буферу. Склад фосфатного буферу: KH_2PO_4 (1,15 г), Na_2HPO_4 (0,2 г), KCl (0,2 г), NaCl (8 г) на 1 л дистильованої води. Лімфоцити виділяються з гепаринізованої крові центрифугуванням в одноступеневому градієнті фікол-верографін (густина 1,077 г/мл). На свіжоприготований одноступеневий фікол-верографіновий градієнт (2 мл) у центрифужній пробірці нашаровується за допомогою піпетки з грушею кров, розбавлена ФСБ (фосфатним буфером). Методика виготовлення градієнту: 147 мг фіколу-400 розчиняється у теплій дистильованій воді. Змішується з 0,3 мл 76% розчину верографіну. Об'єм доводиться до 2 мл. Температура зберігання розчину $+8^\circ\text{C}$. Пробірки з нашарованою на градієнт кров'ю центрифугуються протягом 20–25 хв при 1500 об/хв. Піпеткою з грушею відбирається середній шар, що містить лімфоцити (каламутний, незабарвлений), в окремі пробірки.

З отриманих лімфоцитів готують суспензію на середовищі №199, вона повинна містити 2 млн лімфоцитів на 1 мл.

У пробірку вносять рівну кількість (по 0,1 або по 0,2 мл) суспензії лімфоцитів та 0,5% суспензії еритроцитів барана. Інкують в термостаті протягом 30 хв за температури 37 °C і в холодильнику протягом 1 год.

Підрахунок клітин виконують в камері Горяєва. Підраховують 200 лімфоцитів, серед них визначають відсоток тих клітин, які утворили розетки з еритроцитами барана.

За результатами загального аналізу крові досліджуваного визначають абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові.

Завдання 1. Визначте абсолютну кількість Т-лімфоцитів у крові. За отриманими результатами зробіть висновки про стан клітинного імунітету досліджуваного.

Робота 2. Визначення В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами барана, навантаженими антитілами до еритроцитів та комплементом

Усі В-лімфоцити мають рецептори до С3-компонента комплементу. Тому для визначення В-лімфоцитів необхідно навантажити еритроцити барана специфічними антитілами до них та комплементом. Утворені на поверхні еритроцитів барана комплекси дозволять В-лімфоцитам взаємодіяти з еритроцитами барана.

Готують 5% суспензію еритроцитів барана. Еритроцити навантажують антитілами, для цього використовують гемолітичну сироватку в субгемолітичній дозі. Суміші лімфоцитів та навантажених еритроцитів інкують протягом 30 хв за температури 37 °C.

У здорової людини кількість В-лімфоцитів у периферичній крові складає 20-25% від загальної кількості лімфоцитів.

Завдання 2. Визначте абсолютну кількість В-лімфоцитів у крові. За отриманими результатами зробіть висновки про стан В-системи імунітету досліджуваного.

Робота 3. Визначення субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів з використанням еритроцитарних діагностиків «Анти-CD3», «Анти-CD4», «Анти-CD8», «Анти-CD22», «Анти-CD16»

Принцип методу базується на визначенні субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD3 (Т-лімфоцити), CD4 (Т-хелпери), CD8 (Т-супресори), CD19 або CD22 (В-лімфоцити), CD16 (натуральні кілери). Облік результатів дослідження проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Для даного дослідження достатньо 3 мл крові з гепарином. Мононуклеарний завис (лімфоцити) одержують на градієнті щільності 1,077. Відмивають клітини 2-3 рази фізіологічним розчином або фосфатним буфером рН 7,2-7,4. Бажана концентрація клітин у зависі 2×10^6 /мл (20 клітин у великому квадраті камери Горяєва).

Підготовка діагностикума. Погойдуванням флакона осад еритроцитів ресуспендують без піноутворення. Можливе ресуспендування стерильним шприцом ємністю 2 мл: голкою проколюють пробку, набирають суміш і випускають у флакон кілька разів (без піноутворення). Набирають шприцом кількість, необхідну для роботи (на одну пробу 0,05мл) та переносять у стерильні пробірки.

