

E-РОК

- Тест розеткообразования — классический метод определения количества Т-лимфоцитов в периферической крови — основан на наличии на мембране Т-лимфоцитов всех субпопуляций рецепторов к эритроцитам барана и способности Т-лимфоцитов образовывать с ними прочные комплексы (так называемые розетки).

Е-РОК: Материалы

- **Материалы и оборудование.** Для работы необходимы: 0,15 М NaCl, среда Игла-МЕМ с рН 7,4, подведенная с помощью 1 М NaOH, гепарин без консервантов (например, Gedeon Richter, Будапешт), раствор фиколл — визотраст с плотностью 1,077 г/мл, трипановый синий 0,2% в 0,15 М NaCl.
- Также нужно иметь центрифужные пробирки на 10 мл (силиконизированные), пастеровские пипетки, центрифуги, гематокритную центрифугу, камеру для подсчета клеток, микроскоп с фазово-контрастной оптикой, ротор для ресуспендирования клеток.

Получение лимфоцитов

- Для определения РОК необходимы лимфоциты, по возможности минимально загрязненные аутологическими эритроцитами. Для получения лимфоцитов подходит метод Бейюма :2 мл гепаринизированной крови (100 ЕД гепарина/мл) разводят 6 мл среды Игла-МЕМ и осторожно наслаивают в центрифужную пробирку на 2 мл сепарирующего раствора. Центрифугируют 40 минут при 600 g. Лимфоциты скапливаются в виде полосы белого цвета над сепарирующим раствором. Их отсасывают пастеровской пипеткой и отмывают средой Игла-МЕМ, центрифугируют 3 раза по 10 минут при 600 g и еще один раз при 200 g, устанавливают плотность суспензии, равную 3×10^6 клеток/мл.

Инкубация

- Из трижды отмытых в 0,15 М NaCl ЭБ делают 0,5% суспензию в среде Игла-МЕМ. Равные объемы суспензии лимфоцитов и ЭБ (например, 0,5 мл) смешивают в центрифужной пробирке, центрифугируют в течение 5 минут при 200 g и сохраняют при 4°C в течение ночи.

Оценка результатов

- Важным этапом является ресуспендирование осадка. Требуется определенный опыт, чтобы при покачивании и вращении центрифужных пробирок не разрушить розетки. В нашей лаборатории для ресуспендирования пользовались ротором (угол качания 45° , 6 об/мин, 15 минут). При помощи пастеровской пипетки заполняют счетную камеру и в условиях фазового контраста подсчитывают по меньшей мере 200 лимфоцитов с целью определения РОК- При подсчете РОК учитывают лимфоциты с 3 и более адгезировавшими эритроцитами. Жизнеспособность клеток определяют окрашиванием 0,2% раствором трипанового синего. Розетки фиксируют 0,8% раствором глутарового альдегида. В течение 1—2 недель розетки можно хранить в 1% агарозе.

