

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Тема 7

ЛЕКЦИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ



СОДЕРЖАНИЕ

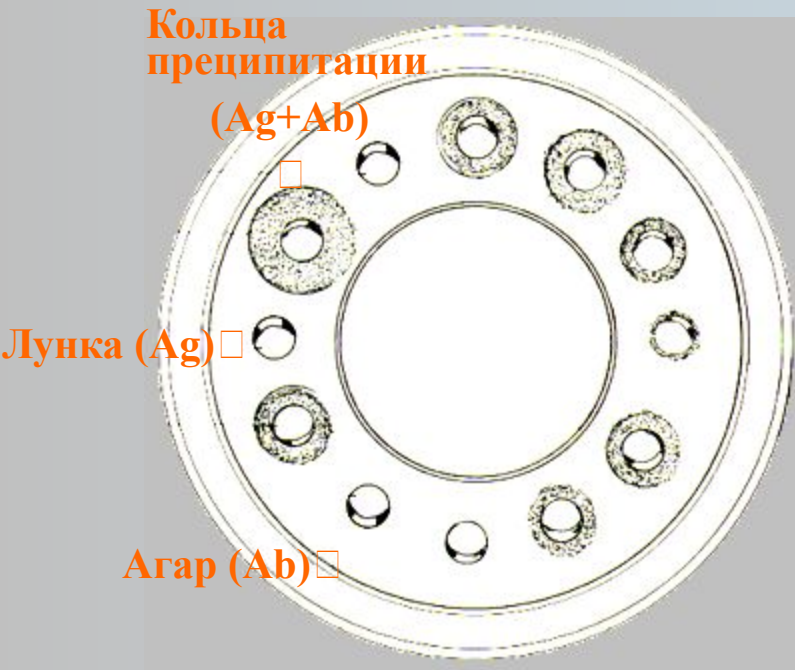
- ① Методы, основанные на взаимодействии антиген-антитело
- ② Энзим, радиоактивный элемент и флюорохром как дополнительные метки
- ③ Полимеразная цепная реакция
- ④ Функциональные методы
- ⑤ Скрининговые тесты



Большинство иммунологических методов основано на взаимодействии **антиген-антитело**. Все они позволяют обнаруживать неизвестный компонент этого взаимодействия (например, любой сывороточный протеин, иммуноглобулин, цитокин, свободный рецептор и др.) Эти методы могут быть разделены на три группы: *реакции преципитации, агглютинации и лизиса*. Реакции преципитации различаются по использованию *поликлональных* или *моноклональных* антител. Современные подходы также включают применение *дополнительных меток* (энзим, радиоактивный элемент или флюорохром) для повышения чувствительности исследований или проведения иммуногистохимического окрашивания тканей. **Функциональные методы**, такие как исследования фагоцитоза и миграции, реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и цитотоксические тесты, позволяют оценивать различные свойства клеток и иммунных процессов, хотя два последних метода также дают возможность определить наличие специфического компонента. Наконец, **молекулярно-биологические технологии**, включая *полимеразную цепную реакцию (ПЦР)*, являются наиболее точными для идентификации кодирующего белок гена.



РАДИАЛЬНАЯ ИММУНОДИФФУЗИЯ

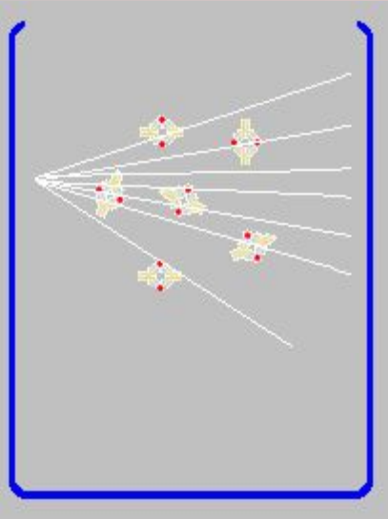


Метод позволяет проводить ручную определение иммуноглобулинов и других белков

Сначала специфическая поликлональная антисыворотка смешивается с агаром и разливается в чашки Петри. Затем исследуемый образец помещается в одни лунки, а стандартный белок в известной концентрации в другие. В течение 24-48 ч эти белки как антигены диффундируют навстречу специфическим антителам, образуя кольца преципитации. Размер колец будет соответствовать количеству исследуемого белка.