Визначення. У пробірки вносять 0,05 мл (50 мкл) CD-діагностикума і додають 0,05 мл завису лімфоцитів. Інкують суміш 40 хв за температури 37 °С, центрифугують при 1000 об/хв протягом 5 хвилин, залишають на 1 годину у холодильнику за температури +4 °С. Після цього відбирають надосадову

рідину. Додають до осаду 0,05 мл 0,12% розчину глютарового альдегіду й обережно ресуспензують (без утворювання піни!). Витримують 5-7 хвилин, знову обережно ресуспензують. Роблять мазок приблизно на 1 см² площі знежиреного предметного скла, висушують, фіксують спиртом і зафарбовують фарбою по Романовському. За допомогою світлового мікроскопу з імерсійною системою підраховують відсоток розеткоутворюючих лімфоцитів, що зв'язують не менш 3-х еритроцитів із CD-діагностикумами на 200 клітин. Важливо не враховувати гранулоцити, агрегати клітин, а також лімфоцити, що потрапили в агрегати. Можна також підраховувати розеткоутворюючі лімфоцити в нативному препараті в камері Горяєва.

Слід зауважити, що мазки рекомендовано робити на добре обезжиреному спирт-ефіром склі в вигляді моношару. Запобігати утворенню нашарування клітин. Діагностикуми повинні зберігатися за температури від +2 до +10°C. Не допускати замороження.

Як зрозуміти результат

Відсоток Т-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD3-діагностикумом. Норма для дорослих – 50-80% (середнє 60±5%); для дітей – 47-76% (середнє 55±4,8%).

$$\text{Абсолютна кількість у 1 мкл крові} = A \times U \times C : 10000,$$

де: А – кількість лейкоцитів у 1 мкл крові, U – відсоток лімфоцитів у формулі крові, С – відсоток розеткоутворюючих Т-лімфоцитів.

Відсоток Т-хелперів (Th) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD4-діагностикумом. Норма – 33-46% (середнє 40±3,0%).

Відсоток Т-супресорів (Ts) дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD8-діагностикумом. Норма – 17-30% (середнє 22±1%).

Імуно-регуляторний індекс (показник CD4/CD8). Окрім визначення чисельності популяцій і субпопуляцій, важливе значення надається обчисленню

показника CD4/CD8 - імуно-регуляторного індексу або хелперно-супресорного відношення (норма – $1,8 \pm 0,4$). Зменшення імуно-регуляторного індексу спостерігається при вірусних інфекціях, у новонароджених і при пересадці кісткового мозку, а збільшення - при аутоімунних захворюваннях, алергії. IPI: $Th/Ts = 1,4 - 2,0$ (IPI – імунорегуляторний індекс, Th – Т-хелпери, Ts – Т-супресори).

Відсоток В-лімфоцитів дорівнює відсотку розеткоутворюючих лімфоцитів із CD22-діагностикумом. Абсолютну кількість В-лімфоцитів визначають також як і Т-лімфоцитів. Норма – 17-31% (середнє $23 \pm 3,6\%$).

Відсоток натуральних кілерів дорівнює відсотку лімфоцитів, що утворюють розетки із CD16-діагностикумом. Норма – 12-23% (середнє $16 \pm 4,5\%$).

Завдання 3. Визначте відсоток клітин різних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів за допомогою еритроцитарних діагностиків, порівняйте отримані результати з нормою. Визначте та оцініть імуно-регуляторний індекс.

Сформууйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. У якому первинному лімфоїдному органі В-лімфоцити завершують свою антигеннезалежну стадію дозрівання у людини?

- А) Селезінка.*
- В) Тимус.*
- С) Червоний кістковий мозок.*
- Д) Лімфатичні вузли.*

2. Який орган відповідає за позитивну та негативну селекцію Т-лімфоцитів, що забезпечує толерантність до власних антигенів?

- А) Селезінка.*
- В) Печінка.*

C) Кістковий мозок.

D) Тимус.

3. Який тип імунної відповіді опосередковується В-лімфоцитами?

A) Клітинний імунітет.

B) Неспецифічний імунітет.

C) Гуморальний імунітет.

D) Вроджений імунітет.

4. Яка головна ефektorна молекула, що синтезується плазматичними клітинами (диференційованими В-лімфоцитами)?

A) Інтерферон.

B) Перфорин.

C) Імуноглобулін (антитіло).

D) Комплемент.

5. Який поверхневий маркер характерний для всіх зрілих Т-лімфоцитів і є частиною їхнього рецепторного комплексу (TCR)?