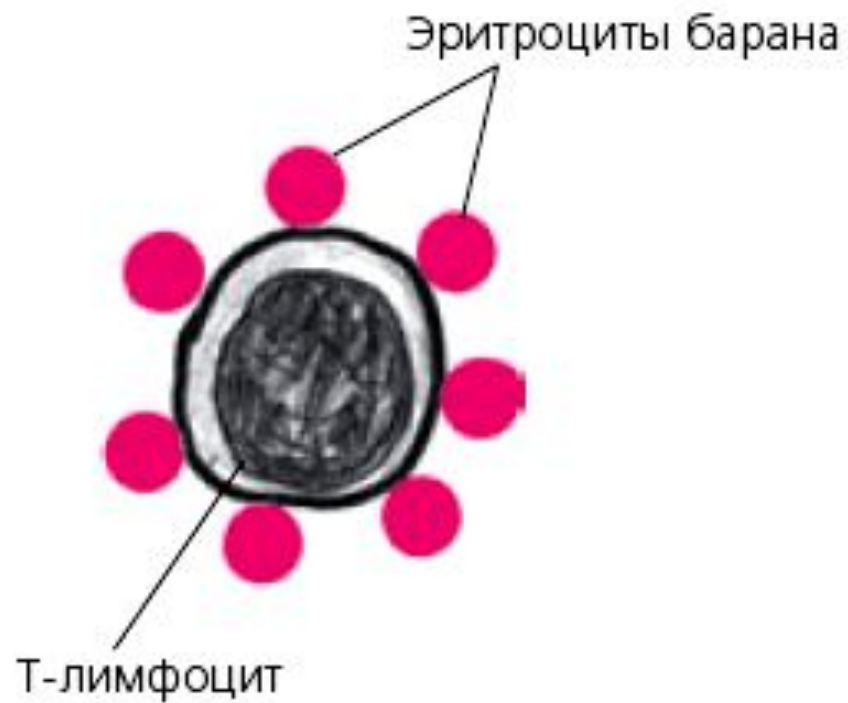
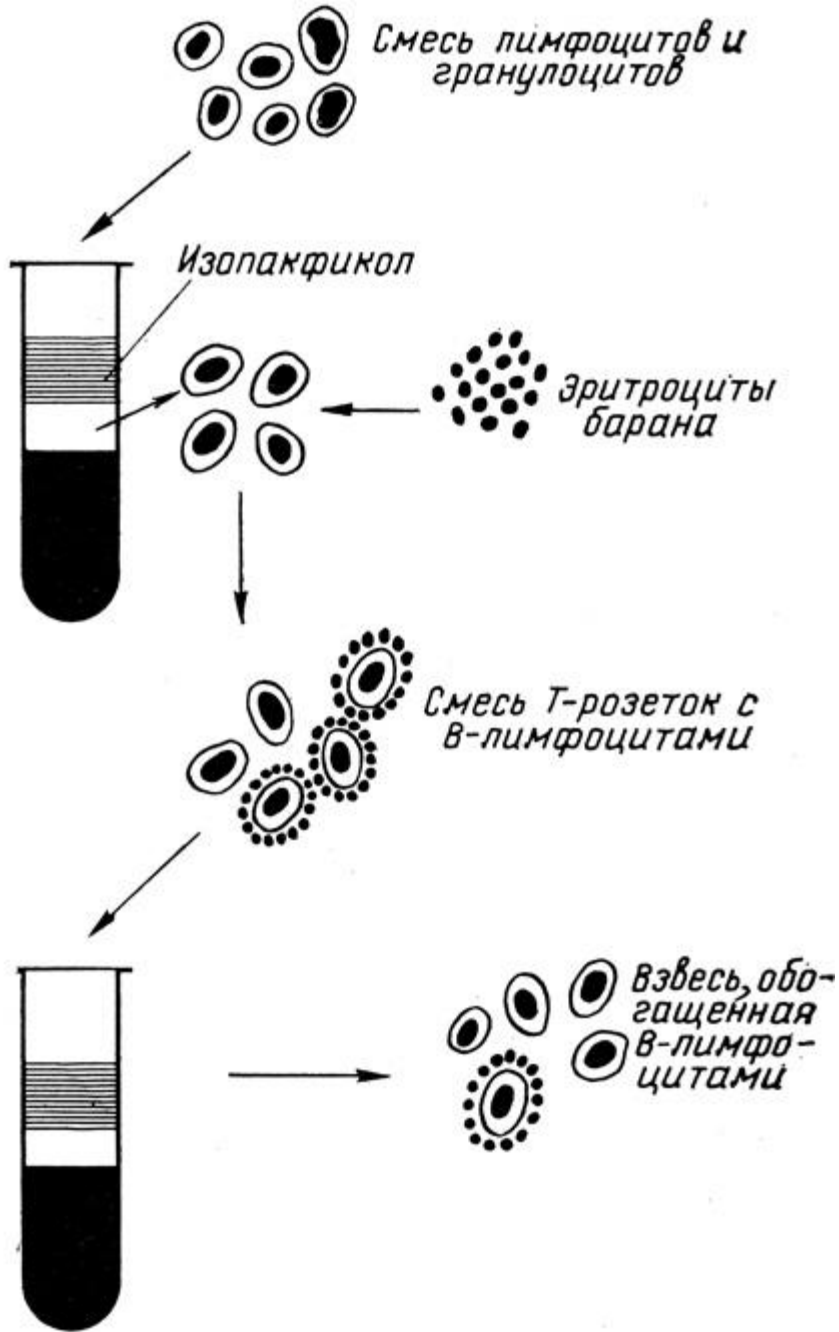
Модификации

- Сокращение используемых объемов крови достигается следующей модификацией: в пробирку вносят 200 мкл среды Игла-МЕМ, 100 мкл суспензии лимфоцитов (3×10^5 клеток) и 100 мкл 5% суспензии ЭБ, инкубируют 10 мин при 37 °С, ресуспендируют (ротатор), центрифугируют 15 минут при 200 g и оставляют на ночь при 4°С. В среднем наблюдается $61 \pm 8\%$ РОК. Обработка эритроцитов АЭТ (2-аминоэтилизоотиурония гидробромид) стабилизирует розеткообразование и дает до 80% розеток. Приготовление ЭБ, обработанных АЭТ: 1 мл осадка отмытых ЭБ смешивают с 4 мл раствора АЭТ (0,402 г АЭТ в 10 мл дистиллированной H_2O , рН подводят 4М NaOH до 9,0). Смесь инкубируют 15 минут при 37 °С, затем отмывают трижды в 0,15М NaCl. Осадок суспендируют в среде Игла-МЕМ с 20% сыворотки эмбрионов коров до получения 10%. суспензии ЭБ.

- Максимально АЭТ — ЭБ могут храниться в течение недели - при 4°C. Для получения розеток смешивают 0,5 мл суспензии лимфоцитов (2×10^6 /мл), 0,25 мл сыворотки эмбрионов коров и 6—8 капель АЭТ — ЭБ, центрифугируют 5 минут при 25 g и оставляют на ночь при 4°C. ЭБ можно также стабилизировать ЧСА: 50 мкл суспензии лимфоцитов (2×10^6 /мл) смешивают с 50 мкл 1% суспензии ЭБ и 20 мкл человеческого сывороточный альбумин (20% в среде Игла-МЕМ) в маленьких стеклянных пробирках инкубируют 75 мин при 4°C, затем добавляют 200 мкл среды и ведут подсчет. Добавление 20 мкл смеси этидий-бромид с акридиновым оранжевым позволяет дифференцировать живые (зеленое окрашивание) и неживые клетки (красное окрашивание). Результаты, полученные этим методом, коррелируют на 95% с результатами, полученными при помощи метода моноклональных АТ (антитело) (ОКТЗ).

