

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**В.В. Климов, В.С. Свиридова,
А.В. Климов, Н.С. Кошкарлова, М.Б. Аржаник**

РУКОВОДСТВО ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ АСПИРАНТОВ

Томск
Издательство СибГМУ
2021

УДК 612.017(075.8)
ББК 52.7я73
И 537

Авторы:
**В.В. Климов, В.С. Свиридова,
А.В. Климов, Н.С. Кошкарлова, М.Б. Аржаник**

И 537 Руководство по клинической иммунологии и аллергологии: учебное пособие для аспирантов / В.В. Климов [и др.].
– Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. – 92 с.

В издании освещены наиболее современные и актуальные подходы к исследованию иммунопатологических состояний и аллергических заболеваний, применяемые в научных исследованиях. Описаны ключевые методы сбора и статистической обработки материала, получаемого в ходе научных исследований.

Анимации представлены на сайте ssmu.immunology.sibhost.ru

Учебное пособие предназначено для аспирантов, проходящих подготовку по дисциплине «Клиническая иммунология и аллергология» (входит в вариативную часть программы аспирантуры по направлению 30.06.01 – Фундаментальная медицина) и соответствует ФГОС и программе учебной дисциплины.

Пособие может использоваться для проведения семинарских занятий, а также самостоятельной работы обучающихся.

**УДК 612.017(075.8)
ББК 52.7я73**

Рецензент:

Денисов А.А. – доктор медицинских наук, профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 30 сентября 2020 г.).

© В.В. Климов, В.С. Свиридова, А.В. Климов, Н.С. Кошкарлова, М.Б. Аржаник, 2021
© Издательство СибГМУ, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. СОДЕРЖАНИЕ РАЗДЕЛОВ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ	5
1.1. Функциональная организация иммунной системы	5
1.2. Естественный иммунитет.....	6
1.3. Адаптивные иммунные ответы	7
1.4. Введение в иммунопатологию.....	8
2. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ.....	10
2.1. Гибридомные технологии. Моноклональные антитела (МкАТ).....	10
2.2. Методы, основанные на определении антител к искомым молекулам	17
2.3. Проточная цитометрия	20
2.4. Область применения анализов, основанных на реакциях антиген-антитело	24
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ К РАЗДЕЛАМ 2.1.–2.4	29
2.5. Реакция бластной трансформации (РБТЛ).....	32
2.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	34
2.7. Оценка системы комплемента	38
2.8. Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов.....	40
2.9. Методы оценки фагоцитоза	43
2.10. Оценка системы цитокинов	48
2.11. Интерфероновый статус	52
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ К РАЗДЕЛАМ 2.5–2.11.	54
3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ В АЛЛЕРГОЛОГИИ	58
3.1. Определение общего IgE.....	58
3.2. Определение специфических IgE к экстрактам аллергена.....	60
3.3. Определение специфических IgE к алергокомпонентам.....	60

3.4. Тест активации базофилов	66
3.5. Назальный аллергический провокационный тест	68
3.6. Кожные алергопробы.....	69
ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ К РАЗДЕЛУ 3	71
СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ К РАЗДЕЛУ 3.....	73
4. КРАТКИЙ ОБЗОР СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.....	76
4.1. Измерение. Измерительные шкалы	76
4.2. Генеральная совокупность и выборка	76
4.3. Установление закона распределения переменных.....	77
4.4. Описательная статистика	78
4.5. Проверка статистических гипотез.	
Выбор статистического критерия	79
4.6. Параметрические критерии.....	80
4.7. Дисперсионный анализ.....	81
4.8. Непараметрические критерии.....	81
4.9. Анализ качественных признаков.....	82
4.10. Корреляционный и регрессионный анализ	82
4.11. Многомерные статистические методы	83
4.12. Расчёт относительного риска и отношения шансов.....	84
4.13. ROC-анализ.....	84
4.14. Нейросетевой анализ	85
ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ.....	86
ОТВЕТЫ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ	87
ИЛЛЮСТРАЦИИ	89
РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	91

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Клиническая иммунология, аллергология» – наука, изучающая закономерности функционирования иммунной системы, возникновения, развития и исхода иммунопатологических процессов; особенности и характер динамического изменения функций иммунной системы при различных патологических состояниях организма.

Целью изучения дисциплины является:

- ✓ формирование научных знаний об общих закономерностях и конкретных механизмах возникновения, развития и исходов иммунопатологических процессов;
- ✓ исследования и разработки, осуществляемые в рамках данной специальности, которые обеспечивают прогресс в понимании природы иммунной защиты и способствуют совершенствованию диагностики, профилактики и лечения заболеваний иммунной системы, затрагивающих значительную часть человечества и имеющих тенденцию к дальнейшему распространению.

В задачи изучения дисциплины входит:

- фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, функционирования иммунной системы и механизмов иммунной защиты;
- изучение патогенеза иммунозависимых заболеваний (иммунодефицитных состояний, аллергической и аутоиммунной патологии);
- приобретение умений и навыков планирования и выполнения клинико-иммунологических исследований;
- разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов.

1. СОДЕРЖАНИЕ РАЗДЕЛОВ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ И АЛЛЕРГОЛОГИИ

1.1. Функциональная организация иммунной системы

Органы, клетки и молекулы иммунной системы

Феномен иммунитета. Основные понятия. Краткий очерк истории иммунологии. Иммунологи – Нобелевские лауреаты. Жизненный путь Н.В. Васильева. Антигены, систематизация, структура. Условия усиления иммуногенности антигенов. Вакцины. Паттерны. Механизмы естественного и адаптивного иммунитета. Органы иммунной системы. Лимфоциты – ключевые клетки иммунной системы. Т-, В-лимфоциты и НК-клетки. CD-номенклатура. Циркуляция лимфоцитов в организме. Коммитмент Т-клеток. Субпопуляции Т-клеток. Клонально-селекционная теория Бернета. Коммитмент В-клеток. Дендритные клетки. Моноклональная технология.

Структура и функции иммунологической лаборатории. Принцип работы проточного цитофлюориметра.

Структура молекул иммуноглобулинов, критерии многообразия. Физиологическая роль различных классов иммуноглобулинов. Структура TCR и BCR. Трансфер Факторы. Молекулы главного комплекса гистосовместимости (HLA) и шапероны. Молекулы, распознающие паттерны (TLR и другие).

Суперсемейство иммуноглобулинподобных молекул. Интегрины. Суперсемейство ФНО.

Селектины и муцины. Линк-семейство и другие адгезивные молекулы.

Цитокины и их роль в иммунных процессах. Ключевые цитокины. Интерлейкины. Колониестимулирующие факторы. Факторы некроза опухоли. Хемокины.

Методы определения цитокинов в лаборатории. Принцип иммуноферментного метода.

1.2. Естественный иммунитет

Эффекторные механизмы естественного иммунитета

Феномен фагоцитоза. Макрофаги и нейтрофилы. Стадии фагоцитоза, зависимость от различных факторов. Кислородозависимые и кис-

лородонезависимые механизмы цитотоксичности. Методы исследования хемотаксиса, поглощения, микробицидности фагоцитов. Постановка НСТ-теста. Хемилюминесценция.

Нетоз.

Цитотоксичность и цитостаз. НК-клетки и их субпопуляции. Интерфероны, механизм действия. gdT-клетки и их роль в иммунитете. NKT-клетки и их роль в иммунитете. Принцип постановки цитотоксических реакций. Методы оценки апоптоза.

Комплемент, структура и функции.

Пути активации комплемента, роль отдельных фрагментов.

«Острофазная» реакция.

Провоспалительные цитокины.

Естественные антитела.

Антимикробные пептиды.

Функционирование иммунной системы на локальном уровне (реферативное сообщение).

Методы исследования системы комплемента.

Кожно-мукозальная иммунная система

Особенности кожно-мукозальной иммунной системы. Отделы кожно-мукозальной иммунной системы.

Мукозо-ассоциированная иммунная система как часть кожно-мукозальной системы.

Методы оценки кожно-мукозальной иммунной системы. Патологии кожно-мукозальной иммунной системы.

1.3. Адаптивные иммунные ответы

Динамика иммунных ответов

Иммунный ответ и его стадии. Эндоцитоз антигенов, процессинг экзогенных и эндогенных антигенов и их представление. Распознавание антигена нативными Т- и В-клетками. Активация лимфоцитарного клона. Клональная экспансия и дифференцировка лимфоцитов. Клетки памяти. Особенности иммунных ответов на разные антигены.

Реакция нейтрализации. Образование иммунных комплексов и фагоцитоз. Активация комплемента по классическому пути. Значение реакций преципитации и агглютинации для диагностики. Патологические реакции с участием антител (II, III типы гиперчувствительности).

Определение иммунных комплексов методом селективной иммунопреципитации.

Образование цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов. Апоптоз и цитотоксические реакции.

Образование CD4⁺ T-эффекторов. Иммунное воспаление (ГЗТ), его физиологические и патологические аспекты (IV тип гиперчувствительности). Реакция бласттрансформации лимфоцитов.

Регуляция иммунных ответов

Виды и значение регуляции иммунных ответов. Принцип отрицательной обратной связи.

Идиотип-антиидиотипические и эрготип-антиэрготипические взаимодействия. Роль костимуляторных молекул. Цитокиновая регуляция. Неадаптивные иммунорегуляторные популяции. Парадигма T_H1/T_H2 в современной иммунологии. Новые парадигмы иммунорегуляторных субпопуляций лимфоцитов (T_H9, T_H17, T_H22). Роль печени в регуляции иммунных ответов. Нейроэндокринная регуляция.

Генетическая регуляция разнообразия специфичностей эффекторов и силы иммунного ответа.

Экспериментальные животные (мыши с генетическим нокаутом, трансгенные мыши).

1.4. Введение в иммунопатологию

Иммунодефициты

Систематизация иммунодефицитов.

Молекулярные аномалии, лежащие в основе первичных иммунодефицитов. Диагностика первичных иммунодефицитов. Полимеразная цепная реакция. Норттерн-блот. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

Вторичные иммунодефициты и состояния иммунокомпрометации. Болезни на основе вторичных иммунодефицитов. ВИЧ-инфекция и СПИД.

Иммунный статус и его клиническая оценка.

Аллергии

Классификация типов аллергических реакций по Gell-Coombs. Цитотоксические реакции. Болезни на основе типа II. Иммунокомплексные расстройства. Болезни на основе типа III. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Болезни на основе типа IV.

Аллергены. Особенности атопического иммунного ответа на аллергены. Роль IgE, тучных клеток, базофилов и эозинофилов. Ранняя и поздняя фазы атопической гиперчувствительности. Атопические болезни (атопический дерматит, круглогодичный и сезонный аллергический ринит, бронхиальная астма). Атопические синдромы (пищевая, инсектная, лекарственная аллергии, анафилактический шок).

Аллергодиагностика *in vitro* (определение IgE радиоиммунным методом, иммуноферментным, иммунохимическим методами). Аллергодиагностика *in vivo* (кожные аллергопробы).

Иммунологическая толерантность и аутоиммунные расстройства

Органы полной и частичной иммунологической толерантности. Механизмы поддержания иммунологической толерантности к собственным антигенам. Механизмы срыва толерантности.

Аутоиммунные расстройства и их диагностика. Аутоиммунный тиреодит. Ревматоидный артрит. Системная красная волчанка. Псориаз. Буллёзные дерматозы. Рассеянный склероз. Иммунологическое бесплодие. Принцип иммунофлюоресцентного метода.

Иммунология рака

Иммунная система и опухолевый рост. Иммуноредактирование. Опухолевые и опухолеспецифические антигены. Иммунодиагностика в онкологии. Изменения иммунного статуса на различных стадиях опухолевого процесса. Проблема иммунокоррекции в онкологии.

Иммунопролиферативные болезни: лейкозы, лимфогранулематоз, парапротеинемические гемобластозы (миеломная болезнь и др.).

2. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

2.1. Гибридомные технологии. Моноклональные антитела (МкАТ)

Метод основан на гибридизации соматических клеток миеломы (плазмоцитарной опухоли) и нормальных антителообразующих клеток, которые получают из селезенки иммунизированных мышей. Таким образом, получают гибридому, совмещающую способность миеломных клеток к неограниченному росту и способность плазмочитов к продукции антител заданной специфичности.

Впервые этот метод был применен в иммунологических исследованиях в 1976 г. G. Köhler и C. Milstein и произвел переворот в иммунологии и биотехнологии.

На тот момент метод получения так называемых гибридом был хорошо известен. Первоначально для слияния двух клеток применялся вирус Сендай. В дальнейшем стали применять полиэтиленгликоль. Принцип метода заключается в том, что в результате слияния двух разнородных клеток образовывался гибрид, содержащий ядра исходных клеток, при этом сохранялась способность к клеточному делению. В процессе деления таких двуядерных клеток, генетический материал обоих ядер перемешивался и образовывалось общее ядро. Таким образом, получался гибрид из двух соматических клеток, или гибридома.

Для образования гибридомы, продуцирующей МкАТ, берут мутантные клетки миеломы, не секретирующие иммуноглобулины и отобранные на селективных средах на устойчивость к 8-азагуанину и б-тиогуанину. Таким образом, у этих клеток блокирован запасной путь синтеза нуклеотидов из гипоксантина и гуанина. В результате слияния доля нормальных слившихся гибридом, состоящих из миеломной клетки и антителопродуцента, не велика. Для выделения таких клеток из общей массы слившихся гибридом применяют среду НАТ, содержащую аминоптерин, гипоксантин и тимидин. Аминоптерин подавляет основной путь синтеза нуклеотидов. Гипоксантин и тимидин являются субстратами для синтеза нуклеотидов по запасному пути,

который заблокирован у миеломных клеток, но возможен у гибридомы, благодаря свойствам, унаследованным от нормальной антителопродуцирующей клетки. Таким образом, на среде НАТ выживают только гибридомы миеломы и нормальной антителопродуцирующей клетки, которые унаследовали от опухолевой клетки «бессмертие», а от нормальной клетки – способность синтезировать нуклеотиды по запасному пути. Все прочие клетки погибают.

Следующий этап заключается в отборе гибридом, продуцирующих антитела нужной специфичности. Ведь в ходе гуморального иммунного ответа в организме человека образуются антитела разной специфичности к разным эпитопам антигена. Отбор нужной гибридомы, которая будет продуцировать заданные МкАТ, достигается пассажем клеток с постепенным их разведением до 1 клетки на лунку. Для каждого пассажа берут клетки из лунок с наиболее высоким титром антител. В результате отбирают клоны, имеющие преимущества перед другими в специфичности и концентрации продуцируемых МкАТ. Предпочтение отдается клонам, продуцирующим IgG. В дальнейшем отобранные и стабилизированные гибридомы хранятся в жидком азоте. Для наработки МкАТ гибридомы культивируют *in vitro* или *in vivo* в брюшной полости сингенных мышей линии BALB/c или их гибридов с другими линиями.

Таким образом, МкАТ – это антитела к определенному эпитопу конкретного антигена, относящиеся к одному изотипу. Как правило, это IgG.

В настоящее время МкАТ широко используются в иммунодиагностике, иммунотерапии, а также в экспериментальных исследованиях для фенотипирования клеток.

Используют моноклональные антитела и в качестве лекарственных препаратов. Этот подход, так называемая биологическая терапия, находит широкое применение во многих областях клинической медицины. Уже в настоящее время в повседневную клиническую практику внедрено применение значимого количества препаратов моноклональных антител.

В процессе применения МкАТ в качестве лекарственных препаратов первоначально использовались полностью мышинные антитела, например, препарат муромонаб («Ортоклон ОКТ3») компании Janssen, который позволяет купировать реакцию отторжения трансплантата почки. Реализация препарата на фармацевтическом рынке началась в 1986 г. Однако, достаточно быстро стало понятно, что на

чужеродный мышинный белок в организме пациента происходит наработка антител, которые нейтрализуют действие препарата. Кроме того, мышинные антитела, имея достаточно высокую молекулярную массу, медленно распределяются в тканях. Из-за чужеродности антител также плохо срабатывают их эффекторные функции, а именно, способность к активации системы комплемента и реализация АЗКЦ. Такие антитела быстро элиминируются из организма пациента, что снижает их терапевтическую эффективность.

Однако и сейчас в некоторых случаях применение мышинных МКАТ остается оправданным. Так, применяются препараты ибритумомабтиуксетан («Зевалин») и тозитумомаб-йод 131 («Бексар»). Эти МКАТ, меченые радиоизотопами, используются в онкологии для лечения лимфомы.

Итак, учитывая сложности, возникавшие при терапевтическом применении мышинных МКАТ, в дальнейшем такие молекулы стали подвергать «гуманизации» с помощью генно-инженерных методов. То есть, объединять V-гены мышинных антител и С-гены иммуноглобулинов человека.

Поэтому следующим этапом в развитии моноклональных технологий стало внедрение химерных антител. Такие антитела представляют собой комбинацию человеческих (до 75% молекулы) и мышинных антител. «Мышиная» часть молекулы – это непосредственно антиген-распознающие участки активного центра антитела. К таким антителам нейтрализующие антимышинные антитела образуются в гораздо меньшем количестве. Поэтому такие препараты более эффективны. На основе химерных антител был создан ряд лекарственных препаратов, таких, как ритуксимаб («Мабтера», для лечения В-клеточной неходжкинской лимфомы и ревматоидного артрита), инфликсимаб («Ремикейд», для лечения аутоиммунной патологии).

В конце XIX–начале XX века с помощью методов генной инженерии были созданы гуманизированные МКАТ, в которых процент мышинного компонента был сведен к минимальному (не более 5–10%), что позволяло эффективно использовать биологические препараты на основе моноклональных антител в различных областях медицины. Так, в аллергологии успешно применяются омализумаб («Ксолар», антиIgE-антитела), реслизумаб и меполизумаб (соответственно, «Синкейро» и «Нукала», антиIL5-антитела), бенрализумаб («Фазенра», антитела к альфа-субъединице рецептора к человеческому

интерлейкину-5), дупилумаб («Дупиксент», антитела к $IL4R\alpha$ -субъединице). Благодаря тому, что мышинный компонент таких МКАТ представлен CDR-участками, в то время, как Fc-фрагмент аналогичен человеческим антителам, такие иммуноглобулины лучше реализуют эффекторные функции. Кроме того, увеличивается период циркуляции таких антител в организме пациента, а также снижается риск продукции блокирующих антител.

В 2000-х годах усовершенствованные методы генной инженерии позволили получить человеческие МКАТ. В качестве методов для получения сейчас используются трансгенные животные, а также метод «фагового дисплея». Примером препаратов на основе полностью человеческих антител могут являться адалимумаб («Хумира», для лечения ревматоидного артрита), офатумумаб («Арзерра», для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза).

Кроме того, методы генной инженерии позволяют получить препараты модифицированных антител, которые могут быть представлены Fab-, scFv-фрагментов (одноцепочечные мини-антитела), однодоменных (наноантитела), а также бифункциональных гибридных антител (рис. 1). Примером таких МКАТ являются так называемые белки слияния (фьюжн-белки). Представителем этого семейства является препарат этанерцепт, применяющийся в ревматологии. Молекула состоит из внеклеточной части рецептора CTLA4 и Fc-фрагмента IgG1. Молекулы препарата связываются с рецептором CD80/86 на антиген-презентирующей клетке, блокируя, тем самым, ее контакт с Т-лимфоцитом и его последующую активацию.

Основные требования к препаратам антител – низкая иммуногенность, способность к длительной циркуляции в организме пациента, устойчивость к действию протеаз и сниженная способность к преципитации. Стоит отметить, что и на полностью человеческие МКАТ возможна продукция блокирующих антител. Это связано с тем, что иммунобиологический препарат представляет собой сложную смесь иммуноглобулинов и протеинов. Однако, процент пациентов, формирующих блокирующие антитела на гуманизированные и полностью человеческие препараты, невысок.

Выделяют неконъюгированные и конъюгированные препараты МКАТ. Неконъюгированные сами непосредственно влияют на то или иное звено патогенеза заболевания. Конъюгированные антитела пред-

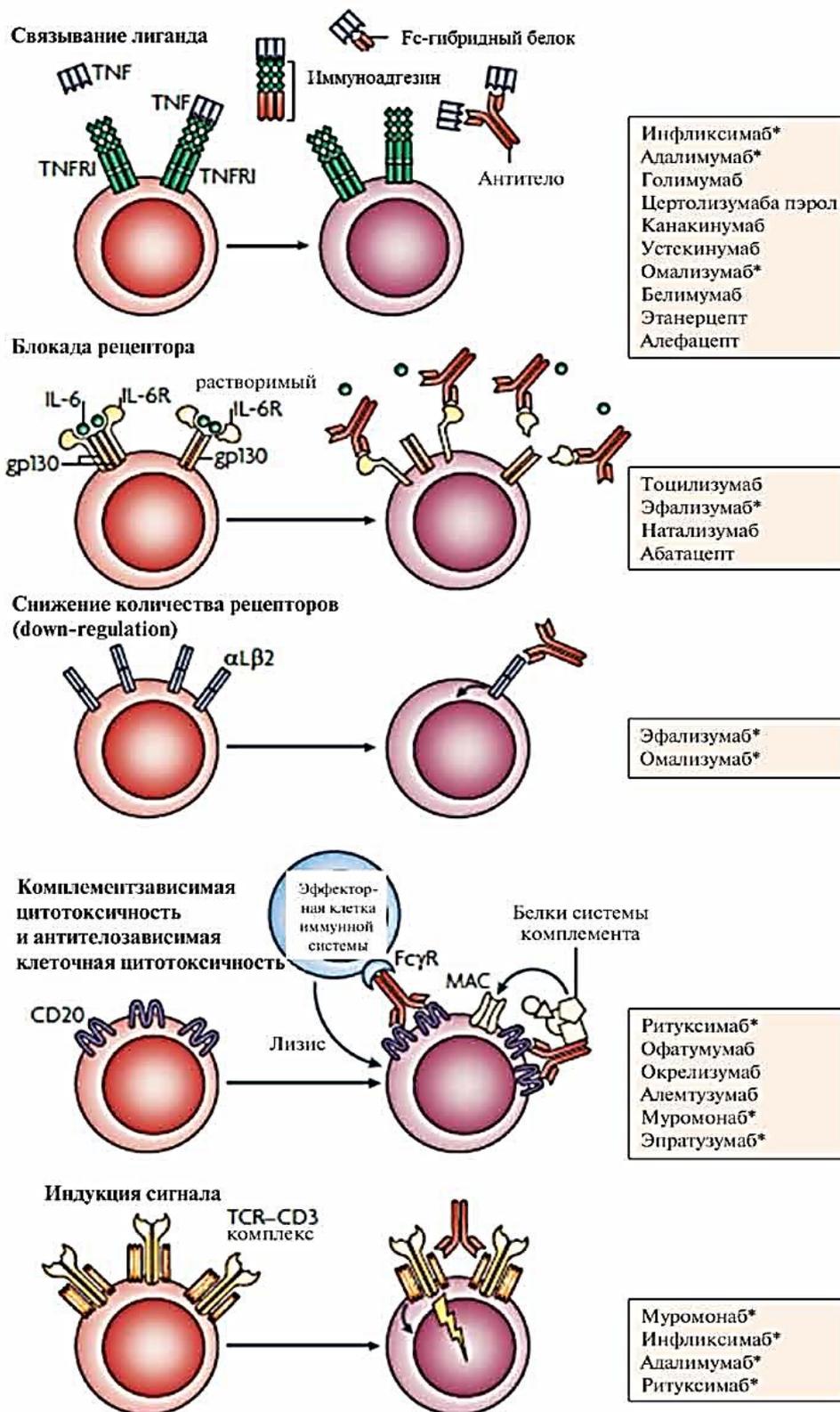


Рис. 2. Механизмы действия лекарственных препаратов моноклональных антител

На рисунке представлены основные механизмы действия ЛП МкАТ. Справа обозначены примеры ЛП, действующие по описанному механизму. Символом «*» обозначены ЛП, имеющие несколько механизмов действия, например, даун-регуляция рецепторов может вызываться как блокадой рецептора, так и связыванием лиганда антителом.