A) CD20.

B) CD4.

C) CD3.

D) CD19.

6. Який маркер Т-лімфоцитів зв'язується з молекулами МНС II класу і є характерним для Т-хелперів?

A) CD8.

B) CD3.

C) CD40.

D) CD4.

7. На відміну від В-лімфоцитів, Т-лімфоцити розпізнають антиген лише у формі: *A) Цілої молекули антигену (нативний антиген).*

B) Агрегатів імуноглобулінів.

С) Пептидного фрагмента у комплексі з молекулою МНС.

Д) Білка комплементу С3b.

8. Яка субпопуляція Т-лімфоцитів відповідає за пряме знищення клітин-мішеней (інфікованих вірусами або пухлинних)?

А) Т-хелпери (CD4+).

В) Т-регуляторні клітини.

С) Т-кілери (CD8+).

Д) В-лімфоцити.

9. Які цитокіни, що виділяються Т-хелперами 2-го типу (Th2), є ключовими для активації В-лімфоцитів?

А) Інтерферон-гамма (IFN- γ) та IL-2.

В) Фактор некрозу пухлини- α (TNF- α) та IL-1.

С) Інтерлейкін-4 (IL-4) та IL-5.

Д) Трансформуючий фактор росту-beta (TGF- β) та IL-10.

10. В-лімфоцит розпізнає нативний антиген і захоплює його. Що він робить далі, щоб отримати сигнал для повноцінної активації (Т-залежна відповідь)?

А) Відразу диференціюється у плазматичну клітину без сторонньої допомоги.

В) Виділяє перфорин для знищення антигену.

С) Представляє фрагмент антигену на МНС II класу для Т-хелпера.

Д) Активує NK-клітини.

11. Т-регуляторні клітини (T-reg) виконують функцію:

А) Посилення цитотоксичної дії Т-кілерів.

В) Продукції антитіл IgE.

С) Пригнічення імунної відповіді та підтримання ауто толерантності.

Д) Антигенпрезентації.

12. Які молекули МНС розпізнаються Т-кілерами (CD8+) і присутні практично на всіх ядровмісних клітинах організму?

- A) MHC II класу .*
- B) MHC I класу.*
- C) CD21.*
- D) HLA-DR.*

13. Яка з перелічених функцій є спільною як для В-лімфоцитів, так і для Т-лімфоцитів?

- A) Продукція антитіл.*
- B) Пряма цитотоксичність за допомогою перфोरину.*
- C) Формування імунологічної пам'яті.*
- D) Розпізнавання нативного антигену.*

14. Що відбувається з незрілим В-лімфоцитом у кістковому мозку, якщо він виявляє надмірну реактивність до власних антигенів (негативна селекція)?

- A) Він виходить у периферичну кров і стає Т-регуляторною клітиною.*
- B) Він диференціюється у плазматичну клітину.*
- C) Він знищується шляхом апоптозу.*
- D) Він мігрує до тимусу для подальшої селекції.*

15. Який цитокін, що продукується Т-хелперами 1-го типу (Th1), є критично важливим для активації макрофагів і посилення клітинного імунітету?

- A) Інтерлейкін-6 (IL-6).*
- B) Інтерлейкін-4 (IL-4).*
- C) Інтерферон-гамма (IFN- γ).*
- D) Інтерлейкін-10 (IL-10).*

16. Як називається процес у В-лімфоцитах, під час якого відбувається перебудова генів імуноглобулінів для забезпечення унікальності рецепторів?

- A) Клональна селекція.*
- B) Апоптоз.*
- C) V(D)J-рекомбінація.*
- D) Опсонізація.*

Питання 20

17. Який з перелічених імуноглобулінів В1-лімфоцити продукують без допомоги Т-клітин, часто утворюючи природні антитіла?

A) IgG.

B) IgA.

C) IgM.

D) IgE.

Лабораторна робота 14

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ КЛАСІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ

Обладнання і матеріали: досліджувана сироватка крові, анти-IgA-, анти-IgG-анти-IgM-глобулінова сироватка, стандартна сироватка крові донора, сухий агар-агар, скляні пластини 9×12 см.