- Для реакции торможения розеткообразования используют суспензию лимфоцитов (4×10^6 /мл) в среде Игла-МЕМ. В пробирку вносят 100 мкл суспензии лимфоцитов, 200 мкл антилимфоцитарных АГ в разведении 1 : 2000—1 : 256000 инкубируют 90 мин при 37°C, добавляют 100 мкл 0,5% суспензии ЭБ, инкубируют 10 минут при 37°C, центрифугируют 5 минут при 200 g, выдерживают 90 минут на ледяной бане. После осторожного ресуспендирования проводят подсчет розеток. Минимальную концентрацию, при которой отмечается торможение антилимфоцитарных АТ (антитело) (концентрация, вызывающая 25% снижение розеткообразования по сравнению с контролем) определяют графически.

- Известен микрометод определения РОК в планшетах Тerasаки. Под слоем вазелинового масла смешивают 2 мкл суспензии лимфоцитов (8×10^3 клеток), 1 мкл суспензии ЭБ, 3 мкл 2% раствора альбумина, центрифугируют и после 1 часа инкубации при 4°С производят подсчет, используя в качестве фиксатора глутаровый альдегид.



Е-Рок(проще)

- Кровь обследуемого пациента в количестве 10 мл вносят в пробирку с раствором гепарина и осторожно наслаивают на смесь фиколл-гипака, который способствует выделению лимфоцитов, и центрифугируют. После центрифугирования эритроциты оседают на дно пробирки, а лимфоциты располагаются тонким слоем на границе раствора фиколл-гипака и плазмы. Взвесь лимфоцитов осторожно извлекают из этого слоя (интерфазы), доводят до концентрации $2-4 \times 10^6$ /мл ($2-4 \times 10^9$ /л) и смешивают с взвесью эритроцитов барана в соотношении 1:1.

- Полученную смесь инкубируют при 37°С в течении 10 минут и снова центрифугируют, после чего выдерживают в холодильнике при температуре 4 °С в течение нескольких часов. Подсчет клеток производят в камере Горяева при люминесцентной микроскопии. Подсчитывают число “розеток” на 100 лимфоцитов и определяют процентное содержание Т-лимфоцитов. Для определения абсолютного количества Т-лимфоцитов в день исследования производят общий клинический анализ крови.

Определение активных Т-лимфоцитов

- Активные Т-лимфоциты — это клетки, способные к спонтанному розеткообразованию без предварительной инкубации. Ход исследования тот же, что и при определении общего числа Т-лимфоцитов, за исключением этапа инкубации. В норме в периферической крови содержится от 23 до 40% активных Т-лимфоцитов (в среднем $34,6 \pm 1,9\%$).

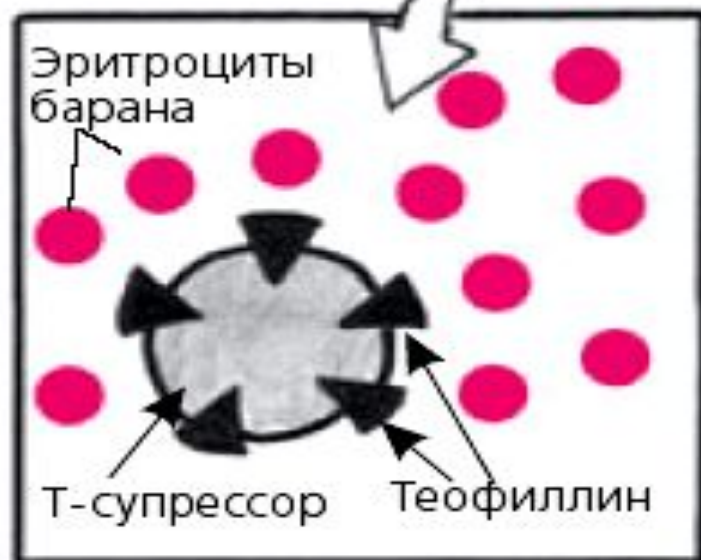
Определение субпопуляций Т-лимфоцитов

- Определение субпопуляций Т-лимфоцитов основано на выявлении так называемых теофиллинчувствительных и теофиллинрезистентных лимфоцитов. Клеточные мембраны Т-супрессоров, как было сказано выше, имеют рецепторы к теофиллину, который при взаимодействии с клеткой ингибирует реакцию спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана. Т-хелперы таких рецепторов не содержат, поэтому при взаимодействии с эритроцитами барана даже при добавлении теофиллина образуются “розетки”.

- Методика количественного определения Т-супрессоров и Т-хелперов мало отличается от описанного выше теста розеткообразования, за исключением добавления в инкубационную среду раствора теофиллина. При этом Т-супрессоры (теофиллинчувствительные клетки) теряют способность розеткообразования с эритроцитами барана, а Т-хелперы (теофиллинрезистентные клетки) такую способность сохраняют