В 2019 г. в России зарегистрирован первый отечественный оригинальный препарат на основе моноклональных антител Нетакимаб – моноклональное антитело, блокирующее IL17 – провоспалительный цитокин, играющий ключевую роль в патогенезе псориаза. Препарат представляет собой гуманизированные МкАТ на основе антител ламы. Примеры препаратов МкАТ, применяемых в настоящий момент в клинической практике, представлены на рисунке 2.

В настоящее время разрабатываются новые моноклональные антитела и среди задач, которые стоят перед разработчиками, одна из основных – это снижение иммуногенности препаратов, поскольку любой аллогенный белок воспринимается иммунной системой человека как антиген.

Еще одна задача, которая стоит перед производителями – снижение молекулярной массы. Применяемые в клинической практике иммунобиологические препараты из-за высокой молекулярной массы могут вводиться только парентерально. Поэтому в настоящее время активно развивается направление, связанное с созданием препаратов «нанотел» (бельгийская компания Ablynx), «доменовых» антител (американская компания Domantis) – с низкой молекулярной массой, которые можно будет применять внутрь и ингаляционно.

Важнейшее место МкАТ заняли в лабораторной диагностике, поскольку взаимодействие антиген-моноклональное антитело лежит в основе целой группы лабораторных методов исследования, позволяющих фенотипировать клетки, оценивать содержание аутоантител, определять концентрацию цитокинов, опухолевых маркеров, гормонов и т.д. Причем, благодаря наличию МкАТ эти методики в настоящее время являются рутинными. Суть данных методов заключается в образовании комплекса МкАТ с антигеном, который визуализируется при помощи метки – ферментной (иммуноферментный анализ), флюоресцентной (иммунофлюоресцентный анализ) или радионуклеидной (радиоиммунный анализ). Эти методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что такое гибридома?
2. Каковы области применения моноклональных антител?
3. Какие типы МкАТ выделяют?

2.2. Методы, основанные на определении антител к искомым молекулам

Эти методы основаны на реакции антиген-антитело, где в качестве антигена выступает искомая молекула. Антитела к искомой молекуле метятся при помощи ферментной, флюоресцентной или радиоактивной метки. Количество меченых антител, а значит, образовавшихся в реакционной смеси иммунных комплексов, содержащих искомую молекулу оценивается при помощи соответствующей аппаратуры.

В международной литературе все анализы, основанные на визуализации реакции «антиген-антитело», принято называть «иммуноанализами».

Иммуноферментный анализ

В данном случае в качестве метки реакции антиген-антитело выступает фермент. На первом этапе (иммунная реакция) получают иммунный комплекс. В данном случае, в зависимости от задач исследования, метиться может или антиген, или антитело. Затем производится промывка, когда реагенты, не образовавшие иммунный комплекс, удаляются. Следующим этапом к образовавшемуся иммунному комплексу, содержащему ферментную метку, добавляют хромогенный субстрат, на который будет действовать фермент, выбранный в качестве метки (пероксидаза хрена, уреазы, щелочная фосфатаза). В результате действия фермента на субстрат окраска продукта изменяется и оптическую плотность содержимого лунок планшета оценивают количественно при помощи спектрофотометра.

Сначала иммуноанализы проводились без разделения компонентов в растворе. ИФА без разделения компонентов, в растворе, или как их еще называют, гомогенные, применяются в настоящее время в основном для определения низкомолекулярных антигенов (лекарственные вещества, наркотики).

В процессе совершенствования иммуноанализов пришли к методу, когда или антиген, или антитело методом спонтанной сорбции фиксировалось на твердой фазе (например, микропланшеты из полистирола (рис. 3), стрипы из нитроцеллюлозы и т.п.). Такие анализы стали называть твердофазными или иммуносорбентными (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay). Сейчас в подавляющем большинстве случаев применяются именно такие тест-системы.

Принцип твердофазных иммуноанализов заключается в том, что на твердой фазе в соответствии с физико-химическими свойствами сорбируется антиген или антитело. Если заданный антиген сорбируется плохо, то подбирается вещество – «подложка», которое хорошо свяжется как с твердой фазой, так и с антигеном. Все остальные реагенты добавляются в растворах поочередно. После добавления каждого раствора происходит инкубация, излишек реагента удаляется отмыванием. Последними добавляются меченые МкАТ, излишек не связавшихся антител удаляется. Результат реакции остается на твердой фазе и регистрируется количественно с помощью спектрофотометра.

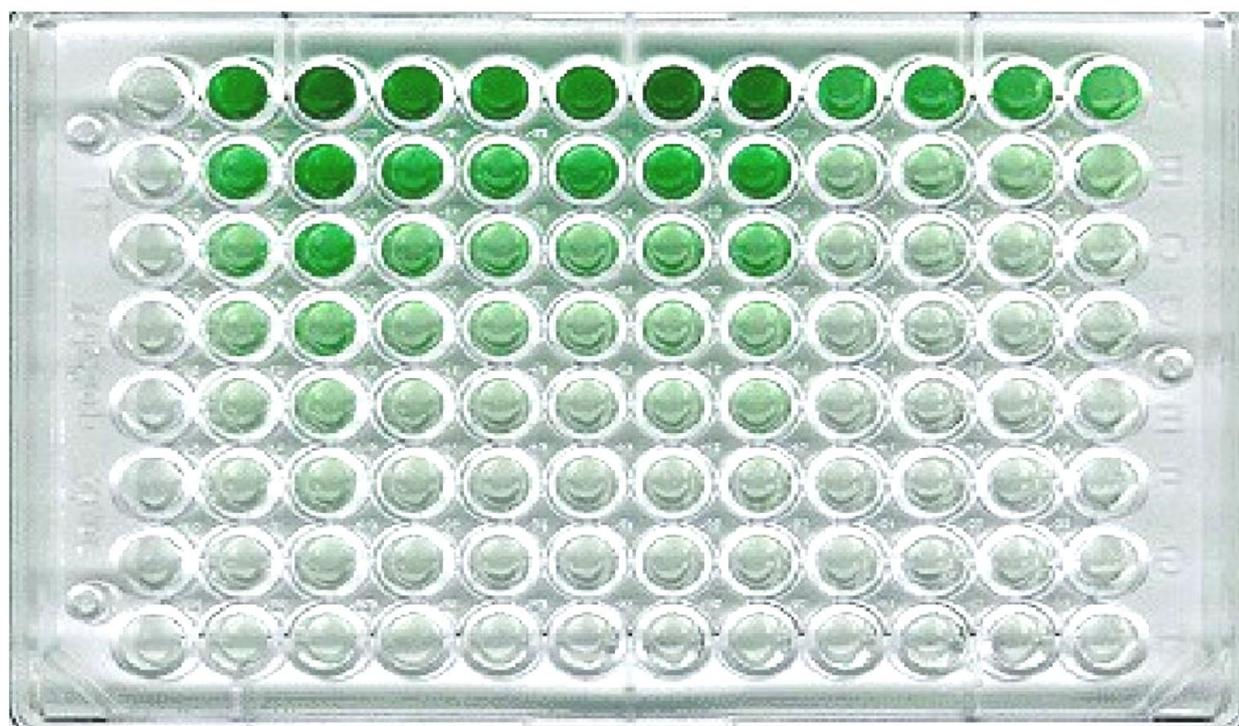


Рис. 3. Полистироловый 96-луночный планшет для проведения твердофазного ИФА. Результат реакции

Выделяют прямые и непрямые иммуноанализы.

Прямые иммуноанализы. В этом случае метку присоединяют непосредственно или к заданному антигену, или к антителу против искомого антигена.

Непрямые иммуноанализы. Применяются чаще, чем прямые. В этом случае меткой нагружаются не целевые антигены и не антитела к ним, а так называемые вторые антитела – антивидовые антииммуноглобулиновые антитела. Эти МкАТ специфичны не к эпитопам, а к Fc-фрагментам иммуноглобулина. Такие реагенты можно использовать в тест-системах, определяющих разные антигены и антитела. В

этом случае, в отличие от прямых иммуноанализов, не требуется высокоочищенных препаратов конкретного антигена или антител к нему. Достаточно высокоочищенного препарата антивидовых антител.

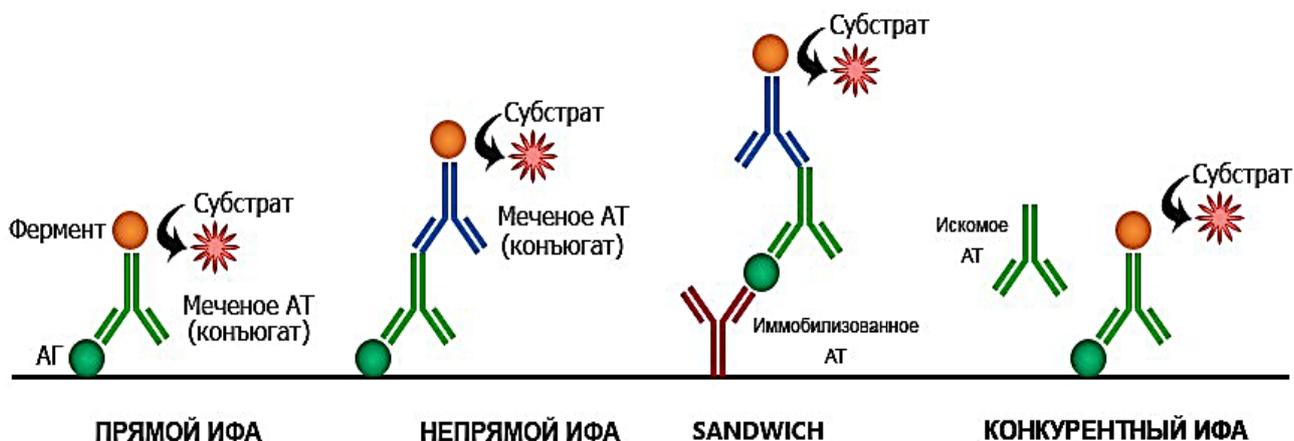


Рис. 4. Принципиальная схема различных вариантов иммуноанализов

Вариантом как прямых, так и непрямых иммуноанализов являются анализы «сэндвич»-типа. В этом случае используют МкАТ к разным неперекрывающимся эпитопам антигена. Антитела к одному из эпитопов сорбируют на твердой фазе. Затем добавляют искомым антиген, а следующим этапом – МкАТ, конъюгированные с меткой, к другому, пространственно удаленному от первого, эпитопу. Такой тип иммуноанализов обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя выявлять искомые антигены даже в сложных гетерогенных средах, благодаря использованию антител к разным эпитопам антигена. Однако, поскольку МкАТ распознают 2 разные антигенные детерминанты, молекула антигена должна быть достаточно крупной, чтобы эпитопы были пространственно удалены друг от друга и не создавали стереохимических помех.

При этом ферментативная активность, остающаяся на твердой фазе, будет прямо пропорциональна содержанию антигена в пробе.

Еще один вариант иммуноанализов – **конкурентный или ингибиторный ИФА**. В этом случае на дне лунок планшета иммобилизуют антиген. Антитела к антигену помечены ферментной меткой. При добавлении исследуемого биологического материала и меченых антител, последние начинают конкурировать с антителами из биологической среды за антиген. Таким образом, ферментативная активность в такой лунке будет обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в пробе.

Радиоиммунный анализ (РИА)

В качестве метки, присоединяемой к антителу, используется радионуклеид. Как правило, это радионуклеиды йода или трития. Результат измеряют при помощи счетчика радиоактивности. По чувствительности и специфичности ИФА и РИА одинаковы, так как их результат определяется аффинностью связи между антигеном и антителом. Однако проведение РИА имеет ряд сложностей. Одна из них – необходимость частого обновления реагентов, поскольку величина излучения радионуклеидов непрерывно изменяется. То есть, эти реагенты гораздо менее стабильны, чем реагенты для ИФА. Кроме того, необходимо специальное оснащение лаборатории для работы с радиоактивными веществами.

Метод иммунофлуоресценции

Метод также основан на принципе образования иммунного комплекса антиген-антитело, однако в качестве метки в данном случае выступает флюорохром. При проведении непрямой иммунофлуоресценции суспензию живых клеток обрабатывают антителами, специфичными к антигену. Затем в систему вносят антитела, направленные против уже добавленных специфических антител и меченые флюорохромом. Результат учитывают при помощи флюоресцентного микроскопа или флюориметра по специфическому свечению клеток.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие виды иммуноанализов выделяют?
2. Опишите принцип разных видов иммуноанализов.
3. В чем преимущества ИФА перед РИА и методом иммунофлуоресценции?

2.3. Проточная цитометрия

Этот метод основан на регистрации оптических параметров находящихся в потоке клеток по сигналам светорассеяния и флуоресценции (рис. 5).

Для фокусировки клеток в потоке жидкости используют гидродинамическое или акустическое фокусирование. При гидродинамическом фокусировании через проточную ячейку движется постоянный ток изотонического раствора под определенным давлением. Внутри

проточной ячейки находится зонд, из которого подается образец, содержащий клетки. За счет разницы давления в зонде и «обжимающей» жидкости происходит гидродинамическое фокусирование струи в струе, клетки за счет этого выстраиваются друг за другом и проходят через луч лазера. Оптика цитометра улавливает излучение, исходящее от клеток и регистрирует его. А электроника преобразует сигнал и оцифровывает его, что дает возможность анализа полученных данных. Данные представляются в виде графиков и гистограмм.

Таким образом, в ходе проточной цитометрии измеряется:

- прямое светорассеяние (под малым углом) – дает представление о размерах клетки или частицы. Более крупные клетки рассеивают свет сильнее мелких;
- боковое рассеяние (под прямым углом) – дает представление о неоднородности содержимого клетки. Проходя через клетку, луч лазера многократно преломляется и рассеивается во все стороны. Регистрация этого излучения позволяет судить о внутреннем «устройстве» клетки: соотношении ядра и цитоплазмы, наличии гранул.

Комбинация параметров прямого и бокового рассеяния дает представление о морфологии клетки и позволяет выделять субпопуляции клеток для дальнейшего анализа.

Флуоресценция дает возможность изучить клеточные маркеры с помощью меченых флуорохромами антител к поверхностным и внутриклеточным структурам. По интенсивности флуоресценции можно судить о плотности экспрессии изучаемого маркера. Кроме того, существует возможность измерять поляризацию флуоресценции и время пролета частицы через зону анализа. Первое позволяет исследователю судить о степени вязкости мембран клеток, которая меняется в зависимости от их функционального состояния, а второе – о степени асимметричности клеток или исследуемых органелл.

Проточная цитометрия широко применяется в клинической практике, поскольку позволяет в достаточно короткие сроки оценить комплекс показателей. Этот метод может быть использован для:

- подсчета клеток,
- определения фазы клеточного цикла и содержания ДНК,
- определения фенотипа клеток и их функционального состояния,
- изучение кинетических параметров клеточных процессов,
- оценка продукции клетками цитокинов,
- изучение механизмов и стадий апоптоза,

– исследование чувствительности клеток к цитостатикам путем определения уровня экспрессии белков.

Данный метод исследования на сегодняшний день является рутинным в клинической лабораторной диагностике, поскольку позволяет проводить иммунофенотипирование клеток, что широко используется в иммунологии как в практических, так и в академических целях. Применяется этот метод и в онкологии, для диагностики и мониторинга течения лейкозов. Кроме клеток крови, метод проточной цитометрии позволяет исследовать диссоциированные клетки и других тканей.

Принципиальное устройство проточного цитометра (flow cytometer)

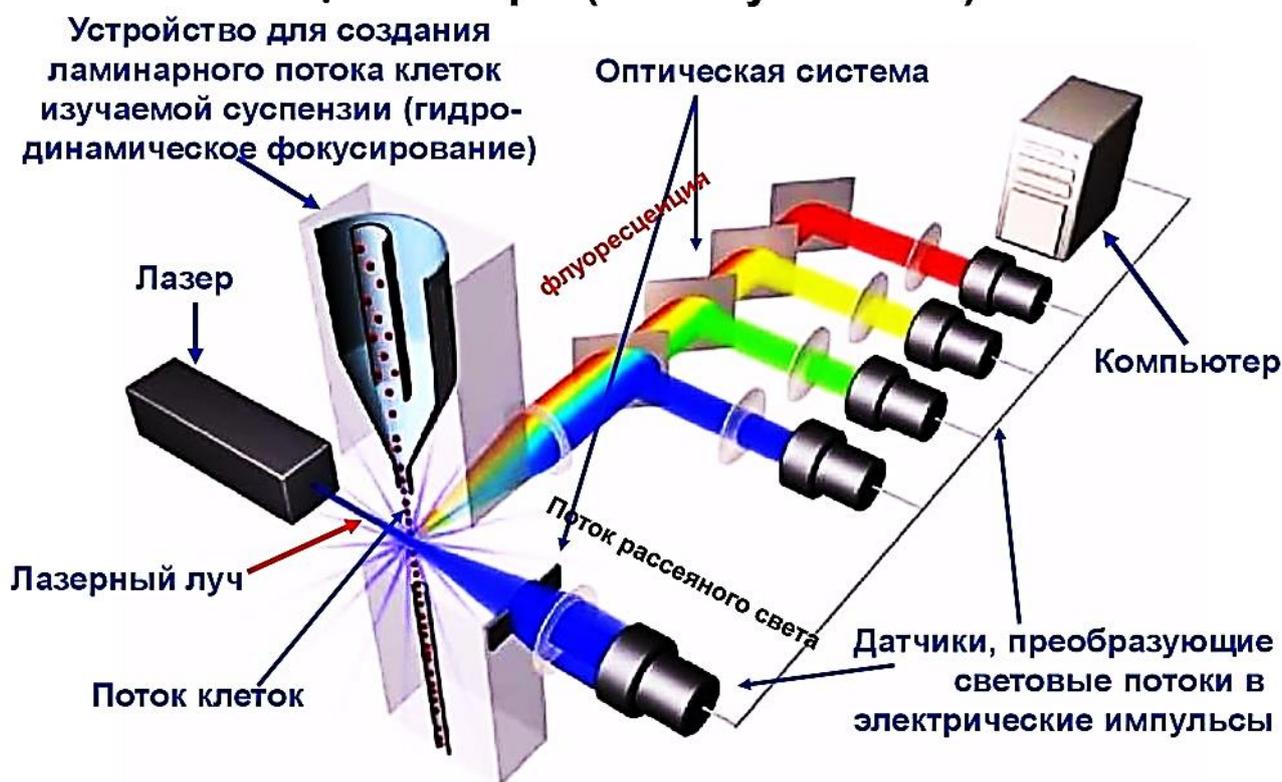


Рис. 5. Принципиальная схема устройства проточного цитофлуориметра

На рисунке 6 представлены гистограммы, иллюстрирующие нормальное содержание В-клеток (на рисунке слева), а также, содержание В-клеток на фоне В-лимобластного лейкоза (голубая область – опухолевая субпопуляция) – на рисунке справа.

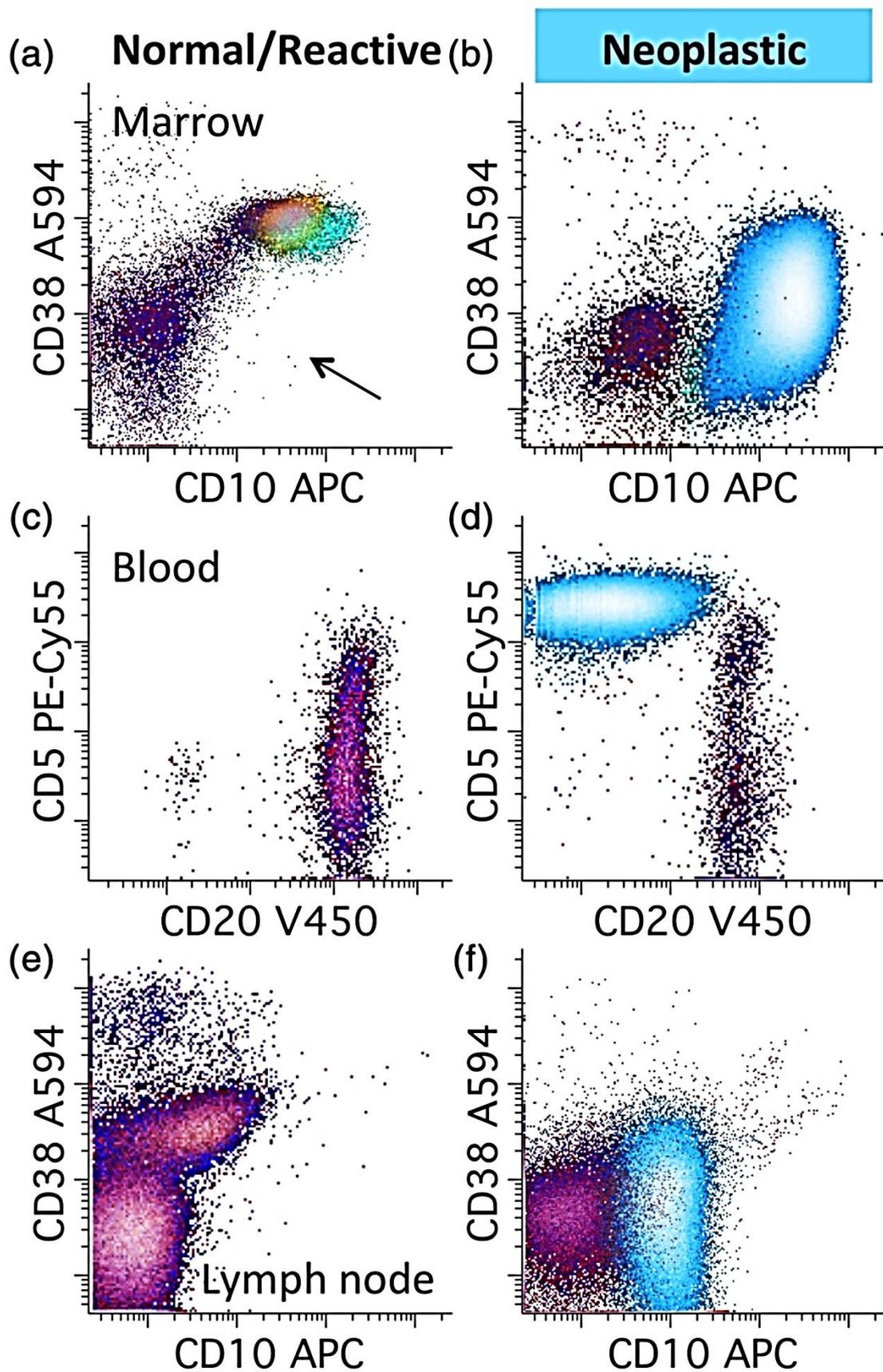


Рис. 6. В-клетки в образце здорового человека (слева) и больного лимфобластным лейкозом (справа)

2.4. Область применения анализов, основанных на реакциях антиген-антитело

1. Диагностика инфекционных заболеваний

1. Выявление острого инфекционного процесса – обнаружение IgM к антигену или кратное нарастание титра антител (IgG) методом «парных сывороток». В данном случае необходимо повторное исследование титров антител с временным интервалом в 2–4 недели. Если позволяет клиническая ситуация, то первую сыворотку замораживают и проводят одновременное определение концентрации антител в обоих исследуемых образцах.
2. Выявление обострения инфекционного заболевания – обнаружение IgM к антигену или кратное нарастание титра антител (IgG) методом «парных сывороток».
3. Оценка состояния реконвалесценции и результатов проведенной терапии – снижение (IgG) или исчезновение (IgA) титров антител через 2–3 недели от момента первого исследования
4. Оценка поствакцинального иммунитета – определение IgG в высоких титрах через 4 недели после вакцинации.
5. Оценка давности инфицирования по индексу авидности. Низкоавидные антитела обнаруживаются в течение 4–6 месяцев от начала заболевания. В дальнейшем формируются высокоавидные антитела.