Теоретичні відомості

Імуноглобуліни (антитіла) — це білкові молекули, які синтезуються плазматичними клітинами (диференційованими В-лімфоцитами) у відповідь на потрапляння антигену. Вони є гуморальними факторами адаптивного імунітету і здатні специфічно зв'язувати той антиген, що спричинив їх утворення.

Структура. Базова структура молекули імуноглобуліну є універсальною для всіх класів і складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів: двох ідентичних важких (H - heavy) ланцюгів (визначають клас (ізотип) імуноглобуліну (γ , α , μ , δ , ϵ) та двох ідентичних легких (L - light) ланцюгів.

Ланцюги з'єднані між собою дисульфідними зв'язками, утворюючи Y-подібну структуру.

Кожен ланцюг має варіабельні (V - variable) домени, які формують антигензв'язуючий центр (Fab-фрагмент) і визначають специфічність антитіла. Константні (C - constant) домени визначають біологічні функції імуноглобуліну, його клас та здатність взаємодіяти з іншими компонентами імунної системи (наприклад, системою комплементу).

Функції: нейтралізація (зв'язування токсинів та вірусів, запобігаючи їх проникненню в клітини), опсонізація (покриття антигенів, що полегшує їх розпізнавання та фагоцитоз макрофагами і нейтрофілами), аглютинація/преципітація (зв'язування розчинних антигенів або корпускулярних частинок у комплекси, що полегшує їх видалення), активація системи комплементу (запуск класичного шляху комплементу (IgM та IgG), що призводить до лізису клітин-мішеней), антитілозалежна клітинна цитотоксичність (зв'язування з клітинами-мішенями та активація NK-клітин або інших ефекторних клітин).

Імуноглобуліни поділяються на п'ять класів залежно від структури їх важких ланцюгів: IgG, IgA, IgM, IgE та IgD.

Імуноглобуліни G (IgG). Ці імуноглобуліни є мономерами. Це найбільш поширений клас (близько 75-80% від усіх Ig). Єдиний клас, що здатний проходити через плаценту. Вони Відповідають за вторинну імунну відповідь, нейтралізують токсини, бактерії, віруси, є ефективними опсонінами. Беруть участь у реакції активації комплементу (класичний шлях). Забезпечують пасивний імунітет плода та новонародженого. Залучені до антитілозалежної клітинної цитотоксичності.

Імуноглобуліни A (IgA). У сироватці ці імуноглобуліни мають мономерну будову, але в секретах (слина, сльози, молоко, секрети дихальних, травних та сечостатевого шляхів) існують у формі димера, з'єднаного J-ланцюгом та оснащеного секреторним компонентом (захищає IgA від протеолізу). Забезпечують захист слизових оболонок (місцевий імунітет), запобігають адгезії

(прилипанню) мікроорганізмів до епітелію. IgA є слабкими опсонінами та слабо активують комплемент (альтернативний шлях).

Імуноглобуліни М (IgM). Найбільший за розміром Ig. Це пентамер (складається з п'яти мономерів), з'єднаний J-ланцюгом. Його висока валентність (10 антигензв'язуючих центрів) робить його надзвичайно ефективним. IgM відповідають за первинну імунну відповідь. Це перше антитіло, яке синтезується у відповідь на антиген. Ці імуноглобуліни надзвичайно ефективно активують комплемент (класичний шлях), здійснюють аглютинацію (склеювання) бактерій та еритроцитів. Знаходиться на поверхні зрілих В-лімфоцитів як рецептор разом з IgD.

Імуноглобуліни Е (IgE). Мають мономерну будову, їх найменше в сироватці, але важливі для захисту. Fc-фрагмент IgE має високу спорідненість до рецепторів на поверхні тучних клітин (мастоцитів) та базофілів. При повторному контакті з антигеном (алергеном) зв'язування IgE з антигеном викликає дегрануляцію цих клітин і викид медіаторів запалення (гістамін), що є основою алергічних реакцій негайного типу (типу I). Здійснюють захист від великих паразитів (гельмінтів).

Імуноглобуліни D (IgD). Мають мономерну будову молекули. Головна роль — бути рецептором на поверхні незрілих В-лімфоцитів (разом з IgM). Беруть участь в активації В-лімфоцитів та їх дозріванні. Функція IgD в сироватці крові залишається до кінця не вивченою. IgD не мають вираженої ефекторної функції, їх роль пов'язана переважно з ініціацією імунної відповіді.