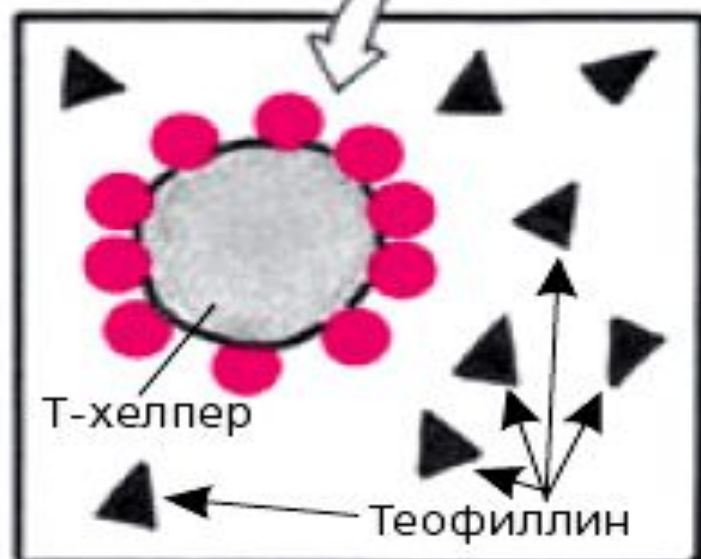
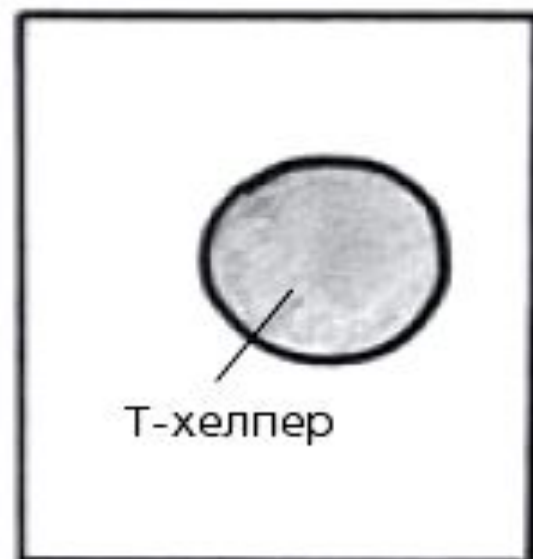
Эритроциты барана + теофиллин

а



Эритроциты барана + теофиллин

б



- **Среда МЕМ** (Minimum Essential Medium), или среда Игла была разработана Гари Иглом и является наиболее распространенной средой для культивирования клеток. Среда МЕМ содержит 13 аминокислот, 6 водорастворимых витаминов, холин и инозит, выполняющие роль углеводородного субстрата. Есть модификации среды МЕМ с солями Эрла и Хэнкса, а также α -модификация среды МЕМ с содержанием всех 21 аминокислот и солями Эрла.



Планшет Терасаки



Среда
МЕМ

Метод оценки В-лимфоцитов

- Метод ЕАС-розеток предназначен для выявления рецепторов к компоненту на поверхности моноклеаров (лимфоциты, моноциты). Эритроциты, сенсibilизированные амбоцептором и «нагруженные» компонентом, связываются с мембраной моноклеаров, содержащих рецепторы компонента, с образованием розеток. Рецепторы взаимодействуют преимущественно с компонентом СЗ.

Материалы и оборудование

- Силиконизированные и центрифужные пробирки (25 и 10 мл), пастеровские пипетки, гематокрит-ная центрифуга, центрифуга Т-23, ротор (10—20 об/мин), пикнометр и аналитические весы, или весы Вестфаля (Johannes-Hammer, Лейпциг), камера для подсчета клеток (Bürker или другой тип), седиментационная камера по Sayk (Dorenburg, Берлин), микроскоп, водяные бани на 37°C и 56°C.

- Цельную кровь барана, разведенную раствором Олсвера O + O. сохраняют до 8 дней в холодильном шкафу при 4°C. Также необходимо иметь кроличьи гемолизины против эритроцитов барана, свежую мышиную сыворотку, 0,15M NaCl, среду Игла, изотонический буфер для культивирования клеток, гепарин, визотраст 370, декстрансульфат (натриевая соль, отн. мол. масса 500). рН среды Игла и изотонического раствора для культивирования клеток доводят до 7,3—7,4. Готовят разделяющий раствор следующего состава:
- 100 мл раствора декстрансульфата в воде (60 г/л)
20 мл визотраста, 30 мл бидистиллированной воды
- Разделяющий раствор хранят на холоду в темной склячке с притертой пробкой

Выделение лимфоцитов

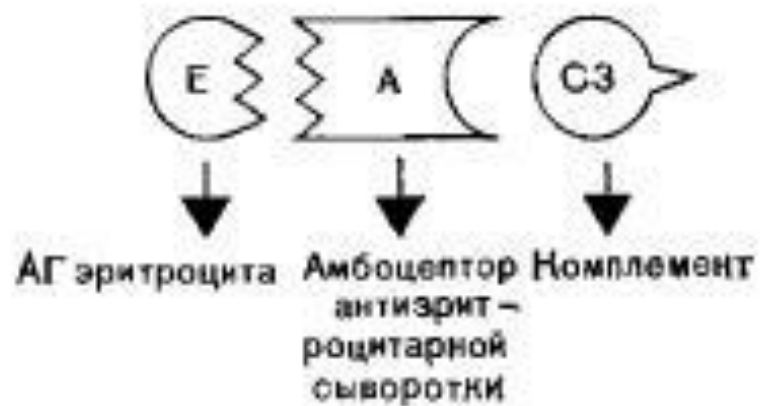
- Гепаринизированную кровь в количестве 2—4 мл (100 ЕД гепарина на 1 мл) разводят средой Игла в соотношении 1 : 4 и 1 : 6 и осторожно наслаивают на 3—5 мл разделяющего раствора в центрифужных пробирках на 25 мл, центрифугируют 20—40 мин при 600 g и комнатной температуре. Лимфоциты скапливаются в виде белого слоя на границе разделяющего слоя и среды Игла. Их отбирают пастеровской пипеткой и трижды по 10 мин отмывают средой при комнатной температуре. Центрифугируют дважды при 600 g и 1 раз при 200 g для уменьшения примеси тромбоцитов. Концентрацию суспензии доводят до 3×10^9 клеток/л (среда Игла). Различные варианты контроля дают в среднем 93% лимфоцитов, 4% моноцитов, 3% гранулоцитов. Долю моноцитов можно снизить до 1% и меньше по методу Gu, однако это для метода ЕАС-розеток не имеет особого значения.