2. Оценка гормонального статуса

Используется для диагностики заболеваний эндокринной системы.

3. Диагностика онкологических заболеваний

1. Скрининг – для выявления круга лиц, требующих углубленного обследования.
2. Диагностика – в комплексе мероприятий, позволяющих выявить наличие опухолевой трансформации. Комбинированное определение нескольких маркеров может помочь в выявлении первичного очага опухоли при ее метастазировании.
3. Оценка прогноза заболевания по динамике изменения концентрации антител.
4. Оценка эффективности терапии и выявление рецидива до клинической манифестации.

Иммуноблоттинг (Western-blot)

В клинической практике иногда возникает необходимость обнаружения специфических антител к конкретным белкам. Использование с этой целью метода ИФА вызывает определенные трудности, поскольку создает необходимость выделения таких белковых антигенов в виде стандартизированного высокоочищенного реагента. В то время как иммунный блот позволяет определять в сыворотке крови одновременно специфические антитела ко всем диагностически значимым белкам (например, белкам, имеющим ключевое значение для диагностики ВИЧ-инфекции, таким, как gp120, gp41 и др.). Поэтому в настоящее время метод широко применяется для диагностики инфекционных, аутоиммунных и аллергических заболеваний, поскольку представляет собой высокочувствительный и однозначно трактуемый анализ.

Термин «western-blot» имеет интересную историю. В 1975 г. ученый E. Southern предложил метод электрофоретического переноса ДНК из геля на мембрану. В его честь этот метод был назван «Southern-blot». Затем, когда была разработана аналогичная методика для переноса РНК, ее, сначала в шутку, называли «Nothern-blot». Со временем название закрепилось. Поэтому, когда открыли метод переноса белков (1979 г., Towbin и соавт.), то ее, уже по традиции, назвали «географическим» названием – «Western-blot».

На первом этапе исследования при помощи электрофореза в полиакриламидном геле происходит распределение антигенных белков. Они располагаются в виде тонких полосок в зависимости от своей молекулярной массы. Так, ближе к «старту» находятся наиболее крупные белки, массой до 120–150 кДа, а дальше всех продвигаются белки с маленькой массой 5–10 кДа.

Вторым этапом эту пластину накладывают на лист нитроцеллюлозы и помещают между пластинами с постоянным электрическим током, под действием которого происходит интеграция белков в нитроцеллюлозный лист, в котором они прочно закрепляются. Такой лист разрезается на стрипы, содержащие весь спектр диагностически значимых белков.

Определение антител к белкам осуществляется по схеме непрямого иммуноферментного анализа. При наличии антител к целевым белкам на блоте появляются темные поперечные полоски в месте фиксации данного белка (рис. 7). В дальнейшем нитроцеллюлозные блоты в высушенном виде могут храниться в течение длительного времени.

Влажные блоты можно фотографировать, а также сканировать с целью хранения в цифровом виде.

Метод иммуноблота нашел широкое применение в клинической практике. В частности, этот метод является референсным в диагностике ВИЧ-инфекции.

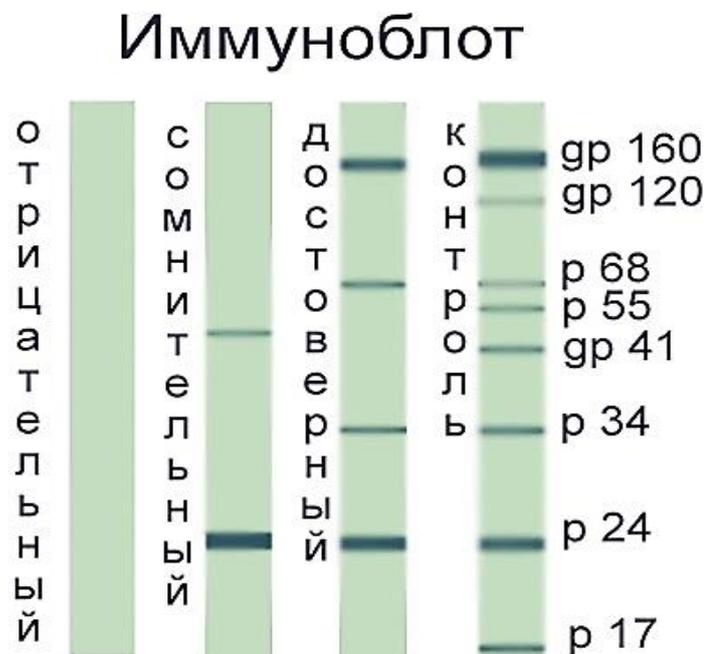


Рис. 7. Результат иммуноблоттинга на примере исследования антител к белкам ВИЧ

ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot)

Это метод, позволяющий визуализировать количество клеток, секретирующих тот или иной продукт (рис. 8). Например, антитела, цитокины и т.п.

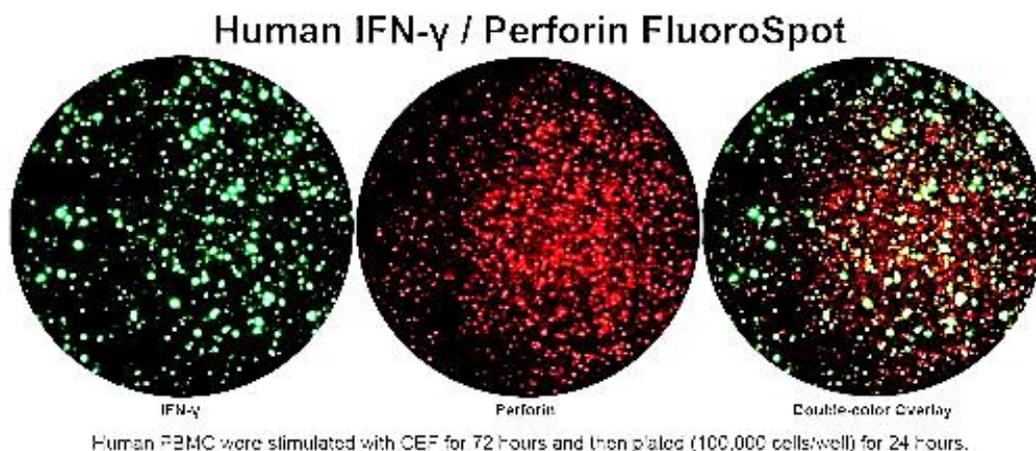


Рис. 8. Результат применения метода ELISPOT

Идея этого метода состоит в использовании культуры клеток при проведении твердофазного ИФА (рис. 9).

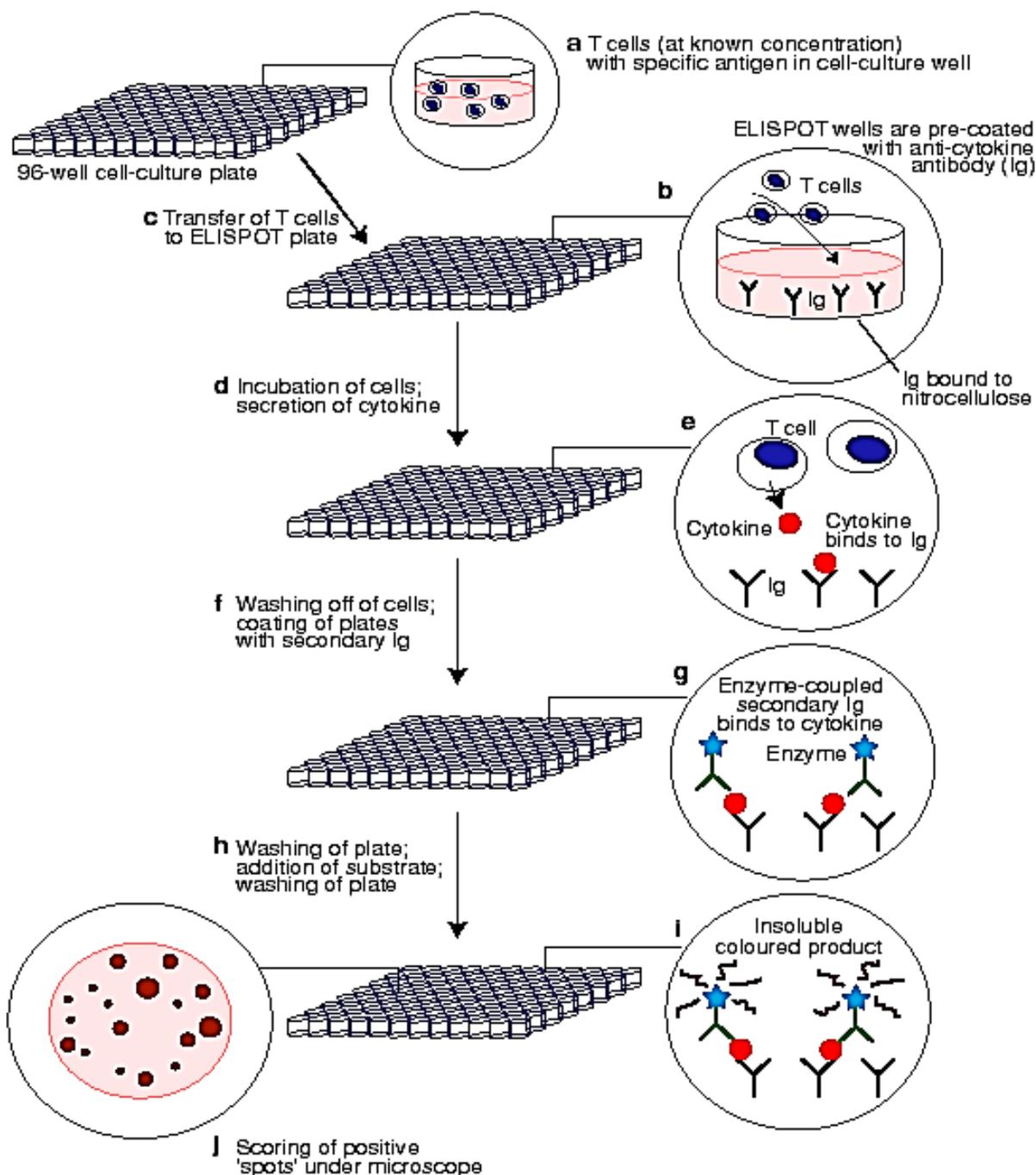


Рис. 9. Принцип метода ELISPOT

Для культивирования используются стандартные 96-луночные планшеты, на дно ячеек которых помещена нитроцеллюлозная мембрана. На мембране сорбируют антиген. После этого в лунках планшета культивируют лимфоциты в CO_2 анализаторе при температуре $37\text{ }^\circ C$. Затем клетки тщательно отмывают. Если клетки секретировали

антитела против антигена, сорбированного на мембране, то эти антитела зафиксированы в лунке планшета, в которой культивировались клетки-продуценты, так называемые, антителообразующие клетки (АОК). Поэтому следующим этапом в систему вносят антииммуноглобулиновые антитела, меченые ферментом. Излишек отмывают и добавляют субстрат. Фермент, который остался в точках, где лежали во время культивирования АОК, катализирует образование цветного продукта. Таким образом, на дне лунок образуются окрашенные пятна (spot). Количество этих пятен учитывается и сравнивается с контролем.

Метод включен в протоколы обязательных исследований при разработках и клинических испытаниях вакцин.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Укажите возможности метода проточной цитометрии в диагностике инфекционных заболеваний.
2. Выделите преимущества иммуноблоттинга по сравнению с ИФА.
3. Опишите принцип метода ELISPOT.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ к разделам 2.1.–2.4.

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МЕТОД, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ВИЗУАЛИЗИРОВАТЬ КЛЕТКИ, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫЕ МОЛЕКУЛЫ
 - 1)РИА
 - 2)иммуноблоттинг
 - 3)ELISPOT
 - 4)проточная цитометрия

2. ВИДЫ ИММУНОАНАЛИЗОВ
 - 1)прямой
 - 2)обратный
 - 3)конкурентный
 - 4)непрямой

3. КЛЕТКИ, КОТОРЫЕ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ГИБРИДОМЫ
 - 1)плазмоцит
 - 2)В-лимфоцит
 - 3)миеломная клетка
 - 4)дендритная клетка

4. СТРУКТУРА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, КОТОРАЯ ЯВЛЯЕТСЯ МЫШИНОЙ У ХИМЕРНЫХ МКАТ
 - 1)Fab-фрагмент
 - 2)Fc-фрагмент
 - 3)активный центр антитела
 - 4)легкая цепь

5. ПРЕПАРАТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К IL-5, ПРИМЕНЯЮЩИЙСЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ
 - 1)дупилумаб
 - 2)омализумаб
 - 3)меполизумаб
 - 4)реслизумаб

6. ОГРАНИЧЕНИЯ, НАБЛЮДАЮЩИЕСЯ ПРИ КЛИНИЧЕСКОМ ПРИМЕНЕНИИ МЫШИНЫХ АНТИТЕЛ
 - 1)медленное распределение в тканях

- 2)наработка блокирующих антител плазмоцитами пациента
- 3)низкая молекулярная масса
- 4)отсутствие гарантии биологической безопасности

7. ОГРАНИЧЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В ЛАБОРАТОРИИ МЕТОДА РИА

- 1)необходимость частого обновления реагентов в связи с низкой стабильностью
- 2)высокая стоимость расходных материалов для проведения исследования
- 3)необходимость создания особых условий для работы с радиоактивными материалами
- 4)низкая чувствительность и специфичность метода

8. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЗАДАНЫМ БЕЛКАМ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1)sowthern-блот
- 2)northern-блот
- 3)western-блот
- 4)eastern-блот

9. МЕТОД, ЯВЛЯЮЩИЙ РЕФЕРЕНСНЫМ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ДИАГНОЗА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

- 1)проточная цитометрия
- 2)ELISPOT
- 3)иммуноблоттинг
- 4)все перечисленное верно

10. ПРЕПАРАТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К α -ЦЕПИ IL-4R, РАЗРЕШЕННЫЙ К ПРИМЕНЕНИЮ У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

- 1)омализумаб
- 2)дупилумаб
- 3)меполизумаб
- 4)реслизумаб

11. МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ, ПОЗВОЛЯЮЩИЙ ПРОГНОЗИРОВАТЬ РЕЦИДИВ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА НА ДОКЛИНИЧЕСКОЙ СТАДИИ
- 1) полимеразная цепная реакция
 - 2) проточная цитометрия
 - 3) ELISPOT
 - 4) иммуноблоттинг
12. СТРУКТУРА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ЯВЛЯЮЩАЯСЯ МЫШИНОЙ У ГУМАНИЗИРОВАННЫХ МКАТ
- 1) Fab-фрагмент
 - 2) Fc-фрагмент
 - 3) CDR-участки
 - 4) активный центр антитела
13. УКАЖИТЕ, КАКИМ КЛОНАМ ГИБРИДОВ ОТДАЕТСЯ ПРЕДПОЧТЕНИЕ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ МКАТ
- 1) продуцирующим IgG
 - 2) продуцирующим IgA
 - 3) продуцирующим IgM
 - 4) продуцирующим IgE
14. ОЦЕНИТЕ ВОЗМОЖНОСТЬ НАРАБОТКИ БЛОКИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МКАТ
- 1) возможна
 - 2) невозможна
15. ВЫБЕРИТЕ, В КАКОМ ВАРИАНТЕ ИФА ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОБРАТНО ПРОПОРЦИОНАЛЬНА СОДЕРЖАНИЮ ИСКОМОГО ВЕЩЕСТВА В ПРОБЕ
- 1) конкурентный
 - 2) «сэндвич»
 - 3) прямой
 - 4) непрямой
16. УКАЖИТЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, В ОСНОВЕ КОТОРЫХ ЛЕЖИТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ «АНТИГЕН-АНТИТЕЛО»
- 1) ПЦР

- 2) проточная цитометрия
- 3) иммуноферментный анализ

17. ВЫБЕРИТЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

- 1) подсчет количества клеток в образце
- 2) фенотипирование клеток образца
- 3) исследование механизмов и стадий апоптоза
- 4) все перечисленное верно

18. МЕЖДУНАРОДНОЕ НЕПАТЕНТОВАННОЕ НАИМЕНОВАНИЕ ПРЕПАРАТА МКАТ К IGE – ЭТО

- 1) Омализумаб
- 2) Дупилумаб
- 3) Реслизумаб

2.5. Реакция бластной трансформации (РБТЛ)

Несмотря на введение современных методов изучения лимфоцитов, РБТЛ или, в англоязычной литературе, lymphoblast transformation test (LTT), остается одним из важнейших методов, характеризующих физиологическую активность клеток. При помощи этого метода оценивается способность лимфоцитов активироваться как специфическими (заданные антигены микробного и немикробного происхождения), так и неспецифическими (митогены) стимулами, что сопровождается удвоением ДНК в S-фазе митоза. В результате такой активации лимфоциты подвергаются бластной трансформации (рис. 10). Способность к такой трансформации в периферических тканях – это уникальное свойство Т- и В-клеток, лежащее в основе иммунного ответа.

Интересным является тот факт, что различные митогены способны селективно стимулировать тот или иной тип клеток. Так, фитогемагглютинин (ФГА) является предпочтительным митогеном для изучения функциональной активности зрелых Т-клеток. В то время, как конканавалин А (КонаА) преимущественно активирует незрелые Т-лимфоциты. О функциональной активности В-клеток наилучшее представление мы получим при культивировании в присутствии бактериальных липополисахаридов, например, пирогенала.

Существует несколько модификаций этого метода, что затрудняет однозначную клиническую трактовку полученных результатов. Кроме

того, постановка этой методики требует наличия стерильных условий и длительного культивирования лимфоцитов, что также осложняет ее внедрение в широкую клиническую практику.

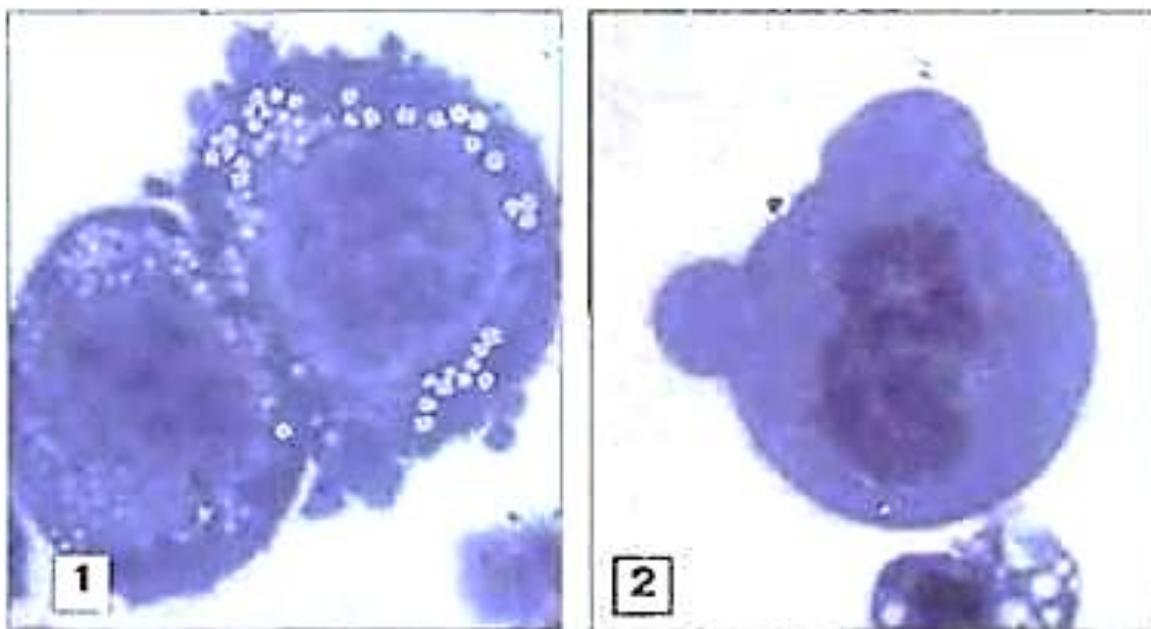


Рис. 10. *Бласттрансформация лимфоцитов, индуцированная митогеном или антигеном*

Представленные на фотографии Т- и В-клетки человека активированы митогеном лаконоса. 1 – усиление базофилии цитоплазмы и увеличение объема клеток; 2 – при клеточном делении происходит конденсация хромосом, и они становятся хорошо видны. Окраска по Гимза $\times 1500$.

Опишем ход классического метода постановки РБТЛ.

В ходе постановки реакции бластной трансформации первоначально стерильную гепаринизированную кровь отстаивают до получения четкого разделения эритроцитов и плазмы. Полученную плазму помещают в стерильные флаконы со средой 199 и антибиотиками. Далее в контрольные образцы добавляют изотонический раствор, а в опытные – исследуемый антиген или митоген. Флаконы инкубируют при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24–72 часов (для митогенов). Для оценки пролиферации клеток в ответ на антиген время культивирования может быть увеличено до 6–7 суток. Затем забирают надосадочную жидкость, ресуспендируют ее в среде 199 и помещают в центрифужные пробирки. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляют, добавляют уксусную кислоту, центрифугируют повторно. Снова удаляют надосадочную жидкость, а осадок переносят на предметное стекло и окрашивают по Романовскому–Гимзе.

Учет результатов производится под микроскопом в иммерсионной системе на основании структуры клеток. Активировавшиеся лимфоциты, прошедшие S-фазу, но еще не подвергшиеся митозу, имеют двойное количество ДНК и других компонентов хромосом. Поэтому такие лимфоциты крупнее, чем не делящиеся клетки, с крупным ядром. Подсчитывают число малых лимфоцитов (диаметр клеток 7–7,5 мкм), бластоподобных переходных форм (8–14 мкм) и бластов (более 14 мкм). Для корректной оценки процента бластной трансформации необходим подсчет 200–300 клеток. Учитывают спонтанную и стимулированную бластную трансформацию. При этом нормальными показателями считают уровень спонтанной РБТЛ до 10%, стимулированной митогеном – 40–70%. Уровень бластной трансформации при стимуляции антигеном дает представление об активности иммунного ответа и выраженности сенсibilизации организма на заданный антиген.

В настоящее время возможно также оценить пролиферацию лимфоцитов при помощи включения в ДНК при жизни клетки различных меток: флюоресцентных красителей (метод FACS), радиоактивных изотопов (тимидин, уридин).

Таким образом, мы можем не только оценить способность лимфоцитов к клональной экспансии, но и выявить сенсibilизацию по отношению к заданному антигену по IV типу (Gell, Coombs).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Почему РБТЛ позволяет избирательно оценивать функциональную активность разных субпопуляций лимфоцитов?
2. Область применения РБТЛ.

2.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В основе метода – специфическая амплификация нуклеиновых кислот, индуцируемая синтетическими нуклеотидными праймерами *in vitro*. То есть, метод основан на многократном копировании ДНК, имеющейся в образце, при помощи фермента Taq-ДНК-полимеразы. При этом происходит копирование только заданного участка ДНК и только в том случае, если он присутствует в пробе. Таким образом, метод ПЦР позволяет добиться визуализации генетического материала в образце даже при его минимальной концентрации. ПЦР позволяет получить амплификаты длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов.

Многokратное копирование определенного участка ДНК осуществляется при помощи ферментов, получаемых из термофильных бактерий, поскольку ферменты должны сохранять свою биологическую активность в реакционной смеси при высоких температурах. Например, Taq-ДНК-полимераза из термофильных бактерий *Thermusaquaticus*, Pfu-полимераза из *Pyrococcus furiosus*, Pwo-полимераза из *Pyrococcus woesei* и др.