НЕФЕЛОМЕТРИЯ

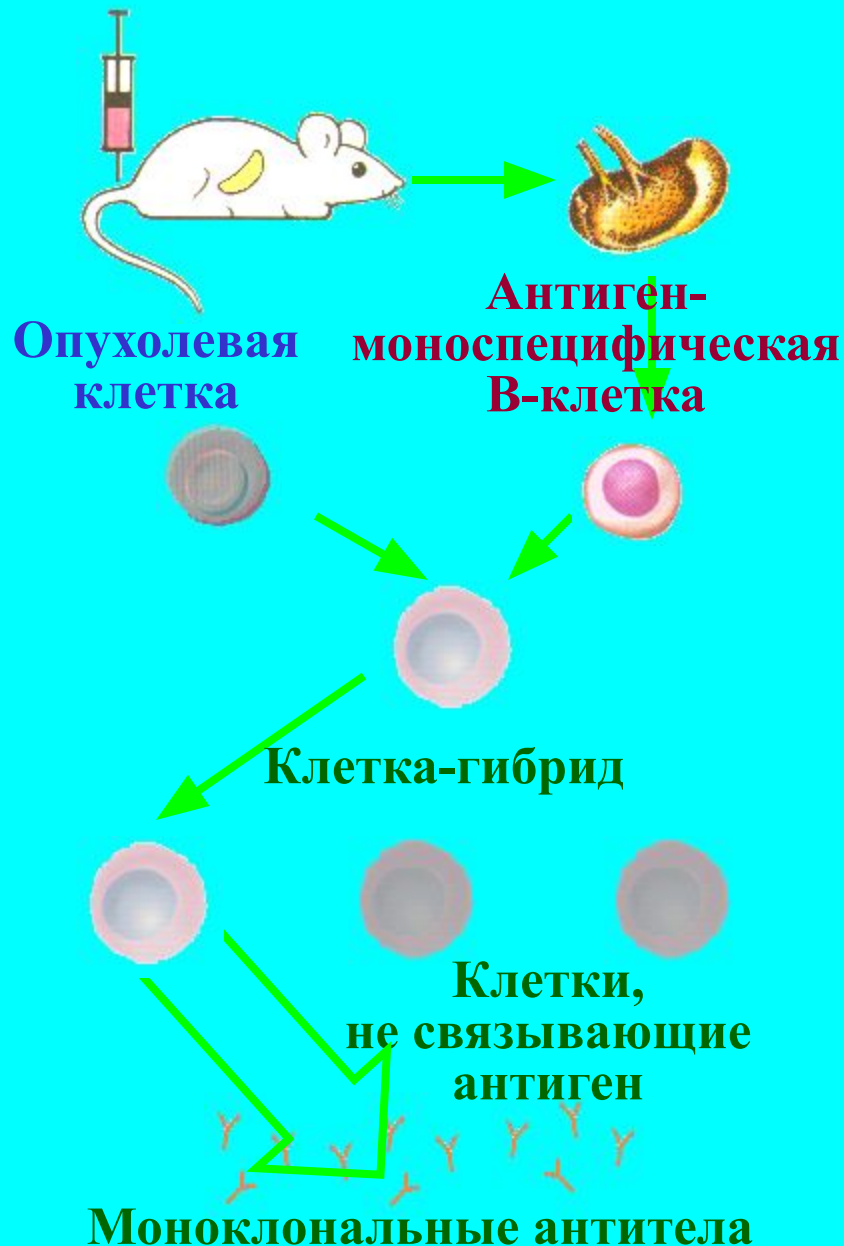


1. Специфические поликлональные антитела
2. Исследуемый образец (как антиген)
3. Источник лазерного света

Нефелометрические методы используются для автоматизированного и более чувствительного определения иммуноглобулинов и других белков. Исследуемый образец смешивается со специфическими поликлональными антителами в кювете, где они связываются в иммунные комплексы. По плотности среды при пропускании через кювету лучей лазера можно судить о концентрации исследуемого антигена.



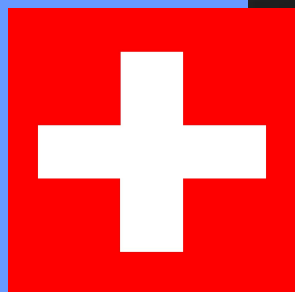
МОНОКЛОНАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ



Принцип состоит в соединении внутри одной (**гибридной**) клетки способностей к бесконечной пролиферации и продукции **МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**. Сначала животное-гнотобионт иммунизируется антигенной детерминантой. Через 2-3 недели у него удаляется селезёнка, которая гомогенизируется для получения В-клеток, синтезирующих моноклональные антитела. Эти В-клетки соединяются с клетками “бессмертной” опухолевой линии и инкубируются для получения гибридомных клеток. Активные гибридомные клетки способны к длительному культивированию; они продуцируют моноклональные антитела, которые могут быть получены в большом количестве.



НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ (1984)



G.J.F. KOHLER



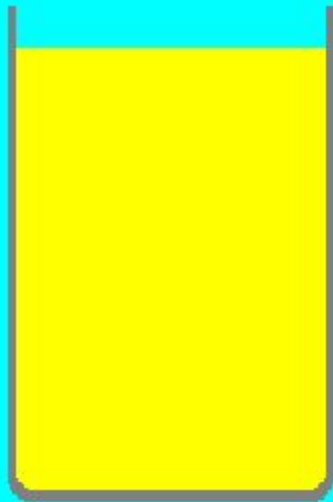
C. MILSTEIN



Разработка принципа получения
моноклональных антител



ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)



Этот метод позволяет проводить высокочувствительное определение белков

Моноклональное антитело ($Ab1$), специфичное к какому-либо антигену (Ag), предварительно абсорбируется на стенках микролунок. Если антиген присутствует в опытном образце, он будет связан и иммобилизован. В противном случае антиген будет удалён при отмывании. Затем добавляется второе моноклональное антитело, направленное против данного антигена и конъюгированное с энзимом типа пероксидазы хрена ($Ab2+enzyme$). В результате образуется “сэндвичподобный” комплекс $Ab1/Ag/Ab2+enzyme$, который оказывается иммобилизованным на стенке микролунок. Добавление субстрата с хромогеном приводит к образованию окрашенного продукта, количество которого пропорционально количеству $Ab2$ и, следовательно, антигену, что может быть измерено фотометрически.



РАДИОИММУННЫЙ МЕТОД

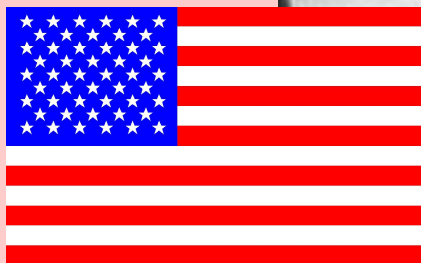


Метод используется для высокочувствительного измерения белков и основан на конкуренции антигена в образце и того же самого антигена, меченного радиоактивной меткой (например, ^{125}I), за антитела, содержащиеся в среде в определённом количестве. Если уровень антигена в образце низкий, преципитат покажет при сцинтилляционной спектрометрии высокий уровень радиоактивности, и наоборот.

**Высокое содержание
(низкая радиоактивность)**



НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ (1977)

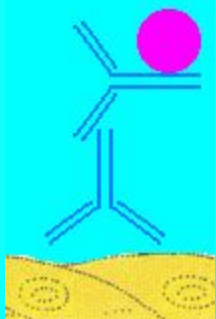


Разработка радиоиммунного анализа

R. YALOW



ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЕ ОКРАШИВАНИЕ



Эта технология позволяет проводить визуальную оценку комплексов антиген-антитело в флюоресцентном микроскопе или потоке лучей лазера. *Метод используется главным образом для иммуногистохимического окрашивания*, а также является основой цитометрии в потоке. При *прямом методе*, менее чувствительном, первичное моноклональное антитело, меченное флюорохромом (например, флюоресцеином, т.е. FITC), реагирует с антигеном в тканях.

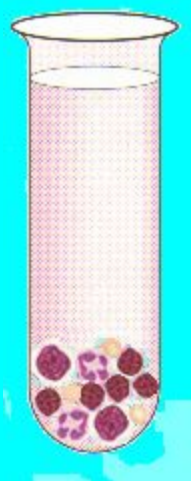
При *двухэтапном непрямом методе*, более чувствительном, меченное вторичное антитело реагирует с немеченным первичным антителом, связанным с антигеном в тканях. Имеется множество многоступенчатых модификаций этого метода.