Сенсибилизация эритроцитов барана

- ЭБ, смешанные с раствором Олсвера, осаждают центрифугированием и дважды отмывают ФСБ или 0,15 NaCl. Ресуспендируют осадок в среде Игла и доводят гематокрит до 0,05. Сенсибилизацию ЭБ проводят инаktivированием гемолизином кролика, разведенным до субагглютинирующей концентрации изотоническим буфером. Для получения оптимальных концентраций амбоцептора проверяют несколько степеней разведения, выраженных в титрах гемолизина.

- Наилучшие результаты получаются при разведении 1 : 500. При использовании инактивированных кроличьих антисывороток к антигену Форссмана или ЭБ необходимые разведения не совпадают. Суспензию эритроцитов (гематокрит 0,05) смешивают с равным объемом разведенного амбоцептора и инкубируют в течение 30 мин при 37 °С на водяной бане. Суспензию эритроцитов в ходе инкубации многократно перемешивают. После инкубации сенсibilизированные ЭБ дважды отмывают в изотоническом буферном растворе, ресуспендируют в среде Игла и устанавливают гематокрит 0,05.

Комплекс ЕАС



Лимфоцит с рецепторами к комплексу



Среда Олсвера

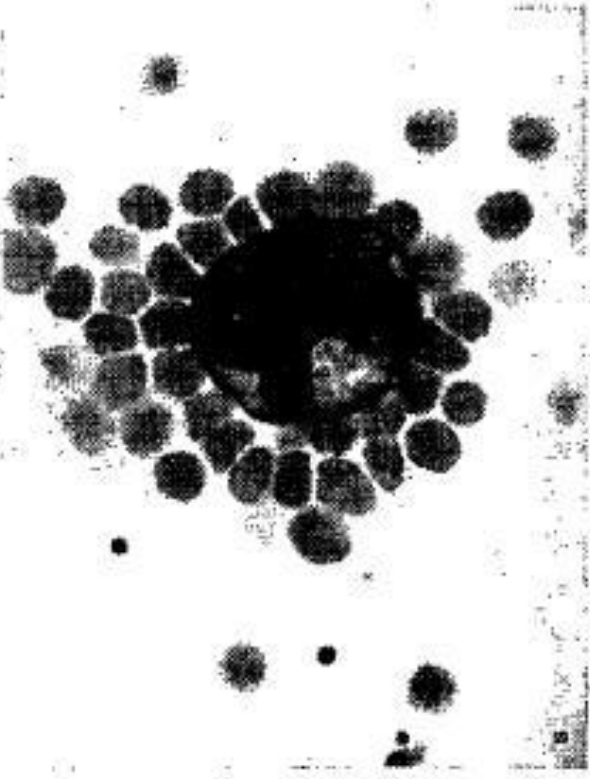
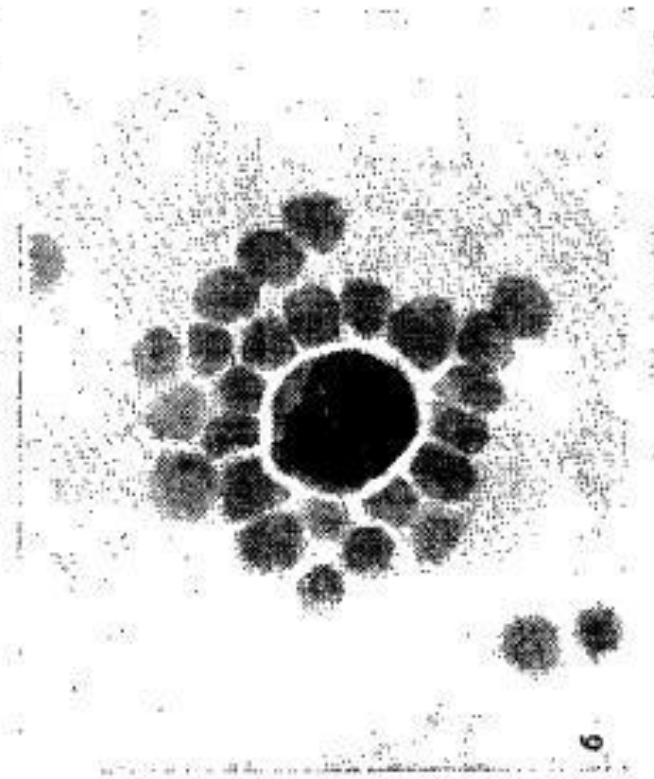
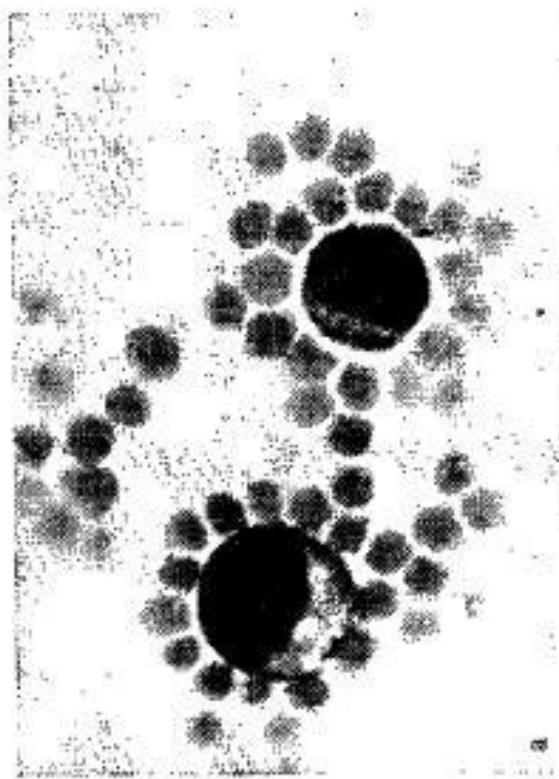
- р-р, предназначенный для сохранения эритроцитов. Состав: 24,6 г глюкозы, 9,6 г натрия цитрата, 5,04 г натрия хлорида, 1200 мл дистил. воды. Стерилизуют фильтрованием. Для консервации эритроцитов барана 1 ч. крови смешивают с 1 ч. О.р.; эритроцитов человека, морской свинки, кур - 5 ч. крови с 1 ч. О.р. Эритроциты пригодны в течение 8-12 дней. С этой целью также применяют азид натрия, боратный буфер с сорбитом, гипертонический р-р натрия хлорида, рН 6,0 - 6,4 (Ричардсона метод).