Реакция проводится в термостате-амплификаторе. Это прибор, который способен производить достаточно быстрое нагревание и охлаждение пробирок.

Обычно выполняется от 20 до 45 циклов амплификации, каждый из которых состоит из 3 стадий: денатурации, отжига праймеров и элонгации (рис. 11).

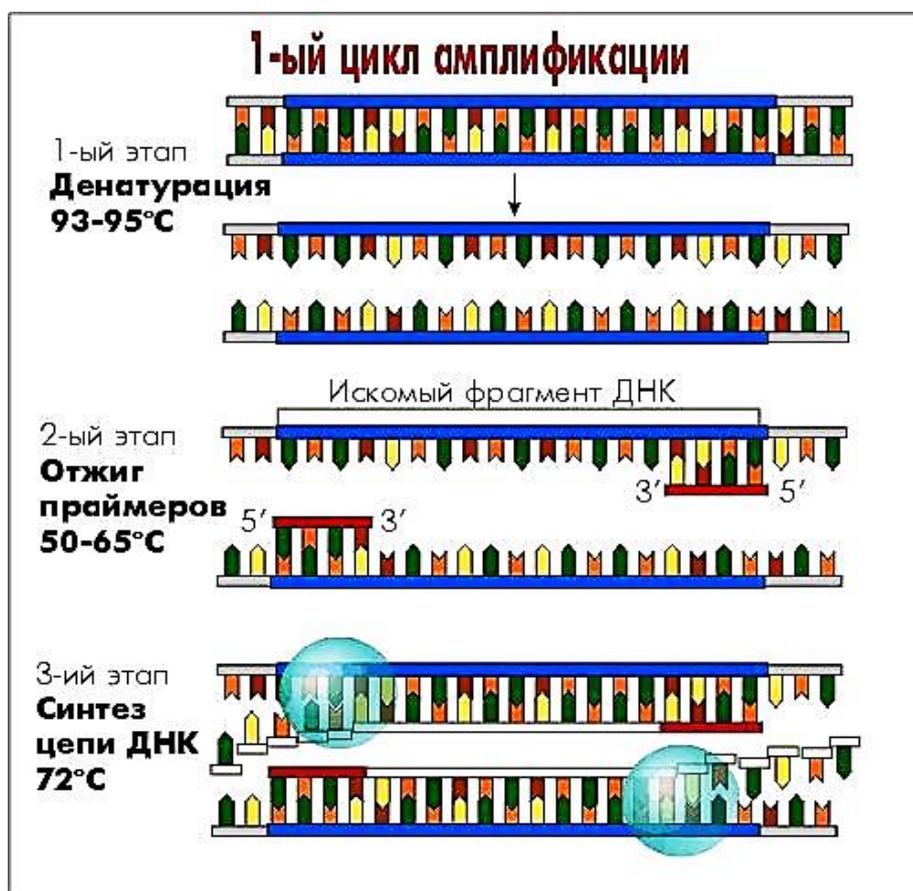


Рис. 11. Этапы полимеразной цепной реакции

При проведении ПЦР очень большое внимание уделяется исключению контаминации образцов, что может привести к получению ложноположительного результата реакции. Чувствительность метода крайне высока. Поэтому при проведении этого исследования исполь-

зуются одноразовые инструменты и посуда, помещение обрабатывается ультрафиолетом. Это позволяет исключить внесение в реакционную смесь ДНК через пробирки, другой медицинский инструментарий. Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР.

Анализ ДНК в образцах осуществляют при помощи нескольких методов:

1. Электрофорез в агарозном геле позволяет обнаружить ДНК и определить ее размер (рис. 12).
2. Метод гибридизации ДНК (Southern-blot).
3. Дот-блот гибридизация.

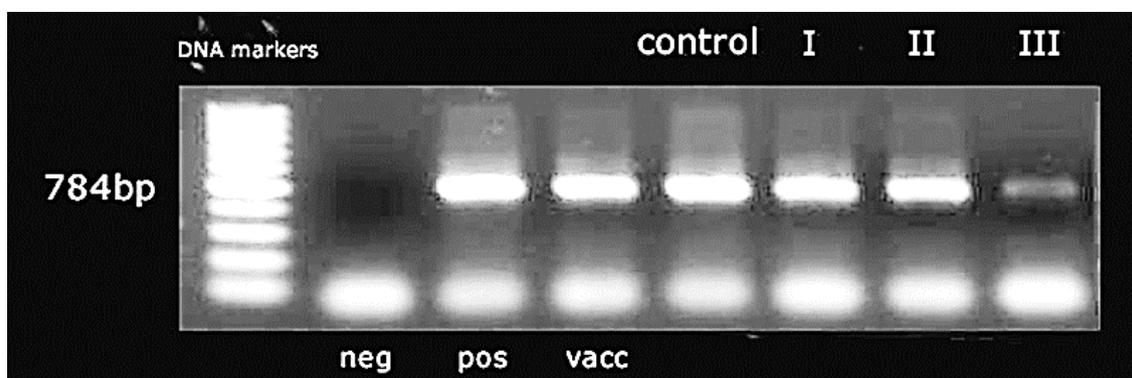


Рис. 12. Электрофорез в агарозном геле

Модификации ПЦР

1. Возможно проведение ПЦР при использовании в качестве матрицы РНК. Такой метод применяют, например, при детекции РНК-вирусов. В этом случае первым этапом реакции является построение ДНК на основе имеющейся РНК при помощи фермента ревертазы, или обратной транскриптазы. Построенную таким образом комплементарную ДНК используют затем в качестве матрицы для проведения ПЦР.

2. ПЦР в режиме реального времени (real-time). В ходе исследования в реакционную смесь добавляют флуоресцентный зонд. Это позволяет осуществлять детекцию флуоресцирующего продукта каждый цикл амплификации и наблюдать рост количества продукта ПЦР в режиме реального времени.

Преимущества ПЦР:

1. Высокая чувствительность (достаточно 10 копий матрицы или 1 возбудителя в пробе).
2. Высокая специфичность (около 100%).

3. Необходимо малое количество биологического материала и материал может быть разнообразным, в том числе, гистологическим (например, тонкоигольные аспираты).
4. Для исследования может применяться дезинфицированный материал, что снижает риск заражения медицинского персонала.
5. Позволяет быстро получить результат и дает возможность отслеживать его в режиме реального времени.

Применение:

1. Обнаружение генетического материала инфекционных патогенов в различных биологических тканях и средах.
2. Обнаружение генетических нарушений.
3. Идентификация личности.
4. Определение полиморфизма генов белковых продуктов.
5. ДНК-типирование HLA-аллелей.
6. Определение экспрессии различных молекул (рецепторов, цитокинов).

В настоящее время метод ПЦР применяется в ходе скрининга новорожденных на предмет диагностики тяжелых врожденных первичных иммунодефицитов. Это так называемый метод определения TREC (T-cell receptor excision circles), KREC (kappa-deleting recombination excision circle). При помощи этого метода в образцах крови новорожденных оценивают наличие эксцизионных колец, образующихся в цитоплазме лимфоцитов в ходе лимфопоэза (рис. 13).

При снижении этого показателя ниже референсных значений ребенка относят в группу риска по развитию первичного иммунодефицита.

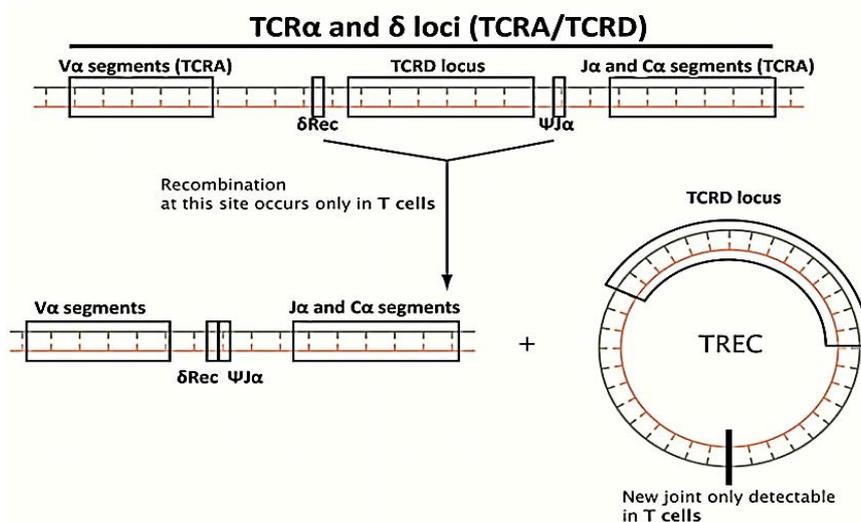


Рис. 13. Определение эксцизионных колец в лимфоцитах

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Укажите область применения Real-time ПЦР.
2. Приведите примеры клинического применения метода.
3. Укажите, какие условия необходимо соблюдать в лаборатории в ходе проведения ПЦР.

2.7. Оценка системы комплемента

Ранее оценка активности системы комплемента осуществлялась с применением метода 50% гемолиза. Однако в настоящее время наиболее адекватным является оценка системы комплемента с применением метода ИФА.

В настоящее время производители выпускают тест-системы для оценки активации как классического, так и альтернативного, и лектинового путей. Для этого в лунках микропланшета сорбируют специфические активаторы исследуемого пути активации комплемента. Сыворотку пациента разводят специальным буфером, который обеспечивает блокаду других путей запуска. Образовавшийся в ходе реакции МАК (мембран-атакующий комплекс) выявляют при помощи специфических моноклональных антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой. Степень активации комплемента коррелирует с интенсивностью окрашивания реакционной смеси.

Ряд патологических состояний может приводить к снижению продукции компонентов комплемента. Примерами таких состояний являются уремия, заболевания печени, длительное применение высоких доз глюкокортикостероидных препаратов.

Дефицит C1, C2 и C4 (рис. 14) приводит к нарушению формирования и клиренса иммунных комплексов и характерен для аутоиммунных заболеваний, например, СКВ. Кроме того, оценка концентрации C4 проводится у пациентов с подозрением на наследственный ангионевротический отек и является одним из критериев установления диагноза.

Содержание C3 в сыворотке снижается при хронической иммунокомплексной патологии вследствие его активного расхода при активации альтернативного пути запуска комплемента.

В свою очередь, снижение концентрации C3 и фактора В, приводит к увеличению частоты пиогенных инфекций.

Дефицит компонентов, формирующих МАК, а также фактора D и пропердина приводит к повышенной восприимчивости к нейссерияльным инфекциям, например, к возбудителям *N. Meningitidis*, *N. Gonorrhoeae*.

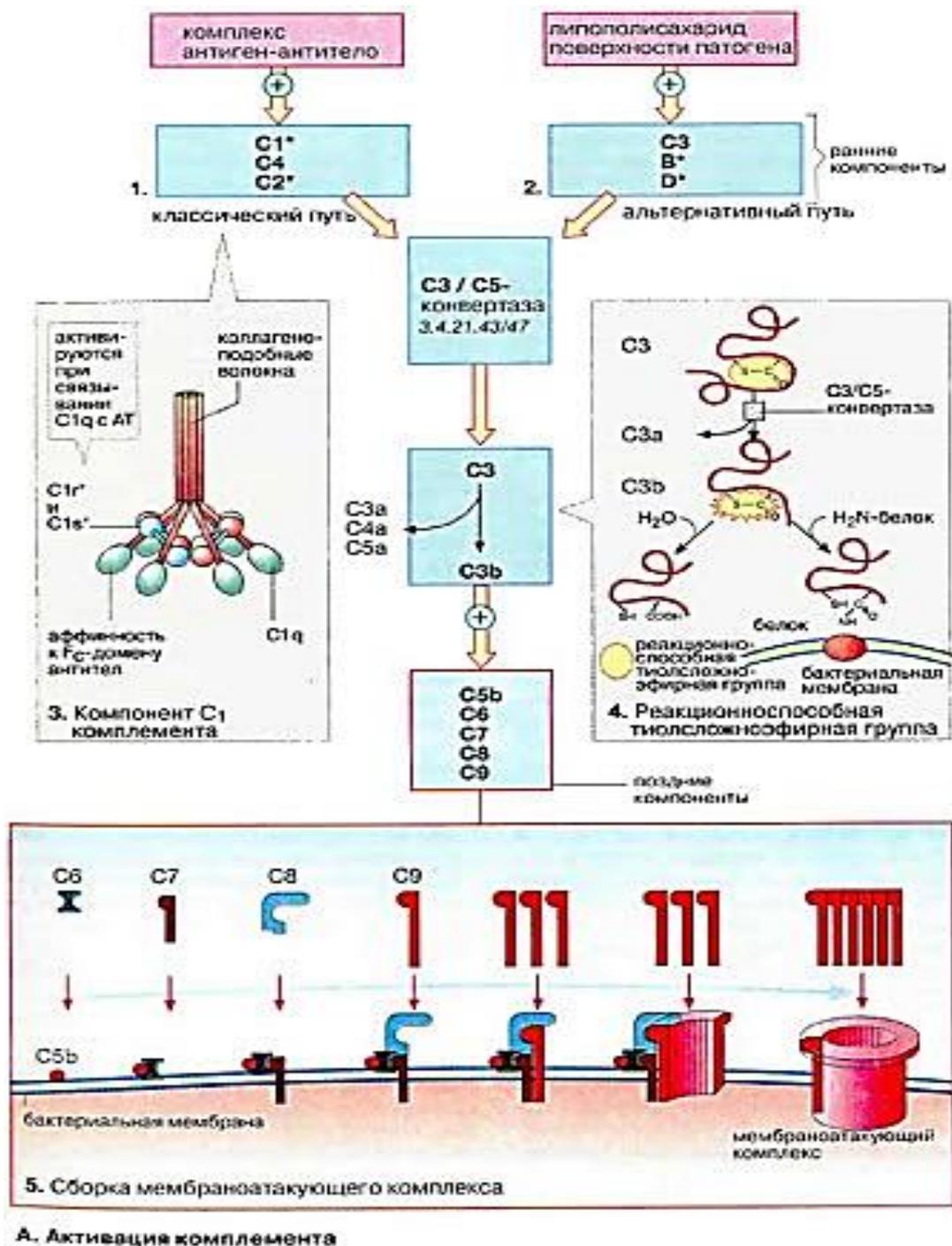


Рис. 14. Каскад активации системы комплемента

C1-ингибитор является ключевым белком регуляции активности системы комплемента. Он не только контролирует сборку C1, но и регулирует протеазы MASP, которые отвечают за запуск лектинового

пути активации комплемента. Кроме того, С1-ингибитор является одним из важнейших блокаторов калликрейна, плазмина, факторов XI, XII.

Это типичный острофазовый белок, который активно продуцируется в печени под влиянием провоспалительных цитокинов. Связано это с необходимостью контроля активации системы комплемента на фоне воспалительного процесса.

Дефекты продукции и функциональной активности этого белка приводят к формированию ангионевротического отека. Поскольку это состояние может формироваться на фоне нормальной концентрации С1-ингибитора и объясняться снижением его функциональной активности, важное значение приобретает не только оценка его концентрации в сыворотке, но и оценка его функции.

Также концентрация и функциональная активность С1-ингибитора может претерпевать изменения на фоне инфекции *Bordetella pertussis*. Возбудитель коклюша способен фиксировать С1-ингибитор, что объясняет устойчивость к литическому действию комплемента и формирование отечности тканей, характерной для данного заболевания.

2.8. Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов

Образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – естественный физиологический процесс, которым завершается гуморальный иммунный ответ. Однако избыточное накопление ЦИК в сыворотке периферической крови является одним из маркеров группы патологических состояний, «болезней иммунных комплексов», а также может быть патогенетическим фактором, играющим ключевую роль в развитии данных заболеваний.

Повышение уровня ЦИК отмечается при различных нозологиях, в развитии которых участвуют иммунопатологические реакции III типа (по Gell, Coombs): аутоиммунных, онкологических, аллергических, инфекционных.

Одной из ключевых характеристик, влияющих на элиминацию иммунного комплекса системой мононуклеарных фагоцитов, является его размер. Другой важнейший фактор, определяющий судьбу ЦИК в организме – изотип антитела, входящего в его состав. Оба эти фактора

в конечном итоге влияют на процесс взаимодействия комплексов с системой комплемента и Fc-рецепторами, а значит, и на процесс элиминации.

В связи с этим, для оценки концентрации ЦИК в сыворотке периферической крови применяют методы, позволяющие определить размеры комплексов, а также компоненты, входящих в их состав. Это метод преципитации в полиэтиленгликоле, радиальная иммунодиффузия и анализ клеточных линий, например, на клетках линии Raji. Не существует единого метода, позволяющего с высокой точностью определять все типы ЦИК. Поэтому для исследования этого показателя рекомендуется прибегать к разным методам определения параллельно.

Согласно рекомендациям ВОЗ, необходимым этапом в оценке ЦИК является определение иммунного компонента, входящего в его состав (WHO Scientific Group, 1977). С данной целью применяются методы ИФА.

C1q (субкомпонент C1 компонента системы комплемента) – ключевой фактор, инициирующий активацию системы комплемента по классическому пути. Он взаимодействует (рис. 15) с иммунными комплексами, содержащими антитела IgG (2 молекулы) или IgM (в этом случае достаточно одной молекулы, но, по крайней мере, два активных центра должны прореагировать с антигеном).

Со свободными формами иммуноглобулинов C1q связывается очень слабо. Так, константа связывания C1q со свободным IgG меньше на четыре порядка по сравнению с константой связывания C1q с агрегированным IgG или IgG в составе ИК.

Поскольку C1q связывает большинство типов ЦИК, то на принципе взаимодействия C1q с иммуноглобулинами базируется определение иммунных комплексов методом ИФА.

Еще один подход, позволяющий оценить содержание ЦИК - определение иммунных комплексов (IgG), связанных с фактором C3d методом ИФА. В то время, как оценка C1q характеризует активацию комплемента по классическому пути, выявление ЦИК, связанных с C3d, может указывать на активацию комплемента как по классическому, так и по альтернативному путям.

Для определения величины иммунных комплексов возможно применение ряда методов: хроматографические, светорассеяния, седиментационные, микроскопические и т.д.

Пожалуй, наибольшее распространение в клинической практике получил способ определения ЦИК в сыворотке крови преципитацией

их 3,5% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ)-6000. Изменение мутности раствора регистрируют спектрофотометрически. Считается, что 3,5% ПЭГ-6000 флокулирует наиболее распространенные «промежуточные» иммунные комплексы. Однако, метод недостаточно информативен, поэтому в настоящее время более перспективным методом оценки размеров ЦИК считается метод турбодиметрии, позволяющий оценить преципитацию иммунных комплексов полиэтиленгликолем 3% и 4%. Таким образом, эта методика дает возможность не только определить концентрацию иммунных комплексов, но и дифференцировать их по размерам.

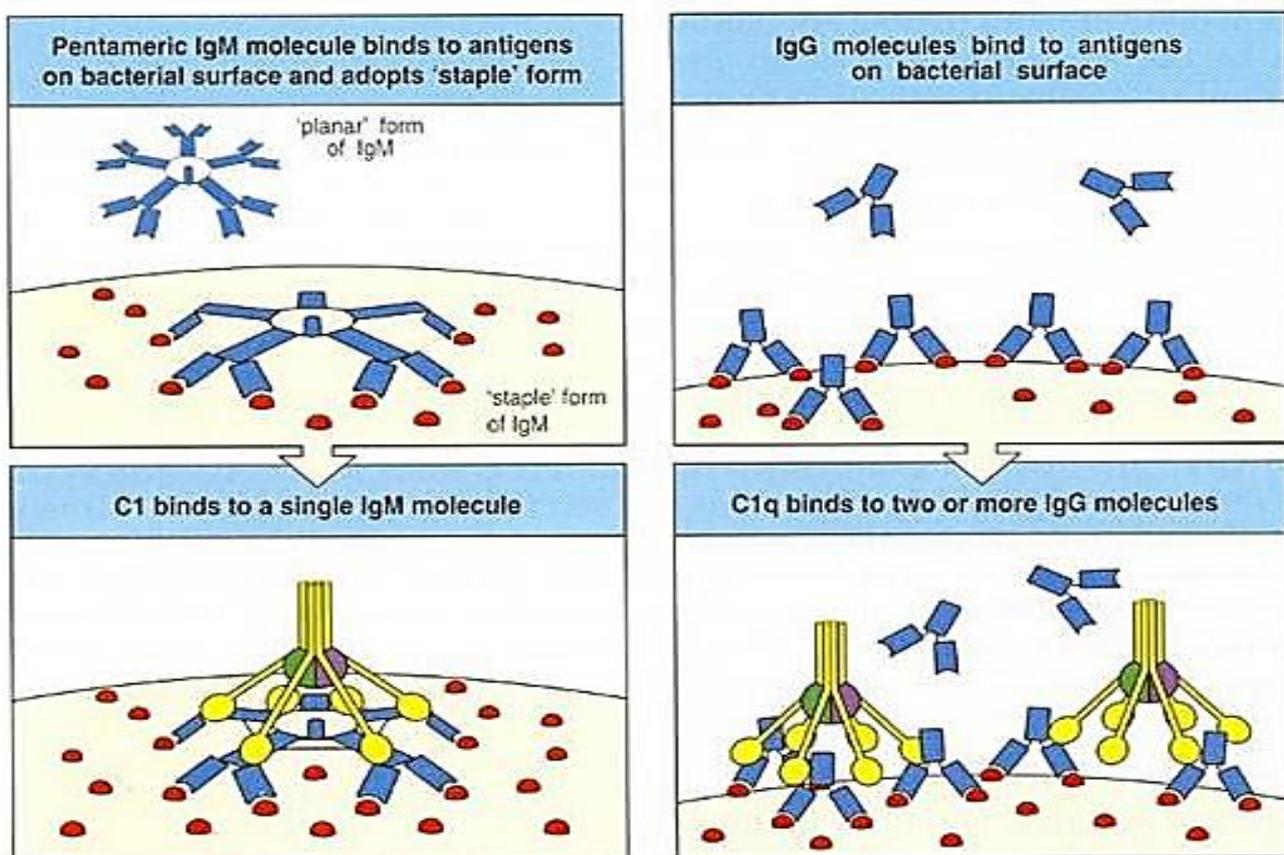


Рис. 15. Образование комплекса антител с компонентом комплемента C1q

Недостатком этого способа являются преципитация липопротеинов низкой и очень низкой плотности вместе с ЦИК, противоречивость результатов при тяжелых аутоиммунных заболеваниях, недостаточная точность.

Таким образом, поскольку все перечисленных методы имеют ограничения, то в соответствии с рекомендациями по исследованиям в рамках ВОЗ (Lambert P.H. и др., 1978), для измерения концентрации ЦИК следует использовать два независимых метода.

Уровень ЦИК дает определенное представление об активности иммунного воспаления и эффективности проводимой терапии. Повышение уровня ЦИК наблюдается при диффузных болезнях соединительной ткани, системных васкулитах, подостром инфекционном эндокардите, ВИЧ-инфекции, болезни Крона, аутоиммунном гепатите и др. У больных ревматоидным артритом увеличение содержания ЦИК свидетельствует о развитии системного ревматического процесса. При анализе результатов, полученных в процессе определения ЦИК следует учитывать, что клиническое значение имеют только кратное (в 2 раза и более) повышение их содержания.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Каков современный подход к оценке концентрации ЦИК?
2. Какие ключевые методы применяются для оценки ЦИК?
3. Какие методы используются для оценки системы комплемента?

2.9. Методы оценки фагоцитоза

Фагоцитоз – процесс поглощения корпускулярных структур диаметром более 0,5 мкм.