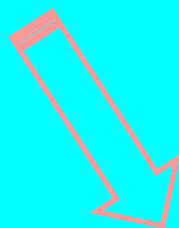
ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ В ПОТОКЕ

Эта технология применяется главным образом для быстрого определения клеточных субпопуляций в периферической крови, тканях и клеточных суспензиях. Она основана на связывании моноклональных антител, меченных флюорохромами, к поверхностным клеточным маркёрам, а также на учёте некоторых физических свойств клеток (размер, наличие гранул в цитоплазме, ядерно-цитоплазматическое соотношение). Это позволяет изучать клетки и молекулы в потоке капель при использовании источника лазерного света, генерирующего рассеянные лучи и флюоресцирующие пучки. Сначала предварительно меченные клетки идентифицируются в прямом рассеянном свете (что определяет размер клеток), затем под углом 90° (что выявляет наличие гранул), потом в флюоресцирующем свете (что даёт возможность верифицировать одновременно, по крайней мере, четыре моноклональных маркёра). Более того, система позволяет сепарировать разные клетки в зависимости от их физических или специфических свойств.





Клетки крови, преинкубированные с флюорохромами, которые конъюгированы с моноклональными антителами к некоторым маркёрам



Поток клеток



1. Гранулоцит
2. Крупная клетка
3. Немеченная клетка

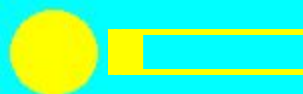


1. Агранулоцит
2. Крупная клетка
3. Немеченная клетка



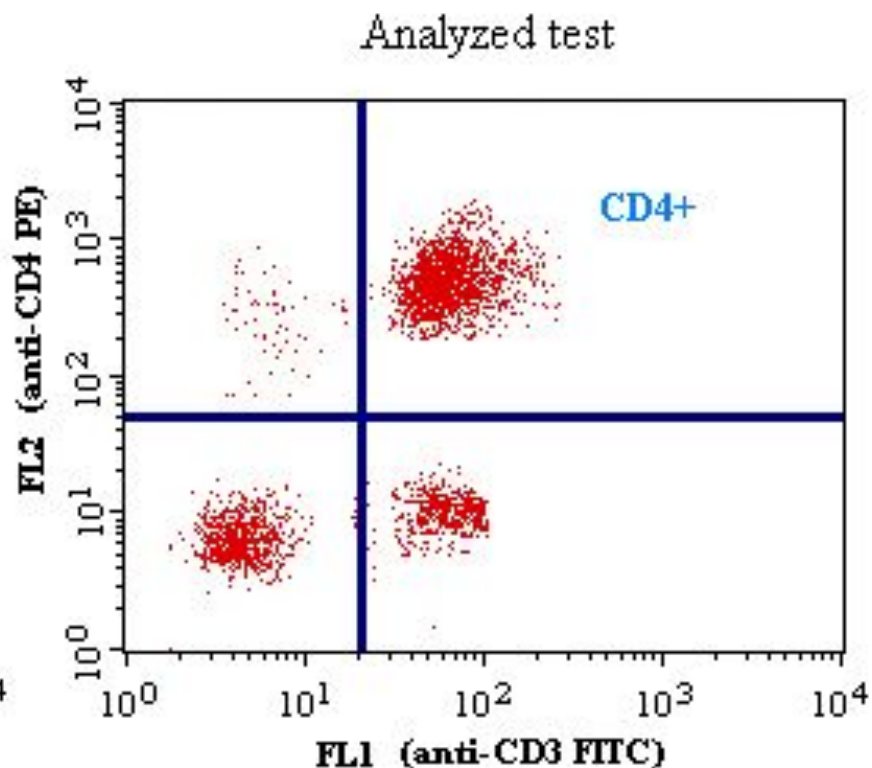
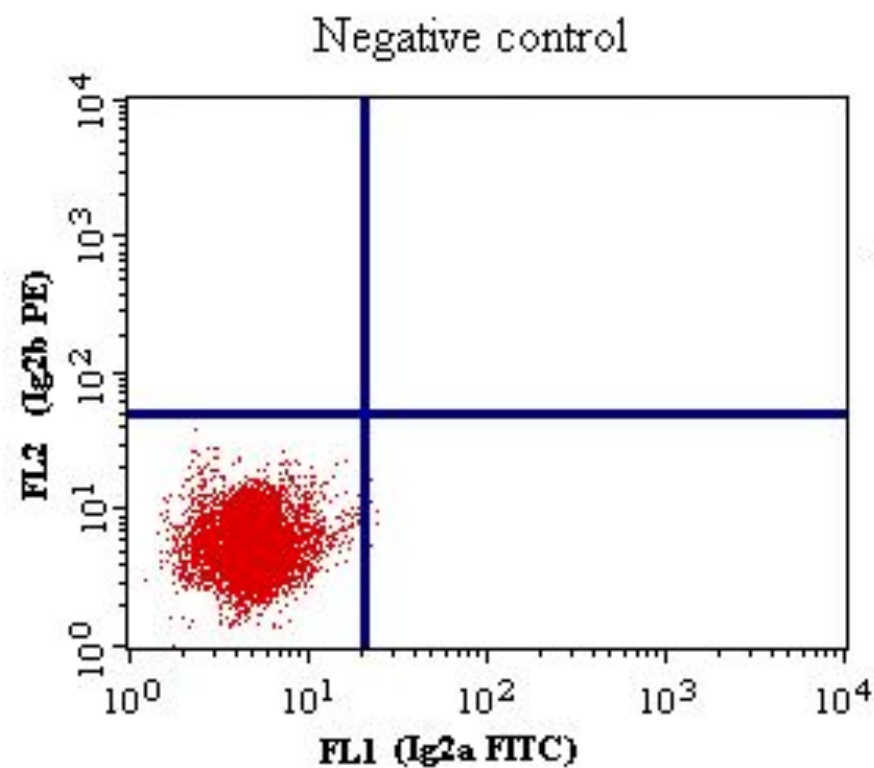
1. Агранулоцит
2. Маленькая клетка
3. CD4+ клетка

Источник лазерного света:



1. Рассеивание при 90°
2. Прямое рассеивание
3. Флюоресценция

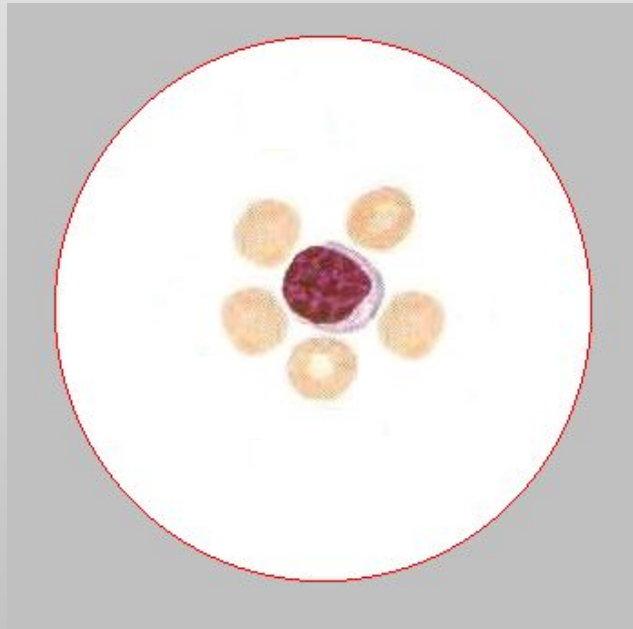




РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИЕ ЛИМФОЦИТЫ

В прошлом определение принадлежности лимфоцитов к разным популяциям проводилось на основе их розеткообразования. **Т-клетки** характеризовались как Е-РОК, а **В-клетки** как ЕАС-РОК.

Е-рецептор (к эритроцитам барана), как выяснилось позднее, соответствует *CD2*, а *комплекс ЕАС* (эритроцит барана+антитело к нему+ комплемент) - *CR1 (CD35)* и возможно, другим рецепторам комплемента.



МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

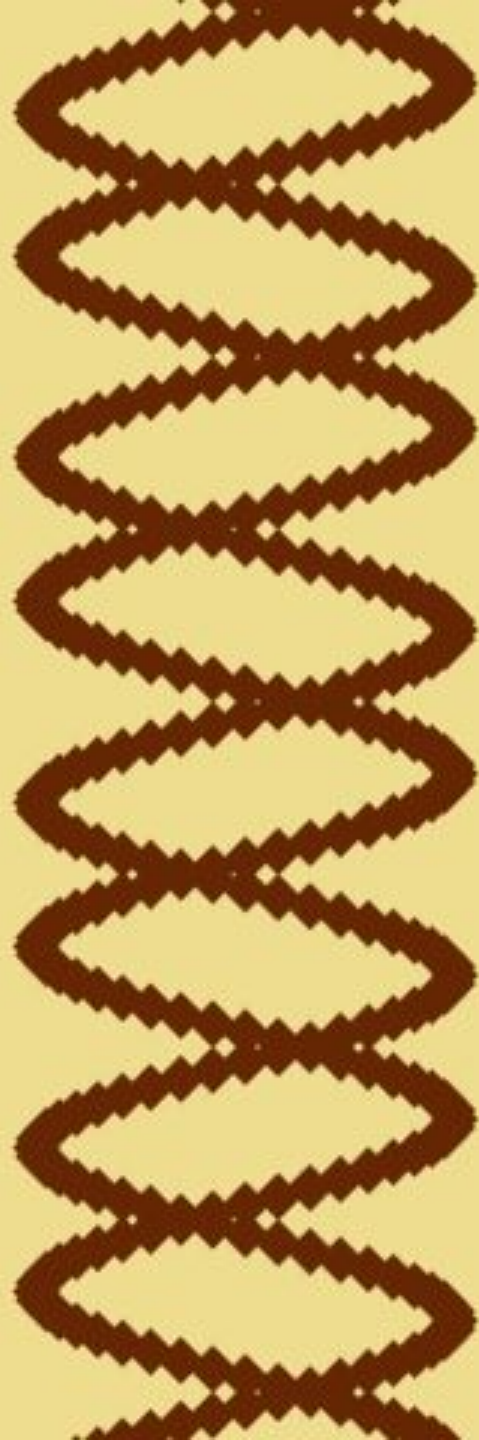
1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР):

- прямая
- обратная

2. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

3. Генетические чипы





ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

Принцип *прямой ПЦР* заключается в многократном копировании исследуемой ДНК. В качестве диагностических наборов используются олигонуклеотидные затравки - *праймеры*, последовательность которых имеет известную специфичность и комплементарна фрагментам этой ДНК. Реакция протекает в программируемом термостате (амплификаторе), где термостабильная ДНК-полимераза катализирует процесс синтеза (амплификации) большого числа точных копий исследуемой ДНК. В последующем эти копии (ампликоны) для их идентификации могут быть помечены комплексом биотин-авидин-энзим, что при добавлении субстрата с хромогеном, позволяет получить цветную реакцию.

При *обратной ПЦР* первоначально выделяется мРНК, на основе которой с помощью обратной транскриптазы производится синтез ДНК. Этот метод удобен для исследования различных молекул иммунной системы, которые синтезируются в организме.



ПДРФ

С помощью рестриктаз производится вырезание в исследуемой ДНК разных по длине фрагментов, которые разделяется при электрофорезе. Затем производится сравнение их с известным образцом путём использования метки. Фрагменты также могут быть амплифицированы с помощью ПЦР.

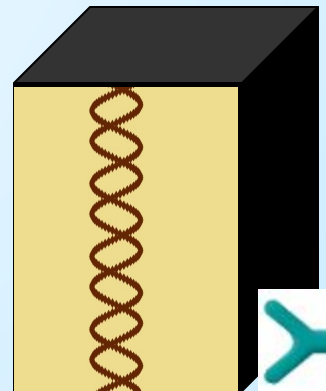
Генетические чипы

Производится синтез *in vitro* большого количества олигонуклеотидов для одного чипа (генетический чип - аналогия с компьютерным литографическим чипом). Каждый олигонуклеотид предназначен для определения исследуемой мРНК из огромного генетического материала путём гибридизации, последующей метки и измерения в лазерном свете.

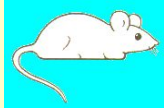


ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

1. Диагностика молекулярных аномалий при первичных иммунодефицитах
2. Типирование HLA
3. Точное определение молекулы иммунной системы, которая может быть синтезирована после транскрипции гена
4. Установление спорного отцовства, также как и верификация любой личности
5. Диагностика инфекций

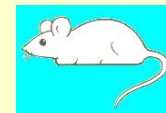


ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ



ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ

Эти мыши имеют ген, ответственный за синтез определённой иммунокомпетентной молекулы, который внесен (трансфицирован) в их геном.



МЫШИ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ НОКАУТОМ

У таких мышей отсутствует какой-либо ген, ответственный за синтез иммунокомпетентной молекулы.

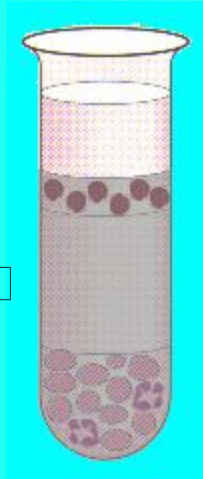


РЕАКЦИЯ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ

Растворитель ☐
Лимфоциты ☐
+ моноциты ☐

Среда ☐

Эритроциты ☐
+ гранулоциты ☐

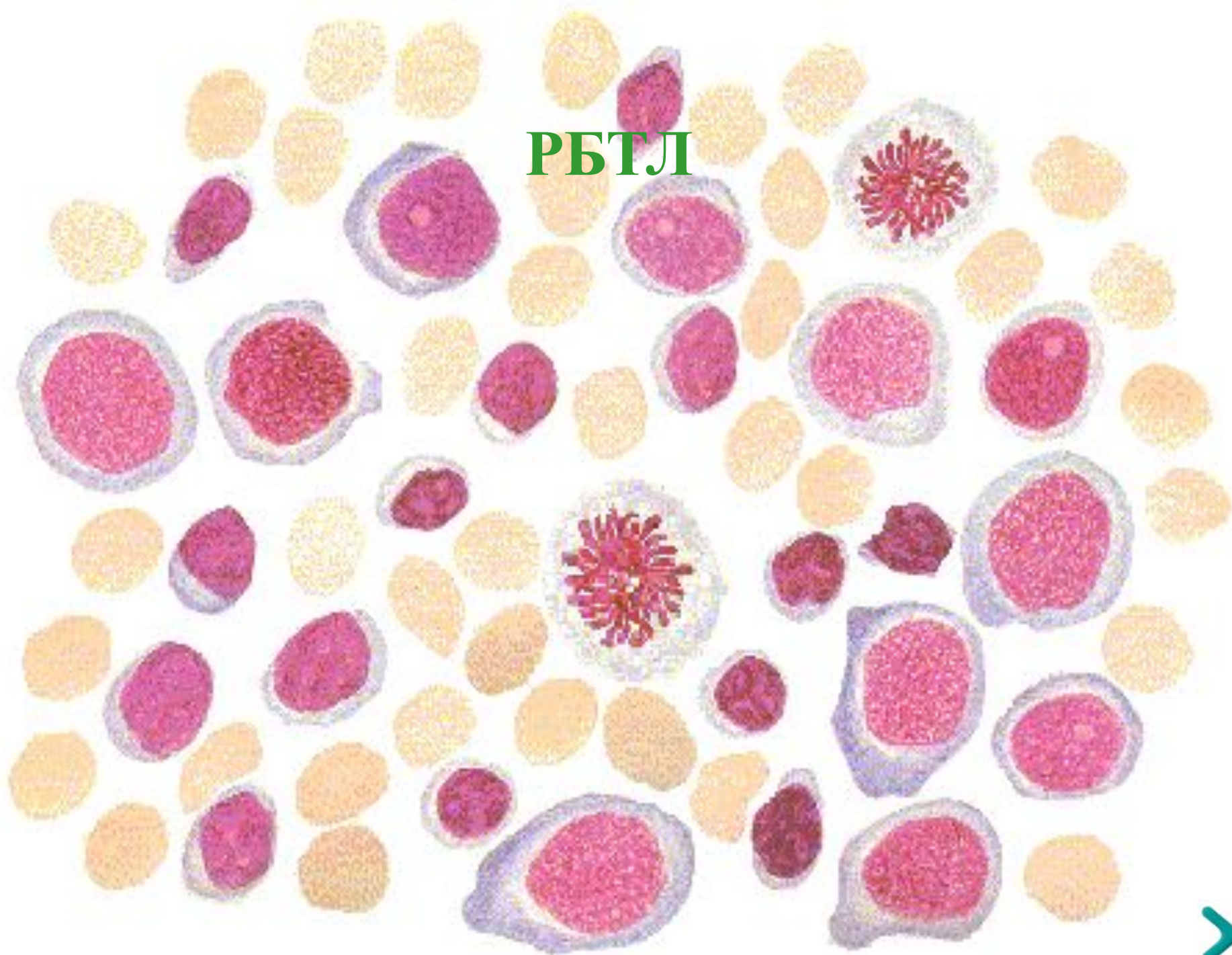


Этот метод используется для оценки пролиферативных свойств лимфоцитов

Этот старый метод основан на способности сенсibilизированных лимфоцитов превращаться в лимфобласты под влиянием антигена или неспецифических митогенов *in vitro*. Имеется много митогенов для лимфоцитов, например: *бактериальный липополисахарид* и *митоген лаконоса (PWM)* для В-клеток, *фитогемагглютинин (PHA)* и *конканавалин А (ConA)* для Т-клеток. Гепаринизированная кровь помещается в специальную среду для разделения клеток (например, ficoll-paque) с градиентом плотности 1,077 и центрифугируется. Лимфоциты помещаются в специальную среду с исследуемым стимулятором и инкубируются в течение 4-5 дней при 37°C. Затем % лимфобластов может быть учтён при использовании жидкого сцинтилляционного спектрометра по метке ³H-тимидин или в световом микроскопе.