Инкубация

- Суспензию эритроциты — антитела — комплемент (ЕАС) с гематокритом 0,005 (0,5 мл) в центрифужных пробирках объемом 10 мл с 0,5 мл суспензии лимфоцитов инкубируют 15 мин при 37°С на водяной бане, периодически перемешивая. Затем центрифугируют 5 мин при 200 g и наконец суспендируют при комнатной температуре в роторе (10 качаний в минуту) или вручную (очень осторожно) .

Оценка результатов

- Клеточную суспензию (1—2 капли) наносят на сетку счетной камеры, используя для этого пипетку с широким носиком. После наложения покровного стекла производят подсчет розеток» нерозеткообразующих мононуклеаров (микроскопия). За РОК принимают клетки, несущие три и более эритроцита на своей поверхности. Часто встречаются розетки в виде морулы.
- Однако ее не следует путать с группами агглютинировавших эритроцитов, т. е. в центре морулы должна присутствовать ядерная клетка. Подсчитывают 200—300 клеток и вычисляют процент розеток. В норме ЕАС-розетки составляют 10— 20% клеток.

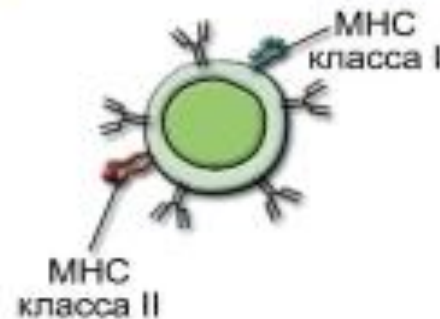
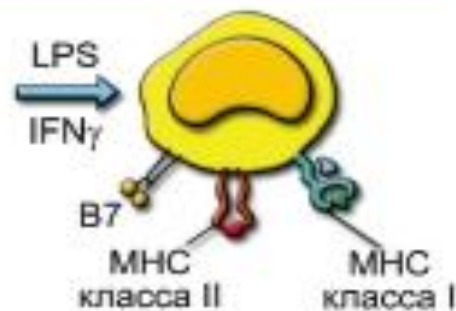
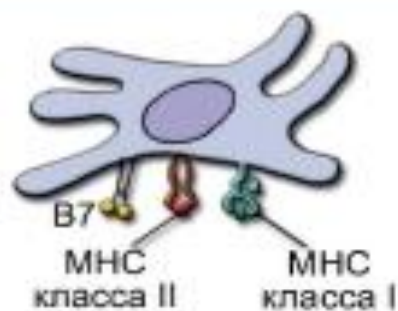
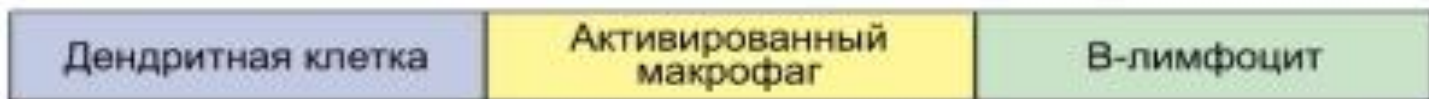


АНТИГЕНПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

- Молекулы МНС контролируют иммунный ответ. Так, МНС-II участвуют в презентации антигенов Т-клеткам (рис. 7-3, 7-4) и во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов. Антигены МНС-I и МНС-II связываются с поверхностными маркерами Т-клеток: МНС-I с CD8, а МНС-II - с CD4.

- **Профессиональные АПК.** Молекулы МНС-II экспрессированы только на определённых клетках, которые называют профессиональными АПК. Таких клеток у человека 3 типа: **ДК** костномозгового происхождения (ДК), **В-лимфоциты** и **макрофаги**. На их мембранах, помимо молекул МНС-I и МНС-II, присутствуют все корецепторные молекулы, необходимые для презентации антигена Т-клеткам. Они продуцируют цитокины, необходимые для активации Т-лимфоцитов и запуска иммунного ответа.

- **Эндотелий** тоже может выполнять функции АПК. Вероятно, экспрессия комплексов пептид-МНС на клетках эндотелия служит специфическим сигналом, привлекающим эффекторные лимфоциты из циркуляции в очаг поражения, обеспечивая антигенспецифичный хоминг.