Выделяют несколько стадий фагоцитоза:

1. Хемотаксис – направленное движение фагоцита по градиенту концентрации хемоаттрактантов.
2. Адгезия – распознавание объекта фагоцитоза и установление контакта с ним.
3. Поглощение объекта с формированием фагосомы.
4. Формирование фаголизосомы и респираторный взрыв.
5. Деградация объекта фагоцитоза.
6. Экзоцитоз продуктов деградации.
7. Удаление апоптотических телец макрофагами.

В настоящее время в условиях лаборатории возможно оценить все стадии фагоцитарного процесса, а также цитокины, оказывающие непосредственно влияние на реализацию фагоцитоза.

Оценка хемотаксиса лейкоцитов

Оценка хемотаксиса возможна двумя способами.

Камера Бойдена

Камера Бойдена представляет собой емкость, разделенную на 2 части при помощи полупроницаемой мембраны (рис. 16). В зависимости

от исследуемых клеток диаметр пор мембраны должен составлять от 3 до 8 мкм. В одну часть камеры помещают взвесь клеток, в другую – хемоаттрактант. Под влиянием хемоаттрактанта клетки начинают миграцию и фиксируются в полупроницаемой мембране, которая затем окрашивается и микроскопируется. На этом принципе основана также методика оценки хемотаксиса в трансвелл-планшетах.

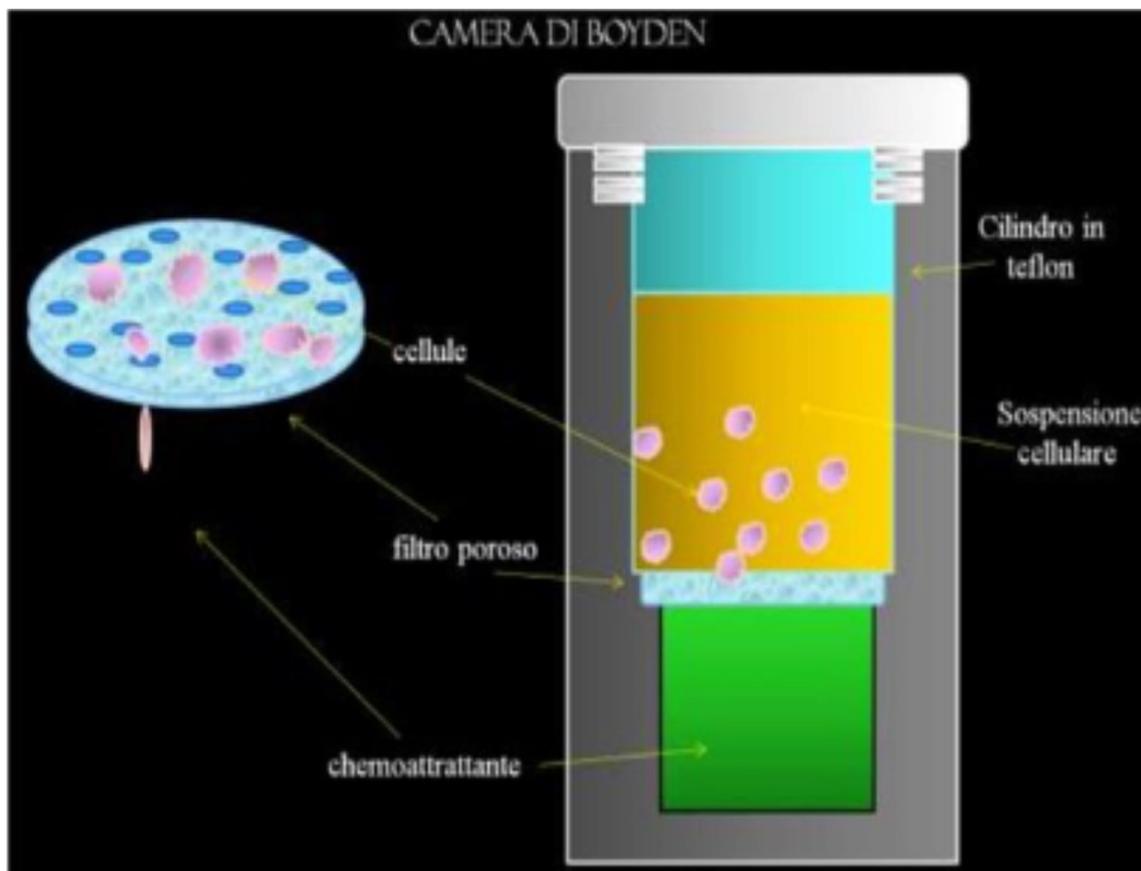


Рис. 16. Принципиальная схема устройства камеры Бойдена

Миграция под агарозой

В этом случае миграция клеток осуществляется в микропространстве между слоем агарозы и поверхностью, на который она нанесена. Для этого в стерильные чашки Петри наливают агарозу и формируют слой в 3 мм. Затем пробойником наносят 3 ряда отверстий. В средний ряд помещают суспензию клеток. В любой крайний ряд – среду RPMI (для оценки спонтанной двигательной активности клеток), в другой крайний ряд – хемоаттрактант. Чашки инкубируют при 37 °С в течение 90 минут. Результат реакции фиксируют формалином. После этого формалин и слой агарозы удаляют, чашки промывают бидистиллированной водой, высушивают на воздухе и окрашивают по Романов-

скому–Гимзе. При помощи микроскопа с окуляром-микрометром оценивают длину пробега клеток по направлению к среде и хемоаттрактанту. Вычисляют индекс миграции, который представляет собой отношение пробега клеток в сторону хемоаттрактанта к пробегу в сторону среды.

Клиническое значение оценки хемотаксиса: нарушения процесса хемотаксиса наблюдаются как при первичных (тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, LAD-синдром, гипер-IgE-синдром), так и у людей с вторичными иммунокомпromетациями, например, у пациентов с хроническими вирусными инфекциями.

Оценка механизмов биоцидности фагоцитов

НСТ-тест (тест восстановления нитросинего тетразолия)

Тест основан на восстановлении нитросинего тетразолия в нерастворимый диформаза, который откладывается в виде гранул сине-фиолетового цвета в цитоплазме и на поверхности фагоцита (рис 17). Отложение диформаза происходит под влиянием супер-оксид аниона, образующегося в реакциях «кислородного взрыва» в результате активации фермента НАДФ-Н – оксидазы. Считается, что количество и размер глыбок диформаза отражает активность работы этого фермента. Таким образом, НСТ-тест характеризует степень активность кислород-зависимых механизмов биоцидности фагоцитов.

Для проведения теста кровь пациента инкубируют с зимозаном или фосфатным буфером и НСТ. После этого готовят мазки, фиксируют мазки метанолом, высушивают и докрашивают метиловым зеленым. Затем готовые мазки микроскопируют, оценивают количество и степень отложения в нейтрофилах гранул диформаза на 100 клеток. Доля НСТ-положительных нейтрофилов в норме составляет до 10% в условиях спонтанного теста. При активации доля таких клеток должна увеличиваться в несколько раз.

Оценку активных форм кислорода (АФК) можно проводить и при помощи проточной цитометрии. В этом случае используют флуоресцентные красители. Дихлорофлуоресцеина ацетат, например, изначально не флуоресцирующий краситель, пассивно проникает в клетку. Внутри клетки при помощи эстераз происходит отщепление ацетильных групп, что препятствует обратной диффузии красителя из клетки. Под влиянием перекиси водорода происходит образование флуоресцирующего соединения, что позволяет анализировать клетки по интенсивности свечения красителя.

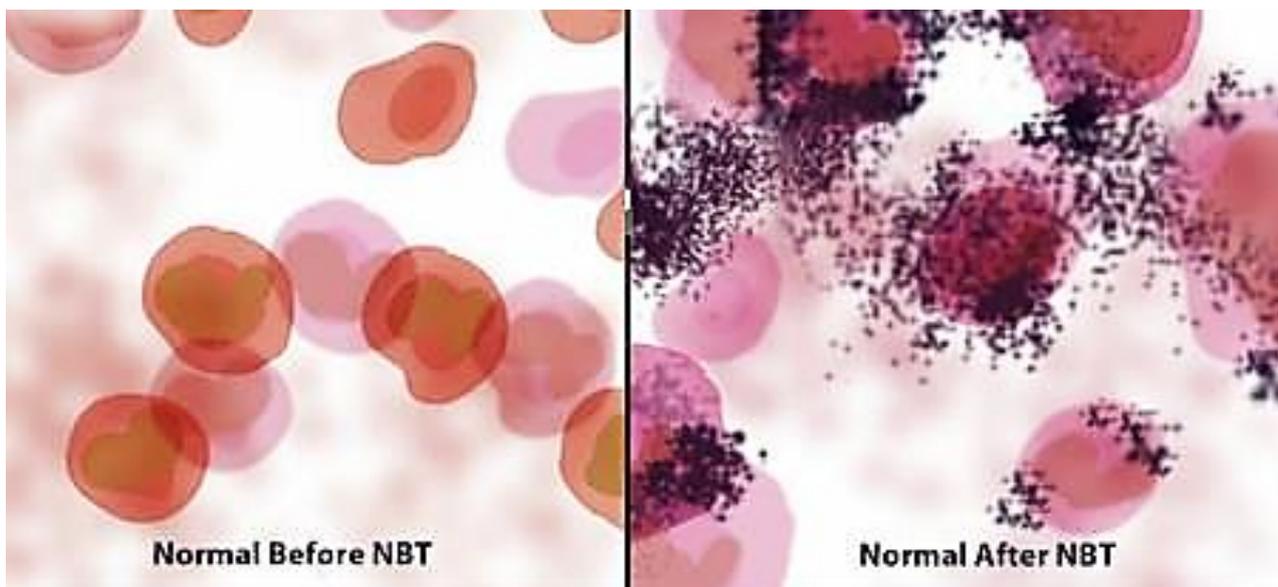


Рис. 17. Результат НСТ-теста

Клиническое значение: увеличение показателей НСТ-теста наблюдается при бактериальных инфекциях, в связи с чем этот метод исследования может играть важную роль в дифференциальной диагностике. Также, поскольку активация НСТ-теста предшествует клинической реализации бактериальных осложнений в послеоперационном периоде, метод может являться надежным прогностическим инструментом.

Снижение образования АФК характерно для ряда иммунодефицитных состояний, например, для хронической грануломатозной болезни.

Лизосомально-катионный тест

Характеризует активность кислород-независимых механизмов биоцидности фагоцитов. В ходе этого теста выявляют неферментные лизосомальные катионные белки при помощи цитохимического метода.

В ходе исследования готовят тонкий мазок биологического материала (кровь, костный мозг, раневое отделяемое). Мазки высушивают и фиксируют в смеси формалина и этанола. Затем производят окраску спиртовым раствором прочного зеленого и водным раствором азура А. Окрашенные препараты микроскопируют и подсчитывают 100 гранулоцитов. Лизосомы гранулоцитов и убитые бактерии окрашиваются в ярко-зеленый цвет, ядра и жизнеспособные бактерии – в синий.

Внутриклеточное содержание катионных белков оценивают при помощи средне-количественного коэффициента, который в норме составляет в детей около 1,9, а у взрослых – от 1,5 до 1,7.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов основывается на поглощении и разрушении тестового микроорганизма (например, *S. aureus* или *E. coli*) или синтетических частиц (латекс, зимозан).

Гепаринизированную капиллярную кровь помещают в 2 центрифужные пробирки и добавляют суточную взвесь микробов. Смесь инкубируют при 37 °С (в первой пробирке в течение 30 мин, во второй – в течение 120 мин). Затем пробирки центрифугируют, из осадков готовят мазки, высушивают, фиксируют и окрашивают по Романовскому–Гимзе. Затем проводят оценку под иммерсионным микроскопом.

Неразрушенные микробы хорошо дифференцируются по четким контурам и темно-фиолетовому цвету. Убитые микробы окрашены в розовый цвет и имеют меньшие размеры.

Производят подсчет 100 лейкоцитов, оценивают процент фагоцитировавших клеток и общее число поглощенных микробов. При этом оценивают следующие показатели:

- процент фагоцитоза (процент фагоцитирующих нейтрофилов): это количество фагоцитировавших нейтрофилов на 100 клеток. В норме у взрослых составляет 60–95%, у детей – 30–65%;
- фагоцитарное число (среднее число поглощенных микробов): число поглощенных микробов, разделенное на 100. В норме составляет 4,5–7,5;
- показатель завершенности фагоцитоза: отношение количества переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов, выраженное в процентах. В норме составляет 64–72%;
- индекс завершенности фагоцитоза: это соотношение микробов, поглощенных через 30 мин и 120 мин. В норме через 30 мин фагоцит начинает переваривать поглощенные объекты. Этот процесс заканчивается в течение 2 ч. Поэтому при завершенном фагоцитозе количество микробов в фагоците через 30 мин будет больше, чем через 120 мин. А это значит, что в норме индекс завершенности фагоцитоза будет больше 1.

Если же этот показатель меньше 1, то мы можем говорить о сниженной переваривающей функции фагоцитов.

Кроме указанных показателей мы можем оценить абсолютный фагоцитарный показатель (фагоцитарную емкость крови) – количество микробов, которое могут поглотить фагоциты, содержащиеся в 1 литре крови.

В настоящее время оценка фагоцитарной активности фагоцитов производится также с использованием метода проточной цитометрии. В этом случае тестовый микроорганизм метится различными метками. Наиболее широкое применение нашла FITC-метка (флюоресцеинаизотиоционат). Некоторые микроорганизмы, например микобактерии, которые невозможно пометить данной меткой, метятся метаболитическими красителями (люциферин, флюоресцеина гидразин и т.п.).

Метод применяется в комплексной диагностике первичных и вторичных иммунодефицитов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Каково клиническое значение НСТ-теста?
2. Какие стадии фагоцитоза и при помощи каких методов можно оценить в лабораторных условиях?

2.10. Оценка системы цитокинов

Цитокины – регуляторные молекулы, играющие ключевую роль в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета. Как правило, они представляют собой гликозилированные пептиды. Они вырабатываются клетками в ответ на стимуляцию. Выделение цитокинов, таким образом, является достаточно кратковременным событием. Они не депонируются и продуцируются в крайне низких концентрациях. Цитокины проявляют, как правило, аутокринный и паракринный эффекты. Лишь для некоторых из них (IL1, IL6, TNF α) свойственен эндокринный механизм действия, который проявляется при тяжелых воспалительных процессах.

Цитокины обладают плеiotропным действием, то есть способны дублировать эффекты друг друга. Кроме того, одномоментно в тканях *in vivo* происходит выделение нескольких цитокинов, которые способны модифицировать биологические эффекты друг друга (рис. 18). Эти факторы усложняют оценку системы цитокинов.

В настоящее время имеется ряд наиболее актуальных направлений оценки цитокинопродукции: количественное определение цитокинов в тканях и биологических жидкостях; исследование генов цитокинов; биологическое тестирование.

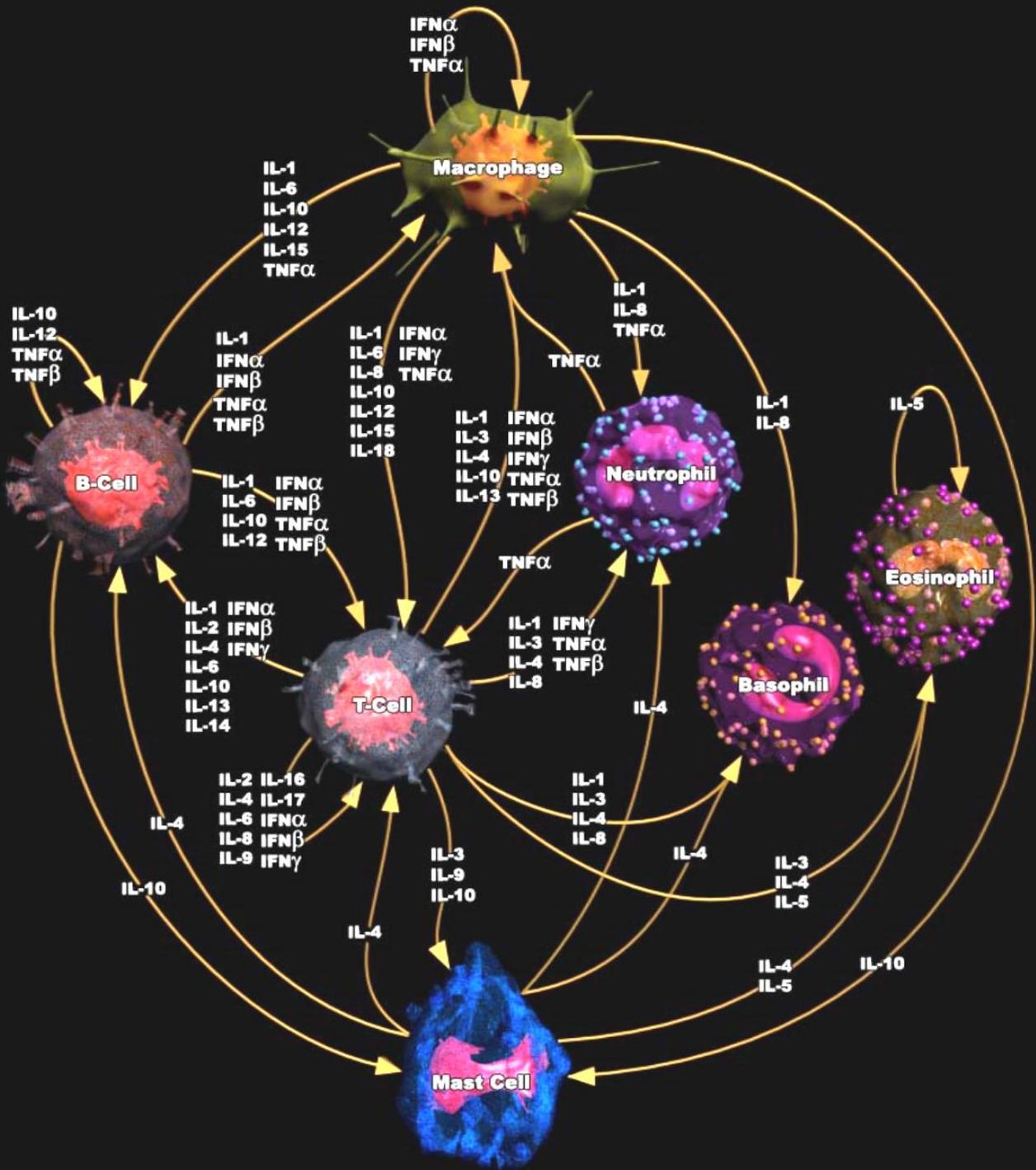


Рис. 18. Цитокиновая сеть

Количественное определение цитокинов в тканях и биологических жидкостях

Как правило осуществляется при помощи иммунохимических методов. При этом уровень цитокинов определяет текущее, актуальное на момент исследования, состояние иммунной системы пациента. Спонтанная продукция цитокина показывает, что клетка уже активирована. Возможно оценить и функциональный резерв клетки-продукта по способности усиливать выделение цитокина в ответ на различного рода стимуляцию (антигенную, митогенную). Этот метод применяется и для оценки соотношения клеточных субпопуляций Th в образцах пациента по профилю выявляемых в исследуемых образцах цитокинов. Все эти данные позволяют оценить вклад иммунокомпетентных клеток в развитие того или иного патологического процесса, функциональный резерв клеток иммунной системы, оценить тяжесть воспалительного процесса, его прогноз, что является крайне важным как с точки зрения академической науки, так и в реальной клинической практике.

Выделяют следующие иммунохимические методы, применяемые для оценки цитокинов и актуальные в настоящее время:

1. Иммуноферментный анализ.
2. Радиоиммунный анализ.
3. Иммуногистохимия (позволяет исследовать наличие цитокинов в тканях).
4. ELISPOT (позволяет оценить продукцию цитокинов конкретными клетками).
5. Цитофлюориметрия (для оценки цитокинов, находящихся на мембране клеток и в цитозоле, а также мембранных рецепторов к цитокинам).

Несмотря на широкое распространение, которое получили данные методы исследования, они не лишены ряда ограничений. Так, серьезное внимание с целью исключения искажения результатов следует уделять преаналитическому этапу забора клинического материала. Важнейшее значение имеет также и хранение образцов, в частности, известно, что повторное замораживание и размораживание негативно сказывается на результатах исследований. Это связано как с протеолитическим расщеплением цитокинов, так и с возможным выделением дополнительных цитокинов тромбоцитами при длительном хранении образцов без центрифугирования.

Исследование генов цитокинов

Проводится при помощи ПЦР-РТ. При помощи этого метода можно оценить не только уровень экспрессии генов конкретных цитокинов, но также составить представление о наличии аллельных вариантов генов у конкретного пациента. Так, была показана ассоциация полиморфизма генов IL1 α и IL1 β с риском развития рака легкого, а также с тяжестью болевого синдрома. А некоторые аллели гена, кодирующего TNF, связаны с повышенным синтезом TNF α и агрессивными формами неходжкинских лимфом.

При помощи этого метода также возможно оценить экспрессию генов рецепторов цитокинов, а также сигнальных молекул.

Биологическое тестирование

Проводят для исследования содержания того или иного цитокина в образцах пациента, основываясь на знаниях о биологических эффектах этого цитокина на клетки-мишени. Так, например, колониестимулирующие факторы оценивают по их способности поддерживать пролиферацию в агаре костномозговых предшественников. Созданы клеточные линии, рост которых зависит от наличия в среде определенных цитокинов. Так, для исследования IL2 применяют мышинные цитотоксические лимфоциты. Для оценки биологического действия хемокинов используют методы исследования хемотаксиса, например, метод оценки в камере Бойдена.

Стандартизация обеспечивается сравнением биологического действия изучаемого цитокина с международными стандартными образцами, выпускаемыми Международной лабораторией биологических стандартов ВОЗ в Национальном институте биологической стандартизации и контроля (Великобритания).

Необходимо отметить, что метод биологического тестирования имеет ряд ограничений. В условиях *in vivo* в образцах присутствует не один цитокин, а некая совокупность. При этом, цитокины могут обладать как синергичным, так и антагонистическим действием в отношении друг друга. Кроме того, в естественных условиях в образцах могут присутствовать молекулы растворимых рецепторов и ингибиторов конкретного цитокина. Поэтому данный метод применяется в основном для оценки рекомбинантных цитокинов в заданных условиях.

2.11. Интерфероновый статус

У человека выделяют 3 основных типа интерферонов (IFN). Для клинического иммунолога интерес представляют IFN α и IFN β , относящиеся к 1 типу, а также IFN γ – представитель интерферонов 2 типа. Основная функция интерферонов – это распознавание и деградация чужеродных нуклеиновых кислот. Система интерферонов является одним из компонентов врожденного иммунитета и обеспечивает раннюю защиту от антигена. В норме все типы интерферонов синтезируются в строго пропорциональной зависимости. В лабораторной практике оценка концентрации интерферонов и их продукции получила название «интерфероновый статус».

В исследование входит оценка следующих показателей:

- концентрации сывороточного интерферона;
- спонтанной продукции IFN *in vitro* при отсутствии какой-либо дополнительной индукции;
- индуцированный синтез IFN α под влиянием эталонного стимулятора – вируса болезни Ньюкасла. Таким образом, моделируется синтез IFN α лейкоцитами крови пациента в ответ на вирусную инфекцию;
- индуцированный синтез IFN γ под влиянием эталонного стимулятора продукции – митогена Фитогемагглютинаина. Введение ФГА моделирует ответный синтез IFN γ лейкоцитами пациента в ответ на антигенную стимуляцию.

У здоровых людей концентрация сывороточного интерферона не высока. Однако показатели индуцированной продукции интерферонов характеризуются высокими значениями.