РБТЛ



ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ



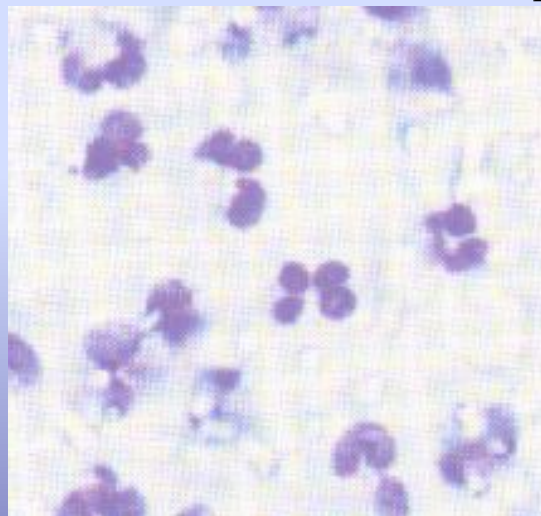
Метод обычно используется для оценки эффекторной активности

Метод основан на инкубации исследуемых клеток (цитотоксические Т-лимфоциты или НК-клетки) с клетками-мишенями, меченными ^{51}Cr , с последующим измерением радиоактивности в культуральной среде. В качестве клеток-мишеней для цитотоксических Т-лимфоцитов должны использоваться собственные HLA-идентичные клетки пациента (например, клетки, инфицированные вирусом). Для оценки активности НК-клеток применяется линия, которая высоко чувствительна к их действию (например, линия клеток эритролейкемии K562).



ХЕМОТАКСИС ФАГОЦИТОВ ВНУТРЬ МЕЛКОПОРИСТОГО ФИЛЬТРА

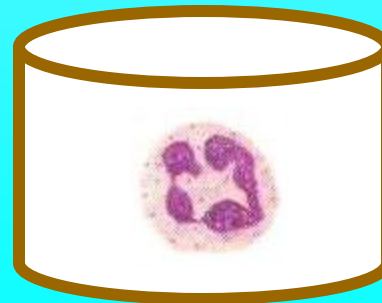
Хемотаксис нейтрофилов и моноцитов *in vitro* может быть оценен в камерах Boyden с использованием мелкопористых фильтров с диаметром пор 0,75-5 μm . Клетки мигрируют через фильтр с определённой скоростью под влиянием хемокинов или хемотаксических пептидов, которые присутствуют в нижнем отделе камеры. Результаты могут учитываться по скорости этой миграции или по измерению ведущего фронта (т.е. расстояния между стартовой линией и двумя клетками, находящимися впереди всех, что определяется с помощью микровинта светового микроскопа).



ХЕМОТАКСИС ФАГОЦИТОВ

«КОЖНОЕ ОКНО»

Этот метод *in vivo* предполагает использование так называемого **”кожного окна”**, когда участок кожи скарифицируется, покрывается стеклом или специальной камерой. В первом случае в течение первых 6 ч к стеклу прилипают нейтрофилы, а в последующие 18 ч - моноциты. Во втором случае в камеру мигрируют только нейтрофилы, причём в течение 6 ч - клетки дермального пула, а в течение 18 ч - циркулирующие нейтрофилы.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АДГЕЗИВНЫХ МОЛЕКУЛ НЕЙТРОФИЛОВ

Адгезивные свойства нейтрофилов опосредуются такими адгезивными молекулами как **CD18** (часть LFA-1) и **сиалил Lewis X (CD15s)**, которые могут быть оценены цитофлюориметрически. Их определение является важным для диагностики дефектов лейкоцитарной адгезии.



ТЕСТ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НИТРОСИНЕГО ТЕТРАЗОЛИЯ

”Респираторный взрыв” фагоцитов может быть оценен люминометрически при люцигенин- (для супероксид-аниона) или люминол-зависимой (для синглетного кислорода) хемилюминесценции.

Тест восстановления нитросинего тетразолия (NBT-тест) является простым скрининговым тестом для определения кислородзависимой цитотоксичности нейтрофилов. При ”респираторном взрыве” жёлтый краситель НСТ восстанавливается до нерастворимого формазана, выпадающего в цитоплазме в виде тёмно-синих гранул (нормальный показатель не превышает 10 %). NBT-тест может проводиться также в стимулированном варианте с применением *C. albicans* или других тест-микробов.

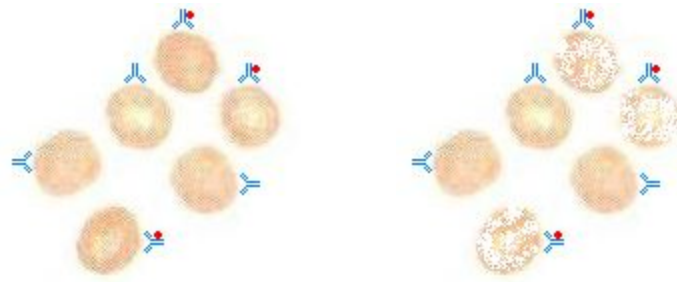


Этот тест необходим для диагностики хронической грануломатозной болезни (ХГБ) или ХГБ-подобных синдромов.



ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

Содержание отдельных компонентов комплемента и регуляторных белков может быть оценено методами радиальной иммунодиффузии или ИФА. О функционировании комплементарного каскада судят по *общей гемолитической активности комплемента* (CH_{50}). Антисыворотка против бараньих эритроцитов в субагглютинирующем разведении инкубируется с этими эритроцитами и сывороткой крови пациента как материалом для оценки комплемента. Антителозависимый гемолиз наступает только в присутствии комплемента, при этом единица CH_{50} соответствует такой гемолитической активности, при которой наблюдается гемолиз 50 % бараньих эритроцитов.



ПОЛЕЗНЫЕ СКРИНИНГОВЫЕ МЕТОДЫ

Количественные тесты

В-клетки	CD72+, IgM, IgG, IgA, IgE
Т-клетки	CD3+, CD4+, CD8+
NK-клетки	CD16+, CD56+, CD57+
Фагоциты	Число нейтрофилов, CD18+, CD15s (сиалил Lewis X)
Комплемент	C2, C3, C4, C5, CI-INH



ПОЛЕЗНЫЕ СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ

Функциональные тесты (*in vitro*)

В-клетки

CD23+, РБТЛ с ЛПС и антигенами

Т-клетки

CD25+, РБТЛ с ФГА и антигенами,

Цитотоксические тесты с клетками-мишенями

NK-клетки

Цитотоксические тесты с K562

Фагоциты

Камера Boyden, NBT-тест

Комплемент

CH₅₀



ПОЛЕЗНЫЕ СКРИНИНГОВЫЕ ТЕСТЫ

Функциональные тесты (*in vivo*)

В-клетки

Вакцинация антигенами и определение
специфических антител

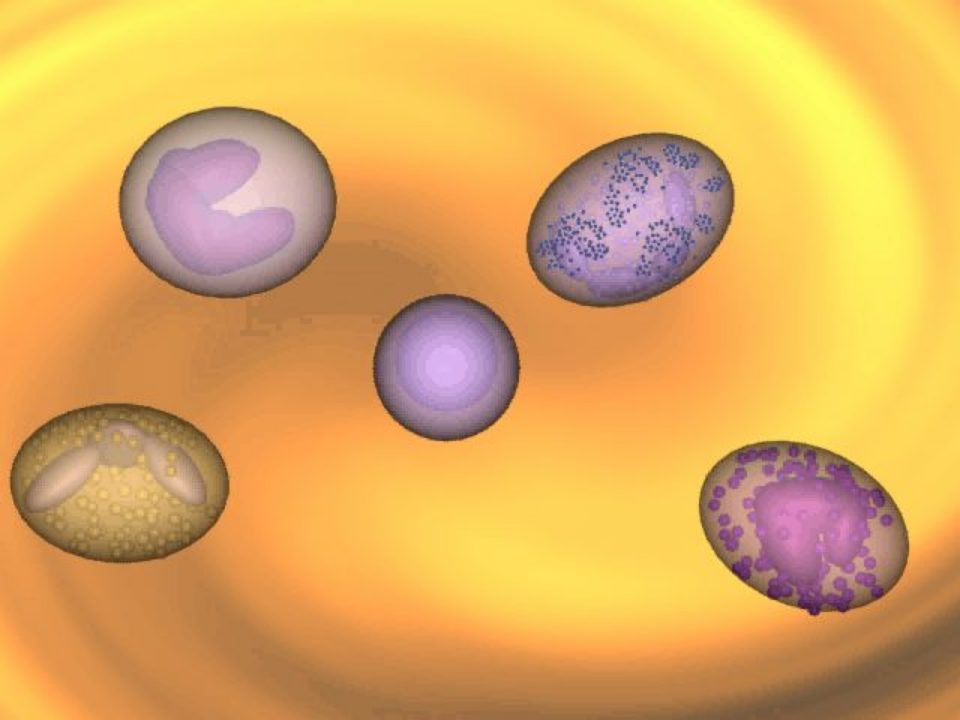
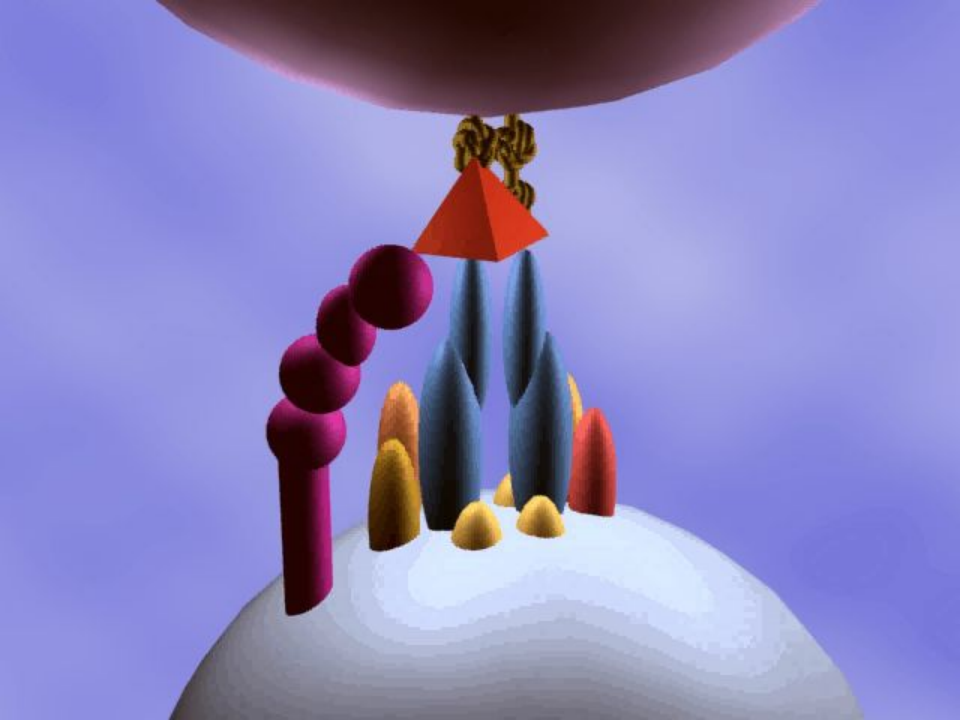
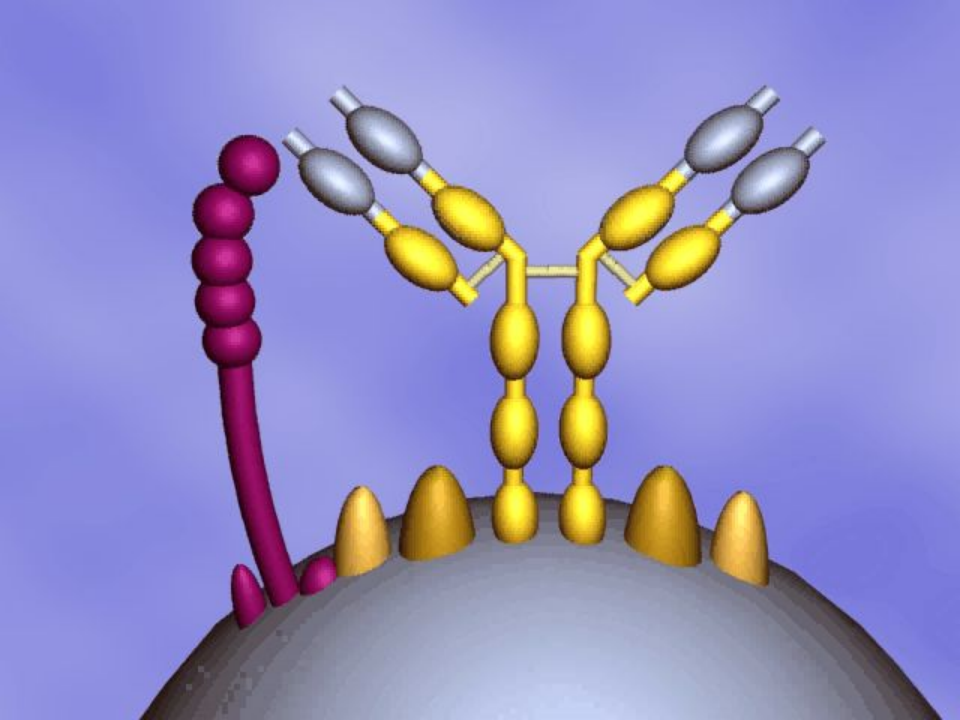
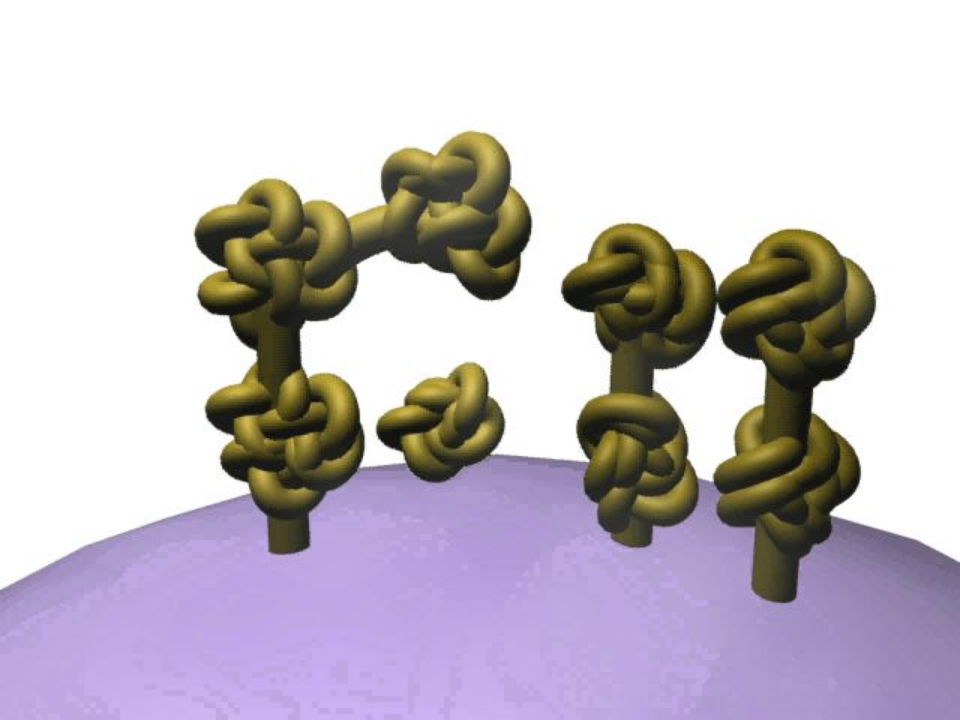
Т-клетки

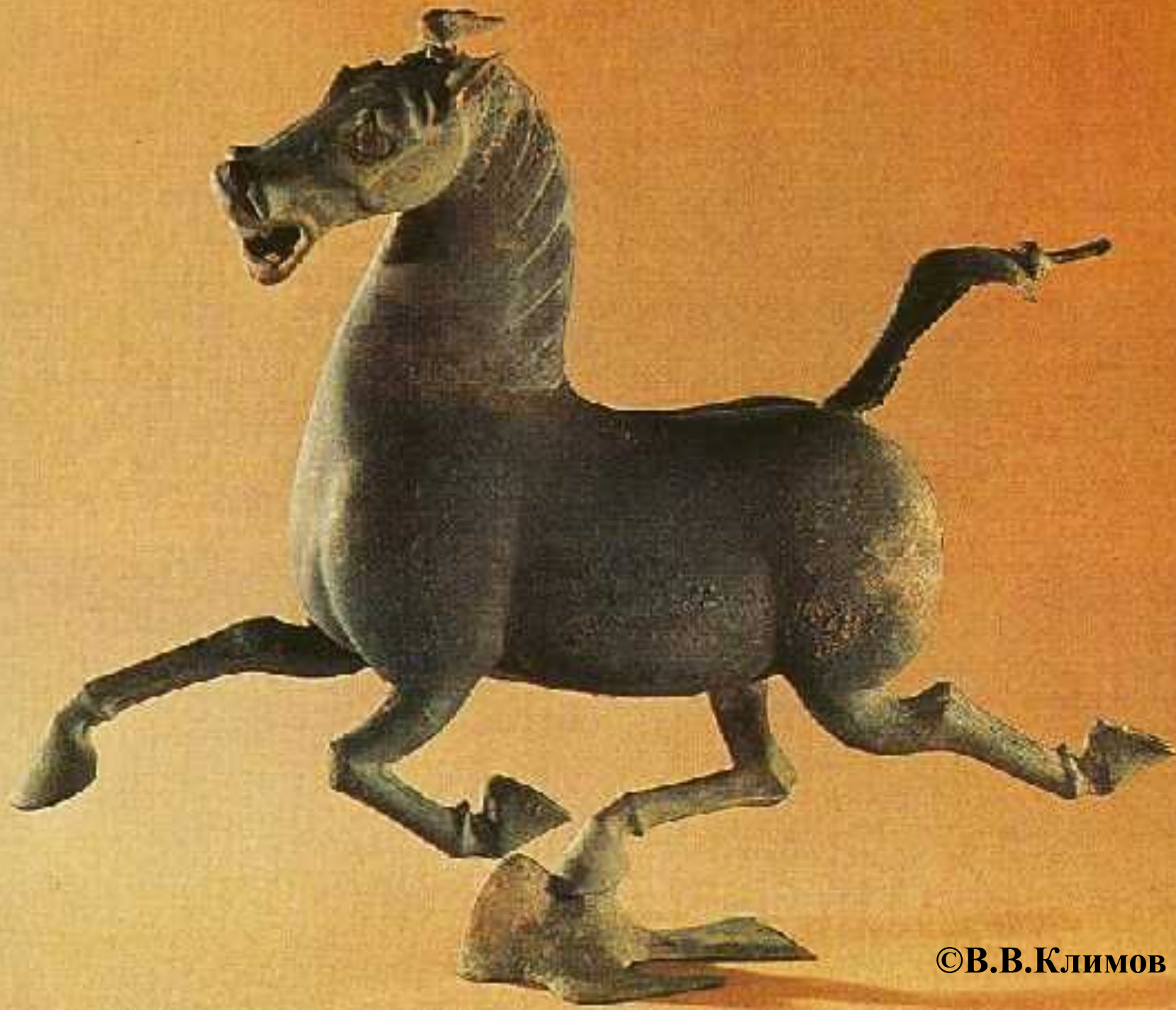
Туберкулиновые пробы (реакция Mantoux)

Фагоциты

«Кожное окно»







©В.В.Климов