Робота 1. Визначення загальної кількості імуноглобулінів основних класів методом радіальної імунодифузії в гелі (реакція Манчіні)

В основі реакції лежить реакція преципітації в гелі. При цьому антигенами виступають антитіла сироватки крові досліджуваного, а антитілами —

антиглобулінові антитіла кролика, імунізованого людськими імуноглобулінами одного з класів (антиглобулінова сироватка).

Вміст антитіл певного класу у досліджуваній сироватці визначається у порівнянні зі стандартною сироваткою крові донора із зазначеним вмістом імуноглобулінів кожного класу (мг/мл).

Із сухого агару готують гель, який ще теплим змішують з однією з моноспецифічних сироваток і заливають на скло. Для отримання суміші 3 %-го агару у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6 змішують при 56 °С у співвідношенні 1:1 з антисироваткою, в якій концентрація антитіл вдвічі перевищує робочий титр (титр у реакції імунної дифузії (РІД)), вказаний на ампулі.

Скляні пластини розміром 9×12 см покривають рівномірним шаром суміші агару з моноспецифічною антисироваткою. Для цього на пластину поміщають латунну П-подібну рамку завтовшки 1 мм, зверху поміщають другу скляну пластину, змочену гідрофобною рідиною; простір між пластинами заливають сумішшю агару і антисироватки об'ємом 9 мл.

Після застигання роблять два ряди лунок діаметром 2 мм. У перший ряд лунок наливають по 2 мкл стандартної сироватки в розведенні 0, 1:2, 1:4, 1:8 (для калібрувальної кривої). У лунки другого ряду наливають цільні сироватки досліджуваних. Оскільки визначають три класи імуноглобулінів, то таких скелець потрібно теж три, для кожного класу - свій гель з антисироваткою та свій ряд стандартної сироватки для побудови калібрувальної кривої.

Пластини інкубують у вологій камері за температури 4 °С. Для визначення IgG та IgA протягом 24 год, для визначення IgM – протягом 48 год.

Після цього вимірюють діаметр кільця преципітації стандартної і досліджуваної сироваток, виміри проводять під лупою з дворазовим збільшенням на темному фоні при косому освітленні. Якщо коли діаметр кільця преципітації досліджуваних препаратів перевищує діаметр кільця преципітації

нерозведеної контрольної сироватки, досліджувані матеріали необхідно розводити (рис. 14.1).

За результатами вимірювань стандартної сироватки креслять калібрувальні криві для кожного класу імуноглобулінів окремо, відкладаючи на осі абсцис (X) діаметри кілець преципітації в мм, а на осі ординат (Y) – кількість імуноглобулінів у мг/мл. Вміст кожного із класів імуноглобулінів у досліджуваній сироватці визначають за відповідною кривою.