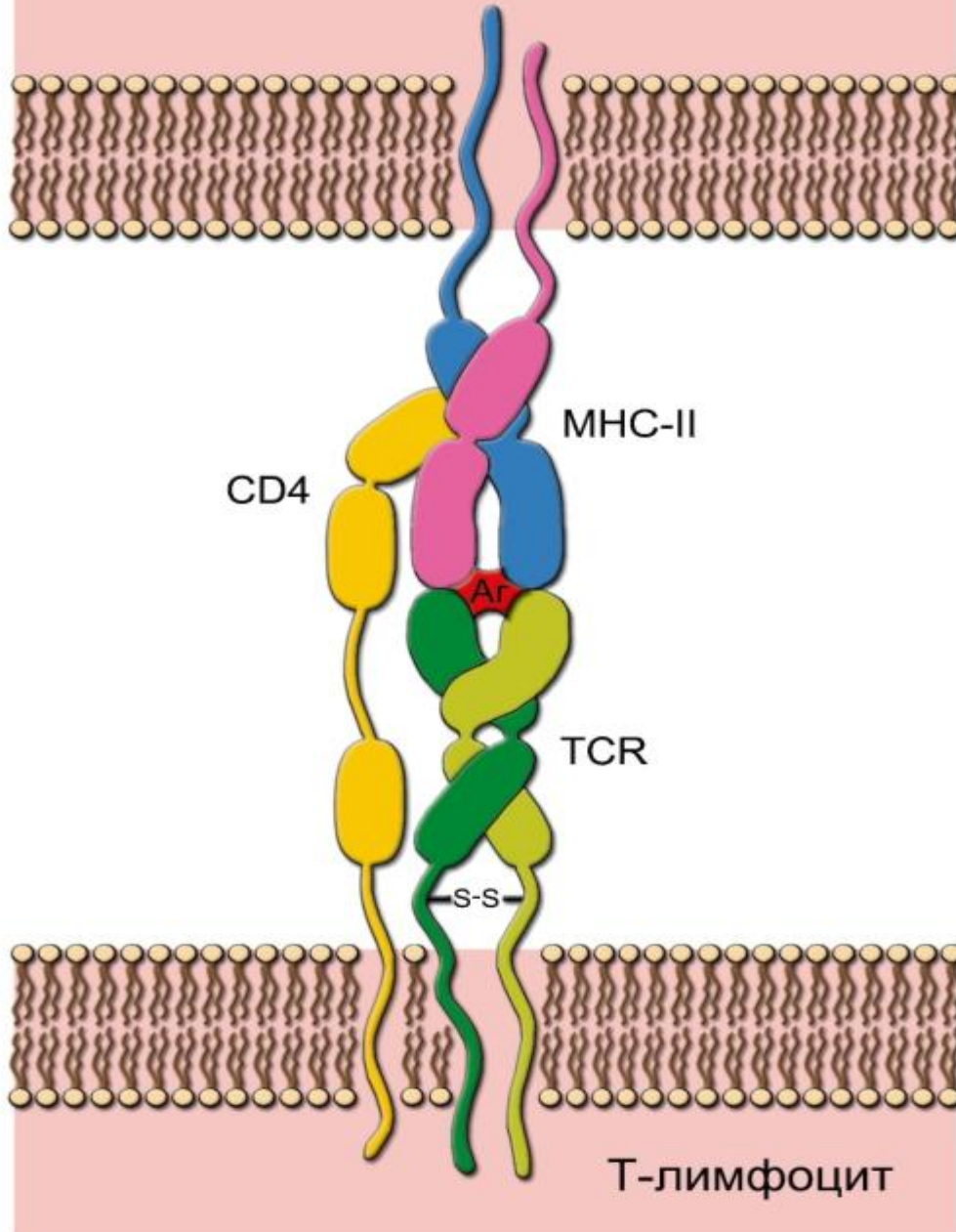


Рецептор для патогенов	TLR	TLR, рецептор для маннозы, рецептор для ЛПС	BCR, TLR
Тип презентруемых антигенов	Белки, вирусные антигены	Фагоцитируемые антигены	Растворимые антигены, вирусные антигены, токсины
Захват антигена	Пиноцитоз. Реже фагоцитоз	Фагоцитоз	Рецепторзависимый пиноцитоз
Экспрессия MHC-II	Спонтанная	Индукцированная	Спонтанная
Экспрессия B7 (CD80, CD86)	Спонтанная	Индукцированная	Индукцированная
Активация Т-клеток	Наивных, эффекторных и клеток памяти	Эффекторных и клеток памяти	Эффекторных и клеток памяти
Локализация в организме	Барьерные ткани, лимфоидные органы	Соединительная ткань, паренхима органов, полости	Лимфоидные органы, кровь, полости

Разновидности ДК: Миелоидные

- Происходят из моноцитов и экспрессируют маркер CD11c Их, вероятно, можно рассматривать как разновидность макрофагов, специализирующихся на презентации антигенов Т-лимфоцитам.

Антигенпрезентирующая клетка



- Распознавание антигена рецептором Т-лимфоцита. Каждая молекула МНС-II состоит из двух цепей - α и β . При помощи TCR Т-клетка распознаёт антиген, но только находящийся в комплексе с молекулой МНС. В случае Т-хелпера в процессе также участвует CD4, который свободным концом связывается с молекулой МНС. Распознаваемый Т-клеткой антиген имеет 2 участка: один взаимодействует с молекулой МНС, другой (эпитоп) связывается с рецептором Т-лимфоцита. Подобный же тип взаимодействия, но с участием CD8 характерен для процесса распознавания цитотоксическим Т-лимфоцитом антигена, связанного с молекулой МНС-I.