Изменения показателей интерферонового статуса могут выражаться в:

- повышении уровня циркулирующего интерферона и снижении уровня индуцируемой продукции альфа- и гамма-интерферонов лейкоцитами. Такая ситуация характерна для острого периода заболевания, например, острой вирусной инфекции;
- снижении продукции лейкоцитами крови IFN α и IFN γ на фоне низкой концентрации IFN в циркуляции характерно для длительно текущей вирусной или другой внутриклеточной инфекции;
- снижении продукции IFN α , что более характерно для аутоиммунной патологии.

Выделяют 4 степени снижения стимулированной продукции IFN α и IFN γ относительно нормальных значений:

1 степень – 2–4 кратное снижение продукции цитокинов по сравнению с нижней границей физиологической нормы;

2 степень – 4–8 кратное снижение;

3 степень – 8–16 кратное снижение;

4 степень – 16 и более кратное снижение.

Кроме оценки показателей интерферонового статуса в лабораторных условиях можно оценить интерферонопродукцию лейкоцитами периферической крови в ответ на различные лекарственные препараты, например, индукторы интерферонов, низкомолекулярные и высокомолекулярные синтетические иммуномодуляторы.

Индивидуальная чувствительность к препаратам исследуется по эффективности корректирующего действия препарата (коэффициент коррекции) на исходно сниженную продукцию IFN γ лейкоцитами крови.

В зависимости от значений коэффициента коррекции различают 5 вариантов индивидуальной чувствительности к иммуноактивным препаратам:

- 2 – слабая: увеличение продукции IFN γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 2 раза;
- 4 – выраженная: увеличение продукции IFN γ в 4 раза;
- больше 4 – сильно выраженная: увеличение продукции IFN γ более чем в 4 раза;
- 1 – отсутствие чувствительности: увеличение продукции IFN γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной не определяется;
- менее 1 – иммунотоксичность: подавление продукции IFN γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Опишите варианты изменения интерферонового статуса.
2. Охарактеризуйте клиническое значение исследования продукции интерферонов иммунокомпетентными клетками пациента.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ к разделам 2.5.–2.11.

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. МИТОГЕН, ПРЕИМУЩЕСТВЕННО СТИМУЛИРУЮЩИЙ ЗРЕЛЫЕ Т-КЛЕТКИ
 - 1) конканавалин А
 - 2) фитогемагглютинин
 - 3) бактериальные липополисахариды
 - 4) все перечисленное верно

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РБТЛ
 - 1) многократное копирование ДНК, имеющейся в образце
 - 2) бластная трансформация лимфоцита под влиянием митогена или антигена
 - 3) восстановление нитросинего тетразолия под влиянием активных форм кислорода

3. ТИП ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ПО GELL, SOOMBS, КОТОРЫЙ МОЖНО ДИАГНОСТИРОВАТЬ ПРИ ПОМОЩИ РБТЛ
 - 1) атопический
 - 2) цитотоксический
 - 3) иммунокомплексный
 - 4) клеточно-опосредованный

4. НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ СПОНТАННОЙ РБТЛ
 - 1) до 10%
 - 2) 10–20%
 - 3) 20–40%
 - 4) 40–75%

5. ПРИНЦИП МЕТОДА ПЦР
 - 1) многократное копирование ДНК, имеющейся в образце
 - 2) бластная трансформация лимфоцита под влиянием митогена или антигена
 - 3) восстановление нитросинего тетразолия под влиянием активных форм кислорода

6. ВЫДЕЛИТЕ ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ПЦР
 - 1) требуется малое количество биологического материала для анализа

- 2) можно использовать биологический материал, который был подвергнут дезинфекции
- 3) высокая чувствительность и специфичность
- 4) все выше перечисленное

7. УКАЖИТЕ МЕТОД, ПРИМЕНЯЮЩИЙСЯ ДЛЯ СКРИННИНГА ТЯЖЕЛЫХ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ, НАЧИНАЯ С ПЕРИОДА НОВОРОЖДЕННОСТИ

- 1) РБТЛ
- 2) определение ТРЕС, КРЕС методом ПЦР
- 3) определение цитокинов методом ИФА

8. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ОБРАЗЦАХ, ПОДВЕРГШИХСЯ ДЛИТЕЛЬНОМУ ХРАНЕНИЮ ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

- 1) РБТЛ
- 2) ПЦР
- 3) ELISPOT
- 4) проточная цитометрия

9. КЛЮЧЕВЫЕ ПАРАМЕТРЫ, КОТОРЫЕ ОЦЕНИВАЮТ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

- 1) размер ЦИК
- 2) концентрация ЦИК
- 3) концентрация изотипов антител в сыворотке крови

10. ВЫБЕРИТЕ, КАКИЕ БЕЛКИ КОМПЛЕМЕНТА ЦЕЛЕСООБРАЗНО ОЦЕНИВАТЬ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИК

- 1) C1q
- 2) C3d
- 3) C4b
- 4) C5

11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИК, КОТОРЫЕ ОКАЗЫВАЮТ КЛЮЧЕВОЕ ВЛИЯНИЕ НА ПРОЦЕСС ИХ ЭЛИМИНАЦИИ

- 1) изотип иммуноглобулина, входящий в состав ЦИК
- 2) пространственная конфигурация

- 3) величина иммунного комплекса
- 4) соотношение антигена и антитела в составе ЦИК

12. ОХАРАКТЕРИЗУЙТЕ ФАГОЦИТАРНОЕ ЧИСЛО

- 1) это количество фагоцитировавших нейтрофилов на 100 клеток
- 2) это среднее количество микробов, поглощенных фагоцитом
- 3) это соотношение количества поглощенных и переваренных микробов
- 4) это соотношение поглощенных фагоцитом микробов через 30 и 120 мин

13. ВЫБЕРИТЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДЕКСА ЗАВЕРШЕННОСТИ ФАГОЦИТОЗА

- 1) это количество фагоцитировавших нейтрофилов на 100 клеток
- 2) это среднее количество микробов, поглощенных фагоцитов
- 3) это соотношение количества поглощенных и переваренных микробов
- 4) это соотношение поглощенных фагоцитом микробов через 30 и 120 мин

14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЮ ЗАВЕРШЕННОСТИ ФАГОЦИТОЗА

- 1) это количество фагоцитировавших нейтрофилов на 100 клеток
- 2) это среднее количество микробов, поглощенных фагоцитов
- 3) это соотношение количества поглощенных и переваренных микробов
- 4) это соотношение поглощенных фагоцитом микробов через 30 и 120 минут

15. МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЦИТОКИНОВ

- 1) иммуноферментный
- 2) ПЦР
- 3) радиоиммунный
- 4) ELISPOT

16. УКАЖИТЕ ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА БИОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМОГО ДЛЯ ОЦЕНКИ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ

- 1) наличие в образце нескольких цитокинов, модифицирующих эффекты друг друга
- 2) возможное наличие в образце рецепторов и ингибиторов к цитокину
- 3) необходимость наличия стандартизированных образцов цитокинов в лаборатории
- 4) все перечисленное

17. ВЫБЕРИТЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ

- 1) Real-time ПЦР
- 2) иммуноферментный
- 3) ELISPOT
- 4) РБТЛ

18. УКАЖИТЕ ЭТАЛОННЫЙ СТИМУЛЯТОР ПРОДУКЦИИ $IFN\alpha$ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- 1) вирус Ньюкасла
- 2) ФГА
- 3) КонаА
- 4) среда RPMI

19. ЭТАЛОННЫЙ СТИМУЛЯТОР ПРОДУКЦИИ $IFN\gamma$ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

- 1) вирус Ньюкасла
- 2) ФГА
- 3) КонаА
- 4) среда RPMI

20. УКАЖИТЕ, ЧТО ВХОДИТ В ИССЛЕДОВАНИЕ «ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС»

- 1) оценка концентрации сывороточного интерферона
- 2) оценка спонтанной продукции интерферонов
- 3) оценка стимулированной эталонным активатором продукции IFN
- 4) все перечисленное

3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ В АЛЛЕРГОЛОГИИ

3.1. Определение общего IgE

Известно, что у здоровых людей концентрация IgE в сыворотке крови невелика. Она минимальна в пуповинной крови новорожденного ребенка, но постепенно увеличивается вплоть до достижения подросткового возраста. Затем, в течение жизни содержание IgE в периферической крови снижается.

Определение общего IgE стало возможным в 1967 г. и первоначально предполагалось, что при помощи этого метода можно будет достаточно просто выявлять пациентов с atopической аллергией. Однако достаточно быстро стало ясно, что высокая концентрация IgE в сыворотке может наблюдаться у пациентов с неаллергическими заболеваниями (бронхо-легочный аспергиллез, паразитозы, некоторые первичные иммунодефициты и т.д.). В то же время, у больных atopической аллергией уровень данных антител в крови может оставаться в пределах нормальных значений.

Однако значит ли это, что необходимо вовсе отказаться от определения общего IgE в сыворотке крови в повседневной клинической практике врача-аллерголога? Однозначно, нет. Существуют клинические ситуации, в которых необходима оценка данного показателя. Например, назначение больному atopическим аллергическим заболеванием иммунобиологической терапии. Как известно, препарат моноклональных антител к IgE омализумаб (Ксолар[®]) назначается только пациентам с определенным уровнем этого иммуноглобулина в крови.

Таким образом, становится ясно, что на передний план в контексте диагностики atopической аллергии выступает определение концентрации специфического IgE к структурам конкретного аллергена. На сегодняшний день возможно определение специфического IgE как к экстракту аллергена, так и к отдельным молекулам в его составе, то есть, к алергокомпонентам.

Несмотря на то, что на данный момент в мировой клинической практике приоритет отдается диагностике *in vivo*, обследование *in vitro* имеет ряд положительных моментов: нет возрастных ограничений, нет необходимости отменять лекарственные препараты, которые получает

пациент, для проведения обследования. Кроме того, мы можем проводить обследование на фоне обострения аллергического заболевания, а также на фоне любой имеющейся у пациента сопутствующей патологии.

Однако обследование в лаборатории имеет и ряд ограничений. О некоторых из них будет упомянуто в соответствующих разделах. Здесь же приведем основной аргумент: отрицательный анализ на наличие специфического IgE к экстракту аллергена или алергокомпоненту не говорит об отсутствии у пациента сенсibilизации к данному аллергену. Ярким примером этого факта является исследование, о результатах которого сообщает профессор, доктор медицинских наук, И.Н. Захарова. Из 170 детей (возраст обследованных составлял от 2-х до 11 мес.) с аллергией к белкам коровьего молока (БКМ), подтвержденной клинически при проведении двойного слепого нагрузочного теста, только у 61 ребенка (36%) были выявлены специфические IgE к БКМ.

Кроме того, всегда нужно помнить о латентной сенсibilизации. То есть ситуации, когда у пациента сформировалась сенсibilизация к какому-либо аллергену, но клинических проявлений при контакте с данным аллергеном у пациента нет.

Таким образом, при постановке диагноза atopического аллергического заболевания на первый план всегда выступает оценка клинической картины, дополняемая различными методами обследования, как общеклиническими, так и специфическими.

Что касается специфической диагностики atopической аллергии, то в этом случае врач может пойти двумя путями. Первый путь, который является предпочтительным согласно современным российским клиническим рекомендациям, состоит в том, что после сбора анамнеза и физикального обследования пациента проводятся кожные алергопробы. Затем, для уточнения спектра сенсibilизации при необходимости прибегают к определению специфического IgE к экстракту аллергена. В последнюю очередь по показаниям проводят алергокомпонентную диагностику. Недостатком этой тактики является то, что врач исходно использует для тестирования ограниченное количество аллергенов. Поэтому в ряде случаев не удастся адекватно оценить спектр сенсibilизации у данного конкретного пациента.

Возможен и противоположный подход, при котором изначально исследуется наличие у пациента сенсibilизации к широкому спектру аллергенов, и затем врач решает, какая сенсibilизация является клинически значимой для данного конкретного пациента. В этом случае

оценка сенсibilизации к отдельным аллергокомпонентам дает врачу ряд преимуществ для последующего принятия решений:

- выявление первичной сенсibilизации к мажорным аллергокомпонентам;
- оценка потенциального риска развития клинических проявлений на отдельный аллерген;
- выявление пациентов с потенциально тяжелым течением аллергического заболевания и высоким риском развития анафилактических реакций;
- выявление перекрестной сенсibilизации.

3.2. Определение специфических IgE к экстрактам аллергена

Для оценки концентрации специфического IgE к экстракту аллергена в сыворотке крови в лабораторных условиях применяется иммунофлюоресцентный анализ. Этот метод, представленный в настоящее время в большинстве лабораторий методикой ImmunoCap[®], является наиболее чувствительным и специфичным. Он позволяет определять минимальные концентрации специфического IgE в образцах пациента. Производители формируют так называемые аллергопанели, позволяющие оценить концентрацию специфических антител к определенному набору экстрактов аллергенов. Аллергопанели разрабатываются с учетом возраста пациентов, на которых ориентировано данное обследование, исследуемого спектра сенсibilизации, региона проживания.

Экстракты аллергенов представляют собой сложные смеси, содержащие в составе наряду с аллергенными белками неаллергенные белковые молекулы, а также балластные вещества. Поэтому для того, чтобы исключить ложноположительные результаты диагностики, повысить точность получаемых при обследовании результатов, была разработана аллергокомпонентная диагностика.

3.3. Определение специфических IgE к аллергокомпонентам

В условиях иммунологической лаборатории возможно определить специфический IgE как к основным, мажорным или истинным аллергокомпонентам, так и к минорным компонентам, так называемым пан-аллергенам (табл. 1).

Мажорные аллергокомпоненты – это такие молекулы в составе экстракта аллергена, к которым формируется специфический IgE у 50%

пациентов с сенсibilизацией на данные аллерген. Таким образом, мы можем определить наличие специфического IgE к так называемым «истинным» аллергенным молекулам, что будет свидетельствовать не только о наличии сенсibilизации, но и присутствии данного аллергена в среде нахождения пациента.

Кроме того, есть аллергенные молекулы, обеспечивающие так называемую «перекрестную» сенсibilизацию. Антитела, специфичные к таким алергокомпонентам, могут связываться с компонентами из других источников, схожих по структуре. Их еще называют пан-аллергены. Эти молекулы присутствуют во множестве аллергенных источников, поскольку они тесно связаны с ключевыми процессами жизнедеятельности клеток. На сегодняшний день идентифицировано несколько таких семейств, например, липокалины, профилины, молекулы суперсемейства PR-10 (рис. 19), сывороточные альбумины и т.д.

Большой интерес вызывают белки, входящие в суперсемейство PR-10. К этому семейству относится мажорный аллерген пыльцы березы, Betv1. Многие аллергенные источники имеют белковые молекулы, высоко гомологичные белку Betv1, поскольку они также относятся к семейству PR-10. А значит, пациент с сенсibilизацией на пыльцу березы будет реагировать и на эти антигены.

Чувствительность к полному аллергену, как правило, выше, чем к алергокомпонентам. Так, только у 70–80% пациентов с позитивной реакцией на экстракт тимофеевки выявлялись специфические IgE к одному из мажорных компонентов – *Phl p1*. Увеличение количества реагирующих до 90% было связано с присоединением сенсibilизации к другому мажорному аллергену – *Phl p5*.

Кроме того, не все алергокомпоненты доступны к диагностике. Так, применительно к клещу домашней пыли до недавнего времени были хорошо исследованы компоненты *Der p1*, *Der p2*, *Der p10*. Однако, только с выявлением еще одного мажорного компонента – *Der p23* у пациентов позитивных к экстракту аллергена, но негативных к указанным компонентам, картина стала ясна полностью, стали понятны расхождения результатов оценки сенсibilизации к экстракту аллергена и алергокомпонентам.

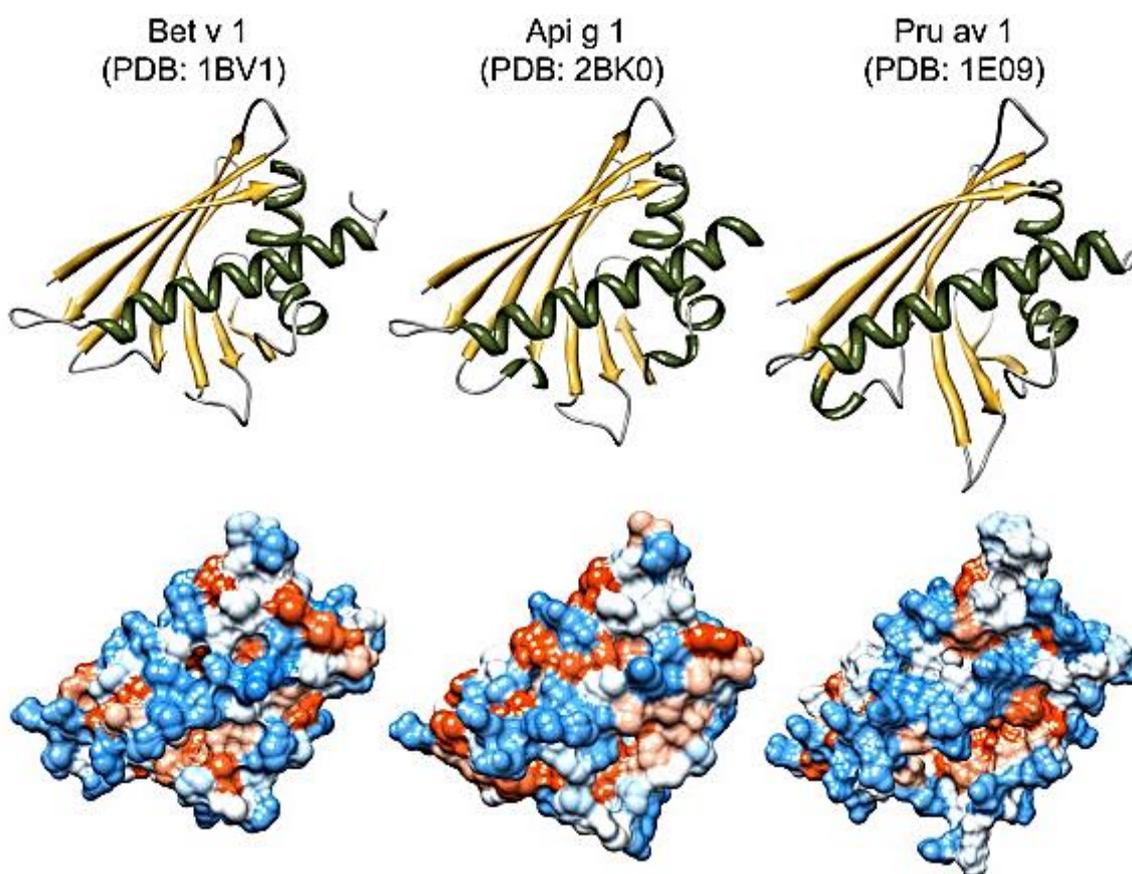


Рис. 19. Белки суперсемейства PR-10:
аллергокомпоненты пыльцы березы, сельдерея и персика

Итак, на примере оценки концентрации специфического IgE к тем или иным аллергокомпонентам пыльцы березы, мы можем принять решение о дальнейшей тактике ведения пациента. Например, о первичной сенсibilизации и эффективности аллергенной иммунотерапии будет говорить обнаружение антител к Betv1. Высокую вероятность наличия перекрестной реактивности можно предположить по выявлению IgE к *Bet v2*. А предсказать возможную реакцию на другие группы аллергенов, например, аллергены пищи, можно по обнаружению специфических IgE к *Bet v4*.

Аллергены могут быть разделены в зависимости от чувствительности к нагреванию и действию пищеварительных ферментов на 2 группы. Термостабильные аллергены (такие, как казеин – белок коровьего молока) не изменяют свою структуру при нагревании и способны сохранять свои антигенные свойства после воздействия пищеварительных ферментов. Такие белки, как правило, будут вызывать тяжелые аллергические реакции. А вот термолабильные (например, такие как *Mal d1* – аллерген яблока) при термической обработке теряют

свои антигенные свойства, а значит, будут вызывать достаточно мягкие клинические проявления или не вызывать их вовсе. Кроме того, пациенты с сенсibilизацией именно к таким алергокомпонентам чаще формируют толерантность к причинно-значимому алергену по сравнению с больными, у которых выявляется сенсibilизация к термостабильным, устойчивым к пищеварению компонентам.

Таким образом, алергокомпонентная диагностика может применяться:

1. Для прогноза тяжести алергических реакций. Так, если у пациента выявлена сенсibilизация к термостабильному алергокомпоненту, устойчивому к действию пищеварительных ферментов, риск развития тяжелых алергических реакций возрастает. Если же сенсibilизация сформирована к алергокомпоненту, иммуногенность которого изменяется при нагревании и воздействии пищеварительных ферментов, то более вероятны достаточно легкие клинические проявления с возможностью формирования в последующем толерантности.

2. Для оценки формирования толерантности к алергену. С этой целью необходимо динамическое определение специфического IgE к клинически значимому алергену. Особенно актуальна эта информация для подбора элиминационной диеты и ее дальнейшей коррекции. Так, значимое снижение концентрации специфического IgE к алергокомпоненту говорит нам о формировании толерантности организма пациента к алергену и возможности попытаться ввести ранее исключенный из диеты пищевой продукт в рацион питания.

3. Подбор алергена и прогноз эффективности алергенной иммунотерапии. Так, АИТ будет эффективна, если проводить ее алергеном, для которого выявлена сенсibilизация к мажорному компоненту. Например, лечение алергеном пыльцы березы будет успешным, если у пациента обнаружен специфический IgE к компоненту *Bet v1*. В то же время, выявление сенсibilизации к *Bet v4* будет свидетельствовать о наличии перекрестной реактивности к пыльце березы. В этом случае проведение АИТ с данным алергеном будет не целесообразно.

4. Оценка локальной сенсibilизации. В настоящее время большое внимание уделяется диагностике локального алергического воспаления. Так, профессором Leonardi et al. было показано наличие специфического IgE в слезе на фоне алергического конъюнктивита. В то время как сенсibilизация на системном уровне, в сыворотке периферической крови, не выявлялась. Это стало возможным благодаря высокой

чувствительности метода. Также, профессор R. Valenta обнаружил наличие специфического IgE к различным аллергенам в грудном молоке.

Было показано, что перекрестная реактивность может также быть обусловлена реакцией на CCD – перекрестно реагирующие углеводные детерминанты. Такими перекрестными реакциями можно объяснить несовпадение результатов тестов с аллергокомпонентами и экстрактами аллергенов.

Кроме того, необходимо учитывать географическое положение пациента в момент исследования. Так, выявленная сенсibilизация к мажорному компоненту оливы *Ole e1* говорит нам о наличии первичной сенсibilизации к пыльце оливы при условии проживания больного на юге Испании, тогда как сенсibilизация к этому же аллергокомпоненту, выявленная у пациента, проживающего на севере Франции, может свидетельствовать о сенсibilизации к ясеню.