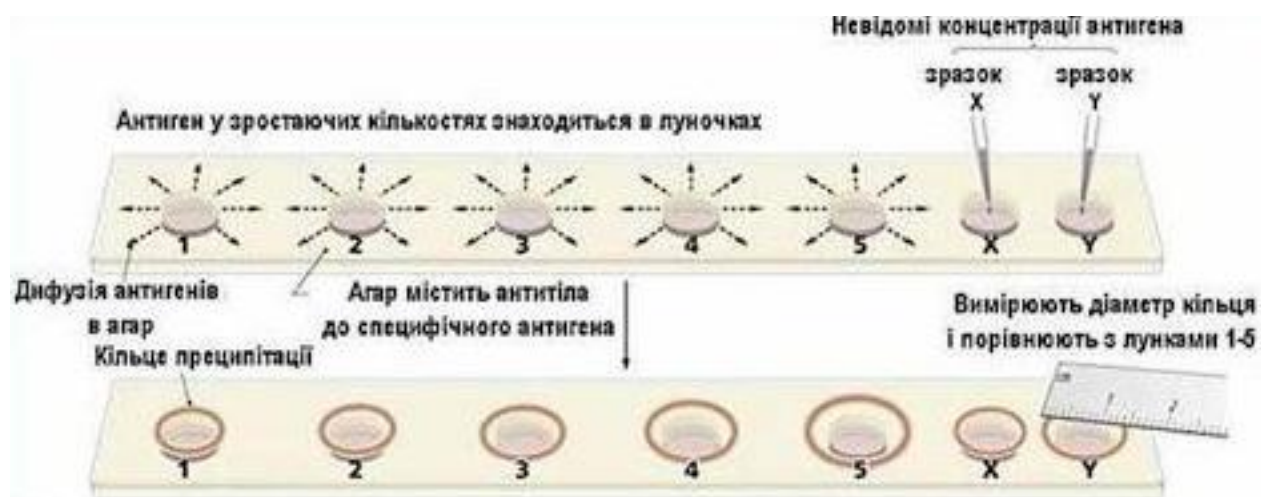


Рис. 14.1. Вимірювання діаметрів кілець преципітації

У здорової людини концентрація IgG у сироватці крові складає 6-16 мг/мл, IgA – 0,5-1,8 мг/мл, IgM – 1-5 мг/мл.

Завдання. Визначити вміст імуноглобулінів G, A, M у досліджуваній сироватці крові за допомогою реакції Манчіні. Оцінити отримані результати.

Сформуйте висновки до роботи.

Тестові завдання для самоконтролю

1. Який клас імуноглобулінів є єдиним, що здатний проникати через плацентарний бар'єр, забезпечуючи пасивний імунітет плода?

A) IgM.

B) IgA.

C) IgG.

D) IgE.

2. Яка структура імуноглобуліну визначає його специфічність до певного антигену?

A) Константні домени важких ланцюгів.

B) J-ланцюг.

C) Fc-фрагмент.

D) Варіабельні домени.

3. Який клас імуноглобулінів першим синтезується плазматичними клітинами у відповідь на первинне потрапляння антигену?

A) IgA.

B) IgG.

C) IgM.

D) IgE.

4. Основна роль секреторного IgA полягає в:

A) Активації системи комплементу за класичним шляхом.

B) Захисті слизових оболонок від адгезії мікроорганізмів.

C) Спричиненні алергічних реакцій негайного типу.

D) Нейтралізації циркулюючих у крові токсинів.

5. Який клас імуноглобулінів асоційований із гіперчутливістю негайного типу (алергічними реакціями) та захистом від гельмінтів?

A) IgD.

B) IgA.

C) IgE.

D) IgM.

6. Який структурний компонент молекули імуноглобуліну забезпечує її біологічні функції (наприклад, зв'язування з рецепторами на макрофагах, активація комплементу)?

A) Варіабельні домени.

B) Fab-фрагмент.

C) Fc-фрагмент.

D) Легкі ланцюги.

7. Яка форма IgA (мономер чи димер) містить секреторний компонент, що захищає його від протеолізу?

A) Мономер (сироватковий IgA).

B) Димер (секреторний IgA).

C) Обидві форми.

D) Жодна з форм IgA.

8. Який клас імуноглобулінів має валентність 10 (здатність зв'язувати 10 однакових антигенів)?

A) IgG.

B) IgE.

C) IgM.

D) IgD.

9. Який механізм захисту описує термін «опсонізація»?

A) Пряме руйнування клітини-мішені системою комплементу.

B) Зв'язування токсинів та вірусів, запобігаючи їх проникненню в клітини.

C) Покриття антигенів, що полегшує їх фагоцитоз.

D) Склеювання корпускулярних антигенів (наприклад, бактерій).

10. IgD та мономерний IgM виконують головну функцію як:

A) Секреторні антитіла на поверхні слизових оболонок.

B) Активатори антитілозалежної клітинної цитотоксичності.

C) Рецептори на поверхні незрілих B-лімфоцитів.

D) Медіатори алергічних реакцій.

11. Який тип зв'язку з'єднує важкі та легкі ланцюги, а також важкі ланцюги між собою в базовій структурі імуноглобуліну?

- A) Пептидні зв'язки.*
- B) Водневі зв'язки.*
- C) Дисульфідні зв'язки.*
- D) Іонні зв'язки.*

12. Оберіть функцію, яка є спільною для IgG та IgM, але відсутня або слабко виражена у IgE та IgD:

- A) Нейтралізація токсинів.*
- B) Активація класичного шляху системи комплементу.*
- C) Зв'язування з рецепторами тучних клітин.*
- D) Захист слизових оболонок.*

13. У чому полягає механізм антитілозалежної клітинної цитотоксичності?