Разновидности ДК: Плазмоцитоидные ДК

- происходят от общей лимфоидной клетки-предшественника, из которой развиваются также Т- и В-лимфоциты, НК-клетки. Маркёры предшественников плазмоцитоидных ДК: ИЛ-3R α (вариант рецептора для ИЛ-3, или CD123), иммуноглобулиноподобные рецепторы - ILT3⁺ (CD85k) и ILT7⁺ (CD85g), а также BDCA-2 (CD303), BDCA-3 (CD141) и BDCA-4 (CD304).

- **Эндоцитоз.** ДК активно и непрерывно поглощают вещества из окружающей среды. При отсутствии патогена ДК поглощают вещества собственных тканей и презентируют этот материал Т-лимфоцитам **без корцепторного стимула.** В результате иммунный ответ в отношении собственных тканей не развивается и поддерживается состояние толерантности к «своему». ДК до активации представлены незрелыми формами, с низкой способностью презентировать антигены Т-лимфоцитам.

- **Активация.** ДК активируются (созревают) при проникновении патогена в организм и превращаются в зрелые ДК. В распознавании патогена при этом участвует TLR.
- - На миелоидных ДК, как и на макрофагах, присутствуют рецепторы для маннозы, ЛПС, а также TLR2 и TLR4, распознающие продукты грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно.
- - На плазмоцитоидных ДК присутствуют TLR7 и TLR9 (распознают вирусную и бактериальную ДНК), а также особый лектиновый рецептор, который связывает, например, вирус гриппа

Макрофаг-моноцит: Функция

- фагоцитарная защита организма против микробной инфекции; токсический эффект метаболитов макрофагов на паразитов в организме человека; участие в иммунном ответе организма и воспалении; регенерация тканей и противоопухолевая защита; регуляция гемопоеза; фагоцитоз старых и поврежденных клеток крови, регуляция продукции острофазных белков печенью.

- В тканях моноциты дифференцируются в тканевые макрофаги. Моноциты - макрофаги имеют аэробный гликолиз, обеспечивающий энергией их фагоцитарную активность. Макрофаги функционируют также в анаэробных условиях (например, в полости абсцесса), используя для генерации энергии гликолитический путь. Макрофаги распознают микроорганизмы, поврежденные клетки, медиаторы, гормоны, лимфокины с помощью рецепторов своей плазменной мембраны.

- Цитотоксическое действие на опухолевые клетки, токсоплазмы (кокцидии, паразитические простейшие), лейшмании и возбудителей малярии макрофаги оказывают супероксидом, перекисью водорода, гидроксильным радикалом и др.

- Макрофаги человека секретируют в кровь и тканевую жидкость более 100 биологически активных веществ с молекулярной массой от 32 (анион супероксида) до 440 000 (фибронектин).
Функция этих веществ: стимуляция пролиферации остеобластов и лимфоцитов, продукции фибробластами КСФ-ГМ (интерлейкин-1); регуляция гемопоэза и механизмов воспаления (КСФ-ГМ, КСФ-Г, эритропоэтин, простагландины, лейкотриены В, U, С, D, E, тромбоксан); цитотоксический и цитостатический эффекты на опухолевые клетки (опухольнекротизирующий фактор — ОНФ).
Наконец, интерлейкин-1 и ОНФ повышают температуру тела через терморегуляторные центры гипоталамуса.

- ***КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ***

ОБОСНОВАНИЕ

- Подразделение лимфоцитов человека на Т-лимфоциты, В-лимфоциты и естественные киллеры основано на их биологических функциях и на экспрессии ими поверхностных клеточных Аг, определение уровня которой называется фенотипированием. В основе метода лежит связывание флюоресцентно меченых моноклональных АТ поверхностными Аг лимфоцитов и учёт результатов с помощью проточного лазерного цитометра или люминесцентной микроскопии.

ЦЕЛЬ

- Подсчёт клеток определённой популяции, или спектра Ag, экспрессированных на данных клетках.

ПОКАЗАНИЯ

- Метод используют для количественной и качественной характеристики субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при наличии или подозрении на наличие иммунодефицитных состояний, развившихся на фоне воспалительных, гиперпластических и других процессов в органах женской репродуктивной системы.

ПОДГОТОВКА

- Из вены пациента берут кровь в пробирку с гепарином (20 Ед/мл).

МЕТОДИКА

- Кровь обрабатывают лизирующим раствором для разрушения эритроцитов или с помощью градиентного центрифугирования выделяют фракцию мононуклеарных клеток. Суспензию клеток инкубируют в темноте 15–30 мин с соответствующими флюоресцентно мечеными моноклональными АТ. Результаты регистрируют на проточном цитометре или с помощью люминесцентного микроскопа в течение не более 6 ч. Лимфоциты, фиксированные 1% параформальдегидом, можно хранить при +2–8 °С не более 24 ч.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

- Анализ позволяет оценить количество лимфоцитов в субпопуляции, результаты сопоставляют с нормативными показателями, рассчитывают соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов (иммунорегуляторный индекс), содержание активированных Т-лимфоцитов и др. Определение процентного соотношения Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток используют для характеристики иммунодефицитных и аутоиммунных состояний, опухолевых и вирусных заболеваний. Фенотипирование лимфоцитов применяют для подтверждения диагноза и мониторинга состояния иммунной системы пациентки в процессе лечения. Чувствительность и специфичность метода зависит от качества используемых реагентов.

ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА РЕЗУЛЬТАТ

- Результат зависит от времени, прошедшего с момента взятия крови. Необходимо проводить исследование в течение 6 ч после взятия крови с гепарином, при фиксации клеток — в течение 24 ч.