Таблица 1

Классификация аллергокомпонентов по принадлежности к белковым семействам (автор С.Н. Андреева)

Белковое семейство	Аллергокомпоненты	Свойства
<i>nsLTP</i> (неспецифические липид-переносящие белки)	<i>Ara h9</i> (арахис) <i>Cor a1</i> (фундук) <i>Pru p3</i> (персик) <i>Art v3</i> (полынь)	Термостабильны. Часто ассоциированы с тяжелыми системными реакциями, с аллергическими реакциями на фрукты и овощи (кроме персика).
<i>Storage proteins</i> (белки запаса)	<i>Ara h1, Ara h2, Ara h3, Ara h6, Ara h7</i> (арахис) <i>Cor a9</i> (фундук) <i>Gly m5, Gly m6</i> (соя) <i>Tri a19</i> (пшеница)	Присутствуют в семенах и орехах. Термостабильны. Служат питательными веществами для роста растений
<i>PR-10</i> (pathogenesis related proteins – патоген-связанные белки)	<i>Bet v1</i> (береза) <i>Ara h8</i> (арахис) <i>Gly m4</i> (соя) <i>Cor a1</i> (фундук) <i>Pru p1</i> (персик) <i>Api g1</i> (сельдерей) <i>Mal d1</i> (яблоко) <i>Dau c1</i> (морковь)	Термолабильны. В процессе термической обработки теряют иммуногенность. Эти белки также называют Betv1-гомологи. Часто связаны с оральным аллергическим синдромом к фруктам и овощам

<p>Profilins (профилины)</p>	<p><i>Bet v2</i> (береза) <i>Plp p12</i> (timoфеевка) <i>Pru p4</i> (персик) <i>Hev b8</i> (латекс)</p>	<p>Редко ассоциированы с клиническими симптомами, но у некоторых пациентов могут вызывать тяжелые реакции. Считаются минорными аллергенами растений и показывают высокую гомологию и кросс-реактивность между филогенетически далекими видами. Поэтому при тестировании с экстрактами пыльцы возможны множественные положительные результаты, которые в большинстве случаев имеют низкую клиническую значимость</p>
<p>CCD (cross-reactive carbohydrate determinants - перекрестно-реагирующие карбо-гидратные детерминанты)</p>	<p><i>Ana c2</i> (ананас)</p>	<p>Редко ассоциированы с клиническими реакциями, но могут их вызывать у ограниченного числа пациентов. Могут быть использованы как маркеры к белковым карбогидратным фрагментам (пыльца, перепончатокрылые насекомые)</p>
<p>Calcium-binding proteins (полкальцины)</p>	<p><i>Bet v4</i> (береза) <i>Plp p7</i> (timoфеевка)</p>	<p>Обладают высокой кросс-реактивностью. Есть в пыльце растений, но отсутствуют в растительной пище</p>
<p>Serum albumins (сывороточные альбумины)</p>	<p><i>Fel d2</i> (кошка) <i>Can f3</i> (собака) <i>Bos d6</i> (молоко, говядина)</p>	<p>Сенсибилизация к этим белкам может привести к реакциям дыхательных путей на млекопитающих животных, к пищевым реакциям на молоко, мясо</p>
<p>Parvalbumins (парвальбумины)</p>	<p><i>Cyp c1</i> (карап) <i>Gad c2</i> (треска)</p>	<p>Основные аллергены рыбы. Термостабильны, устойчивы к ферментативному гидролизу. Поэтому вызывают аллергические реакции на приготовленную пищу. Это маркеры кросс-реактивности среди различных рыб, амфибий</p>
<p>Tropomyosins (тропомиозины)</p>	<p><i>Pen a1</i> (креветка) <i>Der p10</i> (дом.клещ)</p>	<p>Актин-связывающие белки мышечных фибрилл. Маркеры кросс-реактивности клещей, ракообразных, тараканов, нематод</p>

Также, с учетом географических особенностей, следует подходить к оценке рисков развития клинической картины с применением аллергокомпонентов. Например, в США и северной Европе предиктором тяжелых реакций на арахис является обнаружение IgE к Arah2, в то время, как в Средиземноморье это Arah9.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Опишите две тактики диагностики пациента, возможные при разработке стратегического плана наблюдения.
2. Укажите клинические ситуации в практике врача аллерголога-иммунолога, в которых рекомендуется определение общего IgE.

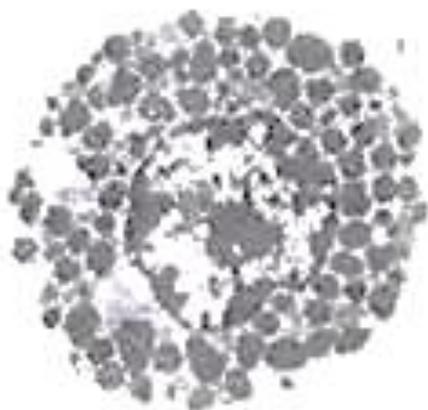
3.4. Тест активации базофилов

В последнее время этот метод исследования вызывает большой интерес в контексте диагностики аллергии. Это обследование может применяться при расхождении результатов тестов на выявление сенсибилизации *in vitro* и *in vivo*, а также при сомнительных результатах диагностики.

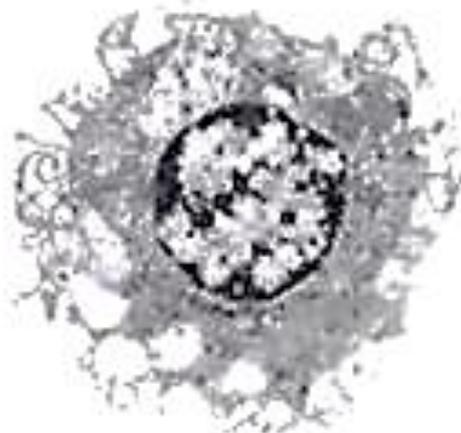
Как известно, базофилы, как и тучные клетки, относятся к клеткам-мишеням 1 порядка атопической аллергической реакции и несут на своей клеточной мембране высокоаффинные рецепторы к IgE. При контакте антитела с аллергеном происходит дегрануляция клетки (рис. 20) с активным выделением медиаторов воспаления. В то время, как тучные клетки локализованы в тканях и их трудно выделить для проведения лабораторных тестов, базофилы находятся в циркулирующей крови и поэтому доступны для лабораторных исследований как в повседневной клинической практике, так и в научных целях. Надежным маркером, позволяющим идентифицировать базофилы, является молекула CD203. Она имеется на покоящихся клетках и плотность ее экспрессии нарастает при активации базофила.

К ограничениям этого метода можно отнести отсутствие унифицированной системы стандартизации и интерпретации результатов, которые, следовательно, будут зависеть от лаборатории. Также серьезным ограничением является преаналитическая подготовка, поскольку тест лучше проводить не позже, чем через 6–12 мес. после аллергической реакции, чтобы получить достоверный результат.

Серьезной проблемой является анергия базофилов. Согласно исследованию, проведенному в 2017 г., примерно у 10% пациентов базофилы подвержены состоянию анергии. Это связано с особенностями проведения активационного сигнала тирозинкиназами.



Покоящийся базофил



Дегранулированный базофил

Рис. 20. Дегрануляция базофила

К преимуществам БАТ следует отнести отсутствие необходимости отмены антигистаминных препаратов для проведения исследования и тот факт, что этот тест оценивает, как специфическую, так и неспецифическую дегрануляцию клеток.

Очень хорошо зарекомендовал себя этот метод в диагностике пищевой аллергии. В проведенных исследованиях, где в качестве контроля использовался провокационный тест с применением плацебо, БАТ оказался наиболее достоверным и специфичными при сравнении с кожными пробами и определением специфического IgE. Такие исследования были проведены с использованием аллергенов коровьего молока, яйца и лесного ореха.

Важнейшей областью применения БАТ является диагностика лекарственной аллергии. Это тем более очевидно, что кожные аллергопробы не могут служить надежным прогностическим маркером, дающим однозначный ответ о возможности дальнейшего применения лекарственного препарата. В то же время, проведение провокационных проб связано с высоким риском развития тяжелых аллергических реакций и может проводиться только в условиях специализированного стационара, имеющего возможность реанимации. В этих условиях тест активации базофилов является надежным и безопасным методом, позволяющим принять решение о дальнейшей тактике ведения пациента.

3.5. Назальный аллергический провокационный тест

«Золотым стандартом» диагностики новой аллергопатологии носа – локального аллергического ринита является назальный аллергический провокационный тест, имеющий высокую специфичность и чувствительность. Оптимальным методом оценки его результатов является использование передней активной риноманометрии с использованием прессотахоспирографа (рис. 21).

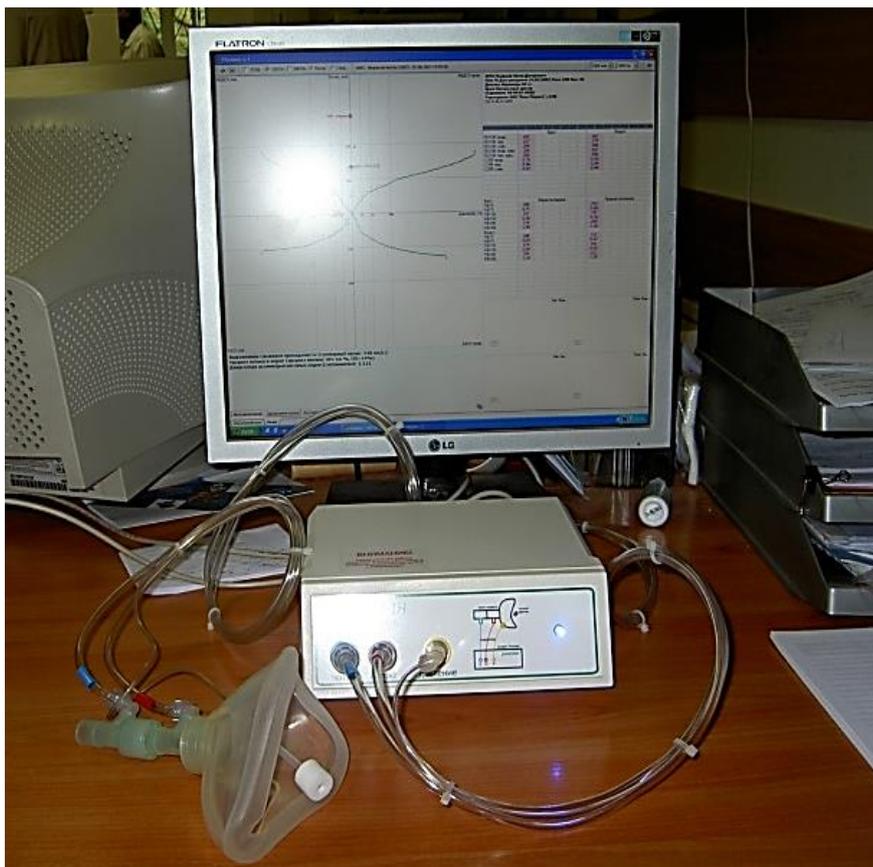


Рис. 21. Прессотахоспирограф ПТС 14П-01 «Ринолан»

Неинвазивное высокоинформативное риноманометрическое обследование позволяет определять проходимость носовых путей для обеих половин носа на вдохе и на выдохе. Данные о проходимости выражаются в значениях скорости потока при достижении потоком определенного давления. Если фиксированное значение давления (реперная точка) достигается при низкой скорости потока, это может свидетельствовать о том, что проходимость носовых путей нарушена, что важно в аспекте функционального состояния носового дыхания при рините. Используются два интегральных параметра: СОП суммарный объёмный поток (СОП) в мл/с и суммарное сопротивление (СС) в

Па/мл/с. Эти параметры измеряются до и после проведения теста, в интервале 15–60 мин.

За 24 ч до начала теста пациент прекращает получать кортикостероиды, антигистаминные препараты, кромоны, блокаторы лейкотриеновых рецепторов и деконгестанты. Противопоказанием для теста является перфорация носовой перегородки. После повторного туалета носовых ходов лиофилизированный экстракт исследуемого аллергена вводится в нижний носовой ход с помощью назального спрея, микрошприца, диска или микропипетки в разведении 1:100–1000 в количестве 0,1 мл/на 1 введение. В качестве растворителя используется 0,9% раствор NaCl. Большинство авторов рекомендует, чтобы доза вводимого раствора соответствовала дозе аллергена, применяемого для эффективного прик-теста. Оптимальным инструментом введения аллергена считается микропипетка, так как этот способ не позволяет аллергену попадать в глотку и нижние дыхательные пути. При рекомендуемой дозе аллергена экспозиция составляет 15 мин, при очень низкой дозе – до 60 мин.

3.6. Кожные аллергопробы

Всемирно признанным стандартом верификации IgE-зависимой сенсибилизации *in vivo* являются кожные аллергопробы: прик, скарификационные и интрадермальные. Это обусловлено тем, что IgE являются цитотфильными антителами, преимущественно присутствующими на поверхности тучных клеток и базофилов в тканях.

Участок внутренней поверхности кожи предплечья обрабатывается дезинфицирующим раствором (70% этиловый спирт). Диагностические аллергены, 0,01% раствор гистамина, тест-контрольную жидкость набирают по отдельности в стерильные одноразовые шприцы, соблюдая правила антисептики. На обработанную антисептиком кожу помещают по 0,1 мл (1 капля) препарата, соблюдая интервал между каплями по 3–5 см. Затем, сквозь каплю наносят по 1 прик-укол. Через 20 минут проводят оценку местной реакции по появившимся кожным элементам (зудящий волдырь, псевдоподии, эритема) и их размерам.

Обязательными условиями корректного учета результатов кожных аллергопроб являлись:

- отрицательная реакция с тест-контрольной жидкостью;
- положительная реакция на 0,01% раствор гистамина.

Оценку результатов осуществляется с учетом схемы, приведенной в таблице 2.

Таблица 2

Схема анализа скарификационных аллергопроб

Оценка реакции	Величина кожных элементов (зудящий волдырь, псевдоподии, эритема)
–	Кожа без высыпаний
+	Волдырь 2–3 мм, гиперемия
++	Волдырь 4–5 мм, гиперемия
+++	Волдырь 6–10 мм, псевдоподии, гиперемия
++++	Волдырь более 10 мм, псевдоподии, гиперемия

Интрадермальные тесты представляют интерес для тестирования сенсibilизации к аллергенам домашних клещей, так как на международном уровне признана более высокая чувствительность такого метода по сравнению с прик и скарификационными тестами.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ К РАЗДЕЛУ 3

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. ПОКАЗАНИЯ ДЛЯ АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКИ IN VITRO
 - 1)возраст пациента
 - 2)наличие тяжелой сопутствующей патологии
 - 3)применение пациентом противоаллергических препаратов системного действия с невозможностью их отмены
 - 4)все перечисленное

2. ПРЕИМУЩЕСТВА ДИАГНОСТИКИ IN VITRO
 - 1)возможно проведение обследования на фоне обострения аллергического заболевания
 - 2)отсутствуют возрастные ограничения
 - 3)более высокая специфичность и чувствительность по сравнению с кожными пробами
 - 4)все перечисленное

3. УКАЖИТЕ, КАКОЙ ТЕСТ НЕОБХОДИМО ПРОВЕСТИ ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ПАЦИЕНТУ ПРЕПАРАТА МКАТ К IGE, ОМАЛИЗУМАБА
 - 1)определение общего IgE
 - 2)определение специфического IgE
 - 3)аллергокомпонентная диагностика
 - 4)тест активации базофилов

4. ВЫБЕРИТЕ, КАКИЕ ДАННЫЕ ОБСЛЕДОВАНИЯ БУДУТ ПРИОРИТЕТНЫМИ ПРИ ПОСТАНОВКЕ ДИАГНОЗА АТОПИЧЕСКОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
 - 1)анамнез заболевания
 - 2)клиническая картина заболевания
 - 3)данные общеклинического обследования
 - 4)выявление специфического IgE к аллергенам

5. ВОЗМОЖНЫЕ МЕТОДЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПРИ СОМНИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО IGE
 - 1)кожные аллеготпробы
 - 2)тест активации базофилов

- 3) определение концентрации общего IgE
- 4) любое из перечисленного

6. ВЫБЕРИТЕ МАЖОРНЫЙ АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТ ДОМАШНЕЙ КОШКИ

- 1) Mal d1
- 2) Der p23
- 3) Bet v1
- 4) Fel d1

7. УКАЖИТЕ ВРЕМЕННОЙ ИНТЕРВАЛ ПОСЛЕ РАЗВИТИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, В КОТОРЫЙ ЦЕЛЕСООБРАЗНО ПРИМЕНЯТЬ ТЕСТ АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ

- 1) 6–12 мес.
- 2) 1–2 года
- 3) 2–4 года
- 4) более 5 лет

8. ВЫБЕРИТЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ

- 1) определение специфического IgE к компонентам аллергена пищевого продукта
- 2) определение общего IgE
- 3) определение специфического IgE к экстракту аллергена пищевого продукта
- 4) тест активации базофилов

9. МАЖОРНЫЙ КОМПОНЕНТ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ

- 1) Betv1
- 2) Betv2
- 3) Betv4
- 4) все перечисленные

10. МАЖОРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПЫЛЬЦЫ ТИМОФЕЕВКИ

- 1) Betv1
- 2) Phl p1
- 3) Phl p5
- 4) Derp1

11. МАЖОРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ДОМАШНЕГО КЛЕЩА PTERONISSINUS

- 1)Derp1
- 2)Derp2
- 3)Derp10
- 4)Derp23

12. ФОРМА АЛЛЕРГЕНА, К КОТОРОЙ ВЫШЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- 1)полный аллерген
- 2)аллергокомпонент
- 3)все перечисленное верно
- 4)верного ответа нет

13. ВЫБЕРИТЕ, К КАКИМ АЛЛЕРГЕНАМ ВЫШЕ ВЕРОЯТНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ

- 1)термостабильные аллергены
- 2)термолабильные аллергены
- 3)оба ответа верные
- 4)верного ответа нет, толерантность не формируется

14. КАКОЙ ФАКТОР НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ПРИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ

- 1)возраст пациента
- 2)географическая территория проживания
- 3)пол пациента
- 4)все перечисленное

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ К РАЗДЕЛУ 3

Задача № 1

На приеме у врача-аллерголога мужчина, 25 лет, с жалобами на сезонные проявления ринита. На протяжении последних 3-х лет в период с начала мая до начала августа пациента беспокоит выраженная заложенность носа, ринорея. Иногда присоединяется зуд глаз. С каждым годом симптоматика становится более выраженной. Отмечается положительная динамика при приеме антигистаминных препаратов.

При проведении скарификационного аллeрготестирования выявлено: береза +++, одуванчик +, тимофеевка +++, овсяница ++, райграс ++, полынь –, подсолнечник –, домашняя пыль +.

1. *Оцените результаты аллeрготестирования и перспективы АИТ.*
2. *Оцените необходимость и объем дополнительного обследования.*

Задача № 2

На приеме у врача-аллерголога мама с ребенком 1 год 5 мес. Мама предъявляет жалобы на кожные высыпания у ребенка, которые провоцируются приемом в пищу молочных продуктов. Указанные жалобы беспокоят на протяжении последнего года. Было проведено обследование на выявление специфического IgE к пищевым антигенам, которое не дало результата.

1. *Определите и обоснуйте дальнейшую тактику обследования и ведения пациента.*
2. *Оцените вероятность формирования пищевой толерантности у данного больного.*

Задача № 3

На приеме у врача-аллерголога мама с дочкой 12 лет. Мама заметила, что у ребенка возникает сухой, лающий кашель после употребления в пищу продуктов, содержащих арахис.

1. *Определите дальнейшую тактику обследования пациента.*
2. *Какой прогноз возможно дать по поводу течения заболевания после дополнительного обследования?*

Задача № 4

На приеме у врача-аллерголога женщина 32 лет с жалобами на зуд носа, чихание, ринореею и сухой навязчивый кашель. Указанные симптомы беспокоят пациентку в мае и сентябре на протяжении последних 5 лет. На противоаллергическое лечение отмечается положительная динамика. При проведении скарификационных аллeргопроб выявлено: береза +++, одуванчик -, тимофеевка +++, овсяница +, райграс +, полынь –, подсолнечник +.

1. *Прокомментируйте результаты обследования в контексте клинической картины, имеющейся у пациентки.*

2. *Какова дальнейшая терапевтическая тактика у данной больной? Целесообразно ли проведение алергокомпонентной диагностики?*

Задача № 5 К врачу-аллергологу за консультацией обратился пациент, мужчина 46 лет, с жалобами на длительную заложенность носа. Ощущение заложенности не имеет сезонного характера. Усиливается в горизонтальном положении. Эффекта элиминации пациент не отмечает. Ответ на противоаллергическую терапию антилейкотриеновыми препаратами и топическими глюкокортикостероидами умеренный.

1. *Определите дальнейшую тактику обследования пациента.*
2. *Порекомендуйте для пациента необходимые консультации врачей узких специальностей.*

4. КРАТКИЙ ОБЗОР СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

4.1. Измерение. Измерительные шкалы

Любой эксперимент начинается с измерения исследуемых признаков. Измерение – это приписывание объекту числа или обозначения по определенному правилу. В зависимости от этого правила различают метрические и неметрические шкалы.

В неметрических шкалах нет четкой единицы измерения. Выделяют номинативную (категориальную) и ранговую (порядковую) шкалу. Измерение в *номинативной шкале* состоит в классификации объектов. Возможно присвоение символов, но объекты сравнивать по принципу «больше – меньше», «лучше – хуже» между собой нельзя, можно сказать только, что они разные. Примеры признаков: группа крови, национальность, заболевание. Частный случай – дихотомическая шкала, когда признак имеет две градации. Примеры – пол, наличие или отсутствие осложнения.

При измерении в *ранговой шкале* объектам приписываются числа в зависимости от выраженности признака. Допустимы сравнения по принципу «больше – меньше», «лучше – хуже», но нельзя сказать, на сколько больше или меньше, так как нет четкой единицы измерения. Примеры – шкалы Апгар, CURB 65, SCORE и другие, балльные оценки в психологических тестах.

Измерение в *метрической шкале* подразумевает наличие четкой единицы измерения, одинаковой на всех участках шкалы. В этой шкале допустимы не только сравнения по принципу «больше – меньше», но и можно вычислить на сколько больше. Примеры признаков – длительность заболевания, масса тела, уровень глюкозы. Знание шкалы, в которой проведено измерение, необходимо для выбора корректного метода представления данных и критерия для статистической обработки результатов исследования.

4.2. Генеральная совокупность и выборка

Следующими важными понятиями являются понятия генеральной совокупности и выборки. Генеральной совокупностью называется все множество объектов, обладающих изучаемым признаком. Генеральная совокупность определяется задачей исследования. Например, если

изучается уровень лейкоцитов у населения города Томска, то генеральной совокупностью является все население города Томска.

Но изучать всю генеральную совокупность в большинстве случаев невозможно (она велика, что ведет к дорогостоящим исследованиям, не всегда все ее объекты доступны). Поэтому из нее делают выборку – отбирают объекты для изучения. Отбор должен производиться случайным образом. При описании получения выборки в статьях обязательно указывают критерии включения и невключения.

Одна из задач математической статистики состоит в переносе данных, полученных, на выборке, на генеральную совокупность. Поэтому выборка должна быть *репрезентативной* (представительной), чтобы отражать свойства генеральной совокупности. В этом случае выборка является моделью генеральной совокупности.

4.3. Установление закона распределения переменных

Для выбора методов описательной и доказательной статистики необходимо знать вид закона распределения изучаемых признаков. Для этого проводится анализ вариационных рядов – рядов, показывающих распределение количественного признака по величине.

Наиболее важным для исследователя является нормальное распределение, поскольку его наличие позволяет использовать особую группу критериев – параметрические критерии.

Для визуального определения закона распределения можно построить гистограммы. Для нормального распределения характерна симметричность и относительно большая частота встречаемости значений в середине ряда.