- A) Фагоцитоз клітини, покритої антитілами.*
- B) Лізис клітин-мішеней ефекторними клітинами (наприклад, NK-клітинами) після їх зв'язування з Fc-фрагментом IgG.*
- C) Пряме руйнування клітини-мішені комплексом антиген-антитіло.*
- D) Склеювання (аглютинація) інфікованих клітин.*

14. Яке твердження щодо IgD є найбільш коректним?

- A) Він є основним антитілом вторинної відповіді.*
- B) Він здатний формувати димери і пентамери.*
- C) Він є одним із ключових рецепторів на поверхні незрілих В-лімфоцитів.*
- D) Він активно бере участь у опсонізації бактерій.*

15. Який клас імуноглобулінів є найбільш ефективним у процесі аглютинації корпускулярних антигенів, таких як бактерії?

- A) IgG.*
- B) IgA.*
- C) IgM.*
- D) IgE.*

16. Яка функція є основною для IgG під час вторинної імунної відповіді?

- A) Захист від алергічних реакцій.*
- B) Ініціація первинної гуморальної відповіді.*
- C) Ефективна та швидка нейтралізація і опсонізація патогенів.*
- D) Транспорт антитіл до слизових оболонок.*



Перелік використаних джерел

1. Анатомія людини. URL: <https://anatom.ua/basis/text/all/3-23/>
2. Бесчасний С. П., Гасюк О. М. Імунологія : навч. посіб. Херсон : ФОП Вишемирський В. С., 2019. 196 с.
3. Білаш С. М., Борута Н. В., Шепітько В. І. та ін. Сучасні погляди на структурну організацію червоного кісткового мозку, особливості перебігу захворювань його та медико-біологічне значення препаратів з плацентарної тканини // Світ медицини та біології. 2017. № 1(59). С. 180-186.
4. ДСТУ ISO 10993-7:2004 «Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 7. Залишки після стерилізації етиленоксидом» (ISO 10993-7:1995, IDT) тощо.
5. Імунологія: підручник / Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко та ін.; за ред. Л. В. Кузнецова, В. Д. Бабаджан, Н. В. Харченко. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. 565 с.
6. Імунопрофілактика інфекційних хвороб : навч.-метод. Посіб. / Чернишова Л. І., Лапій Ф. І., Волоха А. П. К.: ВСВ «Медицина», 2019. 320 с.
7. Інструкція з визначення груп крові за системою АВ0. Наказ МОЗ України. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/MOZ2277>
8. Інструкції та паспорти до використання моноклональних реагентів. ТОВ «Гранум», м. Харків, 2020.
9. Інструкції та паспорти до використання стандартних еритроцитів. ТОВ «Гранум», м. Харків, 2020.
10. Інструкція з використання діагностикуму «РФ-латекс-тест» ТОВ «Лабораторія Гранум», м. Харків, 2020.
11. Калиниченко Т. О., Аношина М. Ю., Павлюк Р. П., Балан В. В. Дослідження кріочутливості клітин пуповинної крові: зв'язок з окремими антигенними

- детермінантами груп крові. Scientific Journal «ScienceRise». №12(41). 2017. С. 14–20.
- 12.Кременчуцький Г. М., Крушинська Т. Ю., Степанський Д. О., Юргель Л. Г. та ін. практичні заняття з медичної мікробіології, вірусології та імунології (Модулі 1, 2). Дніпропетровськ: ДДМА, 2010. 288 с.
- 13.Кузнецова Л. В., Бабаджан В. Д., Харченко Н.В. та ін. Імунологія: підручник. Вінниця: ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. 565 с.
- 14.Малоштан Л. М., Рядних О. К., Жегунова Г. П. та ін. Фізіологія з основами анатомії людини. Х.: Вид-во НФаУ: Золоті сторінки, 2003. 432 с.
- 15.Лаповець Л. Є., Акімова В. М., Лебедь Г. Б. та ін. Лабораторна імунологія : навчальний посібник. Львів: Видавець Марченко Т. В., 2024. 318 с.
- 16.Луцик О. Д., Іванова А. Й., Кабак К. С. Гістологія людини : Підручник. Вид. 4-те, доповнене і випр. К. : Книга Плюс, 2013. 582 с.
- 17.Наказ МОН №552 від 11.08.2014 р. Про затвердження Державних санітарних норм та правил «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я».
- 18.Методи дослідження в гематології : навчальний посібник. / І. О. Дудченко, Г. А. Фадєєва, В. В. Качковська, О. В. Орловський ; за заг. ред. проф. Л. Н. Приступи. Суми : Сумський державний університет, 2019. 55 с.
- 19.Основи імунології : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава, А. В. Дращнікова. К. : НАУ, 2015. 60 с.
- 20.Соколенко В. Л. Прикладна імунологія. Навчально-методичний посібник / В. Л. Соколенко, С. В. Соколенко. Черкаси: Вид. від. ЧНУ ім. Богдана Хмельницького, 2011. 60 с.
- 21.Судово-медична характеристика ушкоджень селезінки та визначення давності їх утворення / Мішалов В. Д., Петрошак О. Ю., Бабкіна О. П. / установи-розробники: Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, Національний медичний університет ім. О. О.

- Богомольця, Державна установа «Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України» КЗ «Дніпропетровське обласне бюро судово-медичної експертизи ДОР». Київ, 2015. 35 с.
- 22.Третяк Н. М. Гематологія. Навчальний посібник. К.: Зовнішня торгівля, 2005. 240 с.
- 23.Устинов О. В. Невідкладна допомога при медикаментозній алергії. URL: <https://www.umj.com.ua/article/94169/nevidkladna-dopomoga-pri-medikamentoznij-alergii>
- 24.Фізіологія : навчальний посібник до лабораторних занять і самостійної роботи студентів спеціальності «Медицина» / уклад.: А. Г. Моренко, А. І. Поручинський, Т. В. Качинська, Т. Ф. Поручинська. Ч. II. переробл. і доповн. Луцьк, 2023. 112 с.
- 25.Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Гаврилюк А. М. та ін. Клінічна імунологія та алергологія: навч. посіб. К. : ВСВ «Медицина», 2017. 224 с.
- 26.<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7804/organi-krovotvorenniya-gemopoetichni-organi>
- 27.<http://transfusiology.com.ua/wp-content/uploads/2019/01/sop1.pdf>
- 28.<http://transfusiology.com.ua/poryadok-provedennya-imunogematologichnih-doslidzhen-krovi-vagitnih/>
- 29.<https://www.invitro.ua/ua/analizes/for-doctors/1134/8200/>
- 30.<https://donor.ua/pages/2124>
- 31.https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=vxyDDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=-RC1RqAzFs&sig=Ce8QA9TkUhlBhMdFsDzstBuuadg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- 32.<http://www.bioadvisers.com/elikine-elisa-kit/>
- 33.<https://vitrotest.ua/iimunofermentnij-analiiz-v-diagnosticii.html>
- 34.<https://empendium.com/ua/chapter/B27.II.18.10.>

35. https://nmapo.edu.ua/images/Novosti/04_11_16-11.pdf
36. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1159-11/print>
37. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1237-14/print>
38. <https://bit.ly/2uOrGq>
39. <https://bit.ly/2FJHUxE>
40. [https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Pathology/Color Atlas of Hematology Practical Microsc.pdf](https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Pathology/Color_Atlas_of_Hematology_Practical_Microsc.pdf)
41. <https://www.slideshare.net/slideshow/hematocrit-determination-234196136/234196136>
42. <https://unitslab.com/uk/node/10>
43. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3213/gematokrit>
44. <https://medical-enc.com.ua/dlya-opredeleniya-gemoglobina.htm>
45. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3221/gemoliz>
46. <https://zokb.org.ua/kliniko-d-agnostichna-laborator-ya/gematologichni-doslidzhennya/?lang=uk>
47. <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%95%D1%80%D0%B8%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%86%D0%B8%D1%82%D0%B8>
48. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3221/gemoliz>
49. <https://zokb.org.ua/kliniko-d-agnostichna-laborator-ya/gematologichni-doslidzhennya/?lang=uk>
50. [https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Pathology/Color Atlas of Hematology Practical Microsc.pdf](https://rlmc.edu.pk/themes/images/gallery/library/books/Pathology/Color_Atlas_of_Hematology_Practical_Microsc.pdf)
51. <https://www.apollohospitals.com/uk/diagnostics-investigations/rdw-blood-test>
52. https://www.researchgate.net/publication/315108530_Molecular_genotyping_of_blood_group_antigens