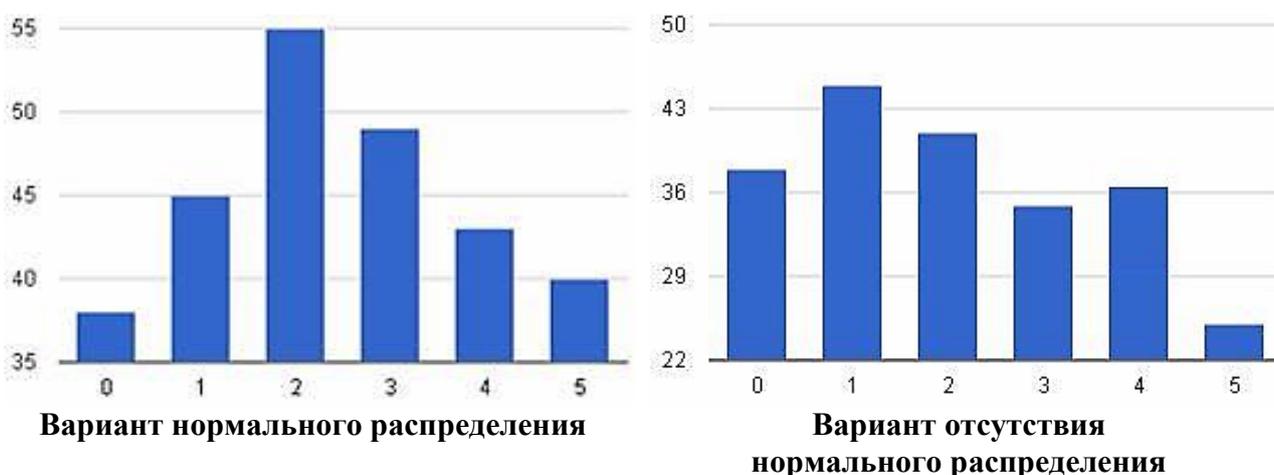


Рис. 21. Примеры форм распределения переменных

Следует помнить, что визуального анализа недостаточно для доказательства наличия или отсутствия нормального распределения. Необходимо использовать критерии согласия. Например, *критерии Шапиро–Уилка* или *Колмогорова–Смирнова*.

В медицине при проведении исследований аспирант чаще сталкивается с отсутствием нормального распределения изучаемых переменных.

4.4. Описательная статистика

Методы описательной статистики позволяют в сжатом виде представить данные, указав самые важные характеристики. При описании принято указывать центр распределения (для этого используются средняя арифметическая или медиана) и разброс значений (для этого используются стандартное отклонение, стандартная ошибка, доверительный интервал, интерквартильный размах).

Представление данных при нормальном законе распределения

Если распределение показателей нормальное, то для описания данных используются *средняя арифметическая* (M), *стандартное отклонение* (SD), *стандартная ошибка* средней арифметической (m). Записывается как $M \pm SD$ или $M \pm m$.

Для описания данных, распределенных по нормальному закону, можно использовать также доверительный интервал

Доверительный интервал – это интервал, в котором с заданной доверительной вероятностью будет находиться значение того или иного параметра генеральной совокупности. Доверительная вероятность указывает надежность оценки. В медицинских исследованиях используются 95% или 99% интервалы. Обязательным условием для использования доверительного интервала является наличие нормального распределения изучаемых признаков.

Представление данных при отсутствии нормального закона распределения и при измерении в ранговой шкале

Если распределение признака, измеренного в метрической шкале, не соответствует нормальному закону (это часто встречается в медицине, так как распределения признаков в большинстве случаев не являются симметричными), то средняя арифметическая не очень точно описывает центр распределения (она оказывается смещена), а разброс

значений разброс значений в этом случае оказывается очень большим. В ранговой (порядковой) шкале вычисление стандартного отклонения и стандартной ошибки вообще не корректны, поскольку основаны на разностях значений. В этом случае для представления результатов используются медиана и квартили.

Квартили – это значения, которые разделяют упорядоченную выборку на четыре равные части. Первый или нижний квартиль (Q_1) отделяет 25% самых маленьких значений, второй квартиль разделяет выборку на две равные части (он называется *медианой* (Me)), третий или верхний квартиль (Q_3) отделяет 25% самых больших значений. Результаты в этом случае представляются в виде $Me (Q_1; Q_3)$, где Me – медиана, $(Q_1; Q_3)$ – интерквартильный размах (он показывает интервал, в котором сосредоточены 50% значений вокруг медианы).

Для графического представления данных в этом случае используются «ящики с усами», представленные на рисунке.

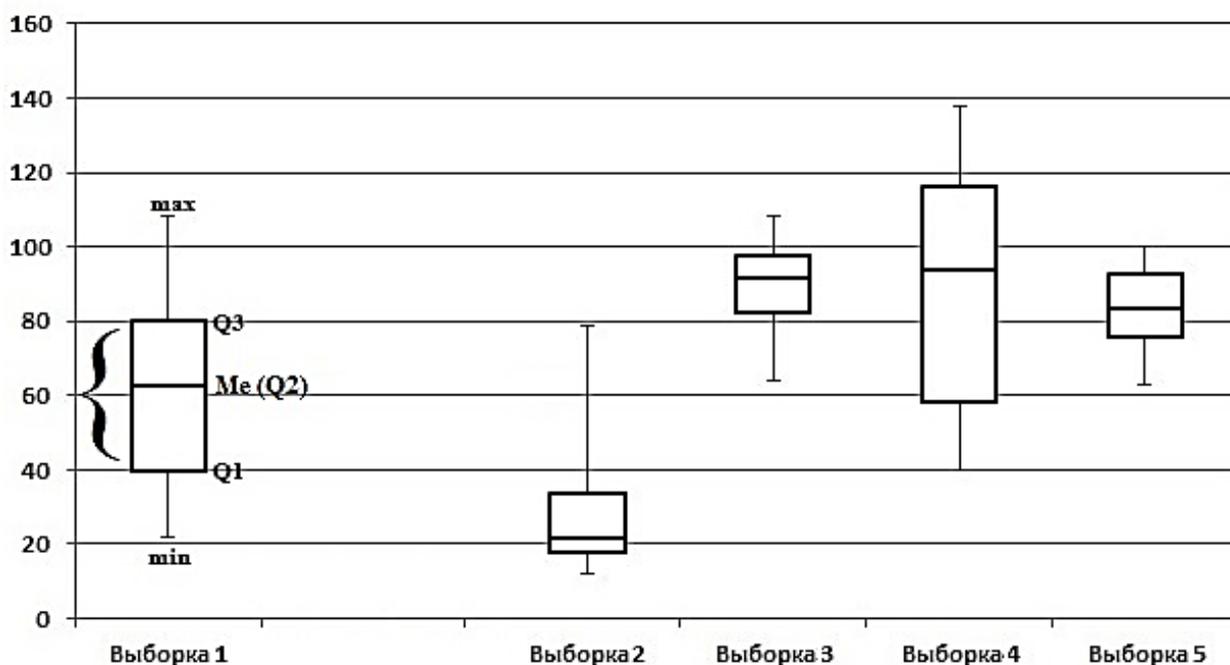


Рис. 22. Графическое представление данных в виде медианы и квартилей

4.5. Проверка статистических гипотез. Выбор статистического критерия

Методы описательной статистики используются для получения первичной информации и представления результатов. Для доказатель-

ства различий между выборками или установления изменений под действием фактора используются методы доказательной статистики в виде проверки *статистических гипотез*.

При проверке исследователь всегда выдвигает две гипотезы – основную (об отсутствии различий) и альтернативную (о наличии различий). Для выбора, какую из гипотез принять, используются различные статистические критерии.

При принятии решения возможны *статистические ошибки*. *Ошибка первого рода* (ее вероятность называется *уровнем значимости*) возникает, если нулевая гипотеза была верна, но была отвергнута (между выборками не было различий, а исследователь принял решение, что они есть). *Ошибка второго рода* возникает, если нулевая гипотеза неверна, но не отвергнута (различия были, но было принято решение об их отсутствии). Вероятность ошибки второго рода связана с *мощностью критерия* (мощность критерия – это способность выявлять различия, отвергать нулевую гипотезу, если она неверна).

При использовании статистических пакетов выдается *p-уровень* – это вероятность ошибки, которую мы сделаем, если отвергнем нулевую гипотезу. В статьях принято указывать точное значение *p-уровня*, а при принятии решений различия между выборками при значения $p < 0,05$ рассматривать как статистически значимые различия.

Для выбора статистического критерия для проверки гипотезы в каждой конкретной ситуации необходимо учитывать

- вид используемой измерительной шкалы,
- знание о наличии или отсутствии нормального закона распределения (в случае метрических шкал),
- организацию эксперимента (являются выборки зависимыми, когда измерения проведены на одной и той же группе, или независимыми, когда измерения проведены на разных группах).

Исследователю следует помнить, что некорректное использование статистических критериев приводит неверным результатам и снижает качество проведенного исследования.

4.6. Параметрические критерии

Использование параметрических критериев возможно лишь для метрических шкал при доказанном нормальном законе распределения. Основной критерий в случае двух выборок – критерий Стьюдента.

Парный t-критерий Стьюдента используется для сравнения связанных совокупностей – результатов, полученных для одних и тех же исследуемых пациентов (например, уровень гемоглобина до и после применённой терапии и т.д.).

Непарный t-критерий Стьюдента служит для сравнения двух средних величин (X), рассчитанных для несвязанных между собой вариационных рядов (независимые выборки). Примеры сравниваемых величин: средний возраст пациентов в основной и контрольной группе, средняя длительность их лечения и т.д.

Непарный критерий Стьюдента имеет еще одно ограничение – дисперсии в исследуемых группах не должны иметь статистически значимых различий (это проверяется по *критерию Фишера*).

4.7. Дисперсионный анализ

Дисперсионный анализ позволяет установить различия средних значений в трех и более группах. Также, как и непарный критерий Стьюдента, его можно применять в случае нормального закона распределения и равенства групповых дисперсий. Суть дисперсионного анализа состоит в сравнении факторной дисперсии, отражающей различия между группами, и остаточной дисперсии, отражающей случайный разброс значений в группах.

Дополнительным преимуществом дисперсионного анализа является возможность попарных сравнений между группами.

4.8. Непараметрические критерии

Непараметрические критерии обладают меньшей мощностью, чем критерии параметрические, но не требуют наличия нормального закона распределения. Поэтому они гораздо чаще используются в медицинских исследованиях. Кроме того, они могут применяться для исследования признаков, измеренных в ранговой шкале.

Различают непараметрические критерии для зависимых и независимых выборок.

В случае двух независимых выборок чаще всего используется *U-критерий Манна–Уитни*, поскольку является весьма мощным критерием.

В случае трех и более независимых выборок необходимо использовать *H-критерий Крускала–Уоллиса*. Он является непараметрическим аналогом дисперсионного анализа. В нем так же, как и в дисперсионном анализе, возможны попарные сравнения между группами.

В случае двух зависимых выборок возможно использование *критерия знаков* и *критерия Вилкоксона*. Данная ситуация возникает, когда в одной и той же выборке исследования проводятся в двух разных условиях. Критерий Вилкоксона предпочтительнее, поскольку позволяет установить не только направленность изменений, но и их выраженность, то есть способен определить, является ли сдвиг показателей в одном направлении более интенсивным, чем в другом.

В случае трех и более зависимых выборок необходимо использовать *критерий Фридмана*.

4.9. Анализ качественных признаков

Измерение признаков в номинативной шкале требует особой группы критериев.

В случае двух независимых выборок возможно применение *точного критерия Фишера* (если изучаемый признак имеет две градации), *хи-квадрат критерия Пирсона* (при любом количестве градаций, но частоты в группах должны быть не менее 5).

При наличии трех и более независимых выборок необходимо применять *хи-квадрат критерий Пирсона*.

Если имеется две зависимые выборки, признак имеет две градации, то используется *критерий Мак–Нимара*.

4.10. Корреляционный и регрессионный анализ

Корреляционный анализ используется для выявления и изучения связи между количественными признаками при помощи расчета коэффициента корреляции.

Если изучаемые признаки измерены в метрической шкале и имеют нормальное распределение, то используется *коэффициент линейной корреляции Пирсона* (r). Значение $r = 0–0,3$ расценивается как низкая связь, $r = 0,4–0,7$ – как связь средней силы, а $r = 0,8–1,0$ – как сильная связь.

Для доказательства наличия связи необходима проверка гипотезы о значимости коэффициента корреляции. Если коэффициент корреляции значимо отличается от нуля, то величины связаны линейной корреляционной зависимостью. В этом случае может быть построено уравнение парной линейной регрессии, которое описывает зависимость одной переменной от другой.

При отсутствии нормального распределения используется *ранговый коэффициент корреляции Спирмена*. Для доказательства наличия связи так же, как и для коэффициента Пирсона, необходима проверка гипотезы о значимости данного коэффициента.

4.11. Многомерные статистические методы

С помощью *факторного анализа* возможно выявление скрытых переменных факторов, отвечающих за наличие линейных статистических корреляций между исследуемыми показателями, что позволяет существенно сократить число переменных, при описании выборки. Основная идея факторного анализа состоит в том, что если изучаемые переменные связаны между собой, то эту связь можно объяснить наличием некоторого фактора.

Кластерный анализ – это метод классификационного многомерного анализа, который позволяет проводить разбиение множества исследуемых переменных с учётом сразу нескольких признаков на однородные группы – кластеры. Объекты, принадлежащие одному кластеру, однородны (сходны), а объекты, принадлежащие разным кластерам, – разнородны. Кластерный анализ называют также «классификацией без обучения», поскольку нет первоначальной информации ни о составе, ни о количестве классов.

Дискриминантный анализ тоже относится к методам классификационного многомерного анализа, но является «классификацией с обучением», поскольку исследователь обладает так информацией о количестве и составе классов. Метод позволяет на основе измерения различных признаков объекта классифицировать его, т.е. отнести к одному из нескольких заданных классов. Важным результатом дискриминантного анализа является также выделение переменных, важных для классификации. Но следует помнить, что его применение требует многомерного нормального распределения (нормального распределения всех переменных).

Множественный регрессионный анализ является методом предсказания. Его используют, когда одна переменная (зависимая), измеренная в метрической шкале, зависит от множества других переменных (независимых). Построенная модель может использоваться для предсказания значения зависимой переменной. Метод также требует многомерного нормального распределения.

Логистическая регрессия используется в том случае, когда зависимая переменная является дихотомической (имеет всего 2 градации). Уравнение регрессии в данном случае предсказывает вероятность некоторого исхода. Дополнительная информация – выделение переменных, статистически значимых для предсказания исхода. Особенность логистической регрессии состоит в том, что она не требует многомерного распределения данных, поэтому в медицинских исследованиях применяется гораздо чаще, чем линейная регрессия или дискриминантный анализ.

4.12. Расчет относительного риска и отношения шансов

Относительный риск позволяет проводить количественную оценку вероятности исхода, связанную с наличием фактора риска. Этот анализ находит широкое применение в современных научных исследованиях, выборки в которых сформированы когортным методом. Анализ позволяет выполнять расчет относительного риска (RR) с 95% доверительным интервалом, а также дополнительных показателей, таких как разность рисков, число пациентов, требующих лечения, специфичность, чувствительность.

Расчет *отношения шансов* (OR), как и относительного риска, используется для количественной оценки взаимосвязи фактора риска и исхода, но применяется в исследованиях, организованных по принципу «случай-контроль».

4.13. ROC-анализ

ROC-анализ используется для оценки прогностической значимости маркеров. Метод основан на анализе специфичности и чувствительности. Информативность показателя определяется по величине площади под ROC-кривой (AUC). Считается, что при приближении кривой к диагонали (AUC=0,5) диагностическая ценность показателей падает, а при приближении площади под кривой к 1, диагностический

эффект теста повышается. Другим важным результатом ROC-анализа является вычисление точки разделения, при котором суммарно значение чувствительности и специфичности будет максимальным.

4.14. Нейросетевой анализ

Нейронные сети представляют собой вычислительную систему на основе искусственного интеллекта, архитектура которой имеет аналогию с построением нервной ткани из нейронов. На нейроны самого нижнего слоя подаются значения входных параметров, на основании которых нужно принимать определенные решения. Например, в соответствии со значениями клинико-лабораторных показателей пациента надо отнести его к той или иной группе по степени тяжести заболевания. Эти значения воспринимаются сетью как сигналы, передающиеся в следующий слой, ослабляясь или усиливаясь в зависимости от числовых значений (весов), приписываемых межнейронным связям. В результате на выходе нейрона верхнего слоя вырабатывается некоторое значение, которое рассматривается как ответ – отклик всей сети на входные параметры. Для того, чтобы сеть работала ее надо «натренировать» (обучить) на данных, для которых известны значения входных параметров и правильные отклики на них. Обучение состоит в подборе весов межнейронных связей, обеспечивающих наибольшую близость ответов к известным правильным ответам. Нейронные сети могут использоваться для классификации наблюдений.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Раздел 2.1.–2.4.

№ вопроса	№ ответа	№ вопроса	№ ответа
1.	3	10.	2
2.	1, 3, 4	11.	2
3.	1, 3	12.	3
4.	3	13.	1
5.	3, 4	14.	1
6.	1, 2	15.	1
7.	1, 3	16.	2, 3
8.	3	17.	4
9.	3	18.	1

Раздел 2.5.–2.11.

№ вопроса	№ ответа	№ вопроса	№ ответа
1.	2	11.	1, 3
2.	2	12.	2
3.	4	13.	3
4.	1	14.	4
5.	1	15.	1, 3, 4
6.	4	16.	4
7.	2	17.	1
8.	2	18.	1
9.	1, 2	19.	2
10.	1, 2	20.	4

Раздел 3

№ вопроса	№ ответа	№ вопроса	№ ответа
1.	4	9.	1
2.	1, 2	10.	2, 3
3.	1	11.	1, 2, 4
4.	1, 2	12.	2
5.	1, 2	13.	2
6.	4	14.	2
7.	1		
8.	4		

ОТВЕТЫ НА СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Раздел 3

Задача №1

1. Результаты аллерготестирования подтверждают вероятную пыльцевую сенсibilизацию к пыльце деревьев и злаковых трав, которая и обуславливает клиническую картину, имеющуюся у пациента. Пациент, безусловно, нуждается в скорейшем проведении АИТ, поскольку симптомы с каждым годом становятся более выраженными.
2. Поскольку клиническая картина персистирует на протяжении мая, июня и июля, а у пациента выявлена одинаково выраженная сенсibilизация как к пыльце деревьев, так и злаков, для решения вопроса о выборе аллергена для АИТ необходимо провести дополнительно аллергокомпонентную диагностику. Целесообразно оценить сенсibilизацию к мажорным аллергенам пыльцы березы (*Bet v1*) и тимopheевки (*Phl p1, Phl p5*).

Задача № 2

1. Для уточнения рекомендаций по диете и оценке вероятности формирования толерантности целесообразно провести аллергокомпонентную диагностику к белкам коровьего молока. При выявлении сенсibilизации к термостабильным белкам, например, казеину, требуется исключить полностью молочный белок из рациона ребенка. В том числе, сыры и кисломолочные продукты. При выявлении сенсibilизации на относительно термолабильные белки, например, альфа-лактальбумин, следует рассмотреть вопрос о сохранении в диете кисломолочный продуктов и термически обработанного молока.
2. Через 6 месяцев необходимо провести контрольное обследование. При снижении титров антител к БКМ можно говорить о высокой вероятности формирования толерантности и попытаться ввести продукты из коровьего молока в диету ребенка.

Задача № 3

1. Необходимо проведение кожных аллергопроб с пыльцевыми аллергенами для оценки наличия сенсibilизации к пыльце деревьев.

Кроме того, необходимо провести алергокомпонентную диагностику к белкам арахиса для прогнозирования тяжести течения сенсибилизации.

2. При выявлении сенсибилизации к белкам арахиса Arah2, Arah7, Arah9 рекомендуется полностью исключить арахис из рациона для профилактики тяжелых системных реакций, в частности, анафилактики.

Задача № 4

1. У пациентки выявлена сенсибилизация к пыльце березы, что полностью коррелирует с клинической картиной заболевания.
2. Пациентке показано проведение АИТ. Дальнейшая алергокомпонентная диагностика мало целесообразна, поскольку расхождений между клинической картиной и выявленным спектром сенсибилизации нет.

Задача № 5

Пациенту показана обязательная консультация лор-врача. Кроме того, поскольку заложенность носа усиливается в горизонтальном положении, целесообразна консультация гастроэнтеролога для исключения ГЭРБ. Также, учитывая, что назначенное противоаллергическое лечение не оказало должного эффекта, целесообразно рекомендовать консультацию эндокринолога и дополнительное обследование для выявления активной герпес-вирусной инфекции.

ИЛЛЮСТРАЦИИ

- Рис. 1.** Деев, С.М. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения / С.М. Деев, Е.Н. Лебедеенко // *Actanaturae*. – 2009. – № 1. – С. 32–50.
- Рис. 2.** Направления совершенствования лекарственных препаратов моноклональных антител / О.А. Ваганова, Т.А. Ефремова, А.Н. Миронов и др. // *Ведомости НЦЭСМП*. – 2014. – № 1. – С. 32–39.
- Рис. 4.** Коуаанис Кати. Иммуноферментный анализ. [Электронный ресурс]:
Режим доступа: <https://medach.pro/post/2047>)
- Рис. 6.** Cherian, S. Common flow cytometry pitfalls in diagnostic hematopathology / S. Cherian, B.D. Hedley, M. Keeney // *Cytometry*. – 2019; 96B. – P. 449–463. Режим доступа: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21854>.
- Рис. 8.** Режим доступа: <http://www.immunospot.com/immunospot-kits/human-ifn--perforin-double-color-fluorospot>
- Рис. 9.** I. L. Killie Development of new tissue culture protocols for enrichment of CD4 T cells associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. MasterThesis, University of Tromsø 2010. ResearchGate. Doi 10.13140/RG.2.1.4796.6249.
Электронный ресурс
- Рис. 10.** Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл; пер. с англ. В.И. Кандрора и др. – М.: Мир, 2000. – 581 с.
- Рис. 11.** Режим доступа: <https://studfile.net/preview/5585844/page:3/>
- Рис. 14.** Кольман, Ян. Наглядная биохимия [Текст]: пер. с нем. / Я. Кольман, К.-Г. Рем. – М.: Мир, 2004. – 469 с.

- Рис. 15.** Режим доступа: <https://slideplayer.com/slide/7942400/PostedbyJuneAtkins>
- Рис. 17.** статья L. Liu Chronic Granulomatous Disease URL: step1.medbullets.com/immunology/105009/chronic-granulomatous-disease [Электронный ресурс]
- Рис. 19.** А. Pomés, S. Wünschmann, M. Chapman. Allergens. / Encyclopedia of Immunobiology. DOI 10.1016/B978-0-12-374279-7.16002-3. Research Gate [Электронный ресурс]
- Рис. 20.** Режим доступа: <https://kaznmu.kz/press/wp-content/uploads/.pdf>
- Рис. 21.** Режим доступа: <https://math.semestr.ru/group/hypothesis-testing.php>
- Рис. 22.** Режим доступа: <https://excel2.ru/articles/kvartili-i-interkvartilnyy-interval-iqr-v-ms-excel>

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Klimov, V.V. From Basic to Clinical Immunology / V.V. Klimov – Springer, 2019. – 377 p.
2. Хаитов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 352 с.
3. Иммунология: практикум: учебное пособие / под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатьевой, Л.В. Ганковской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
4. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 томах / В.В. Алексеев [и др.]; под ред. А.И. Карпищенко. – 3-е изд., перераб. и доп. – Т.2. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 792 с.
5. Королевская, Л.Б. Метод определения циркулирующих иммунных комплексов, дифференцированных по размерам и классам иммуноглобулинов: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук: 14.03.09 / Королевская Лариса Борисовна; [Место защиты: Ин-т экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН]. – Пермь, 2010. – 18 с.

Учебное издание

**Владимир Васильевич Климов
Валентина Сергеевна Свиридова
Андрей Владимирович Климов
Наталья Сергеевна Кошкарова
Марина Борисовна Аржаник**

Руководство по клинической иммунологии и аллергологии

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ АСПИРАНТОВ

Редактор А.Ю. Коломийцев
Технический редактор О.В. Коломийцева
Обложка С.Б. Гончаров

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 15.04.2021
Формат 60x84_{1/16}. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ.л. 5,8. Авт.л. 3,3.
Тираж 100 экз. Заказ № 12

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru