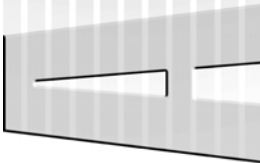




**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**Національний авіаційний університет**



## **ОСНОВИ ІМУНОЛОГІЇ**

**Лабораторний практикум  
для студентів напрямку підготовки  
6.051401 «Біотехнологія»**

**VIVERE!  
VINCERE!  
CREARE!**

**Київ 2015**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
Національний авіаційний університет

## ОСНОВИ ІМУНОЛОГІЇ

Лабораторний практикум  
для студентів напряму підготовки  
6.051401 «Біотехнологія»

Київ 2015

УДК 577.27 (076,5)  
ББК Е 074 я 7  
О 751

Укладачі: *К. Г. Гаркава, А. В. Дразнікова*

Рецензент *Н. Г. Бичкова*

*Затверджено методично-редакційною радою Національного авіаційного університету (протокол № 3/14 від 17.04.2014 р.).*

**Основи імунології** : лабораторний практикум / уклад. : К. Г. Гаркава,  
О 751 А. В. Дразнікова. – К. : НАУ, 2015. – 60 с.

Наведено методики виконання лабораторних робіт з курсу «Основи імунології» та коротке теоретичне обґрунтування кожного дослідження, а також запитання для самоперевірки з теоретичної та практичної частин.

Для студентів напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія».

## ВСТУП

---

Основи імунології – це наукова дисципліна, головною метою вивчення якої є надання студентам знань з основ імунології, що використовуються в сучасній фармацевтичній біотехнології, імунобіотехнології та промисловій біотехнології.

Основною метою викладання дисципліни «Основи імунології» є надання майбутнім фахівцям науково-теоретичних знань і практичних навичок зі знань про структуру і функції імунної системи, про розвиток імунітету, його форми, різні типи алергічних реакцій, імунологічну толерантність, систему гістосумісності та трансплантаційний імунітет, а також підготовка їх до самостійного прийняття своєчасних науково-обґрунтованих біотехнологічних рішень.

Практикум містить основні теоретичні відомості з кожної теми та порядок виконання лабораторних робіт. Під час виконання запропонованих дослідів студенти набувають навичок застосування імунологічних методів у експериментальних дослідженнях, умінь аналізувати отримані результати.

У практикумі викладено матеріал відповідно до двох модулів дисципліни: «Основні фактори неспецифічного і специфічного імунітету» та «Особливості розвитку імунологічної реакції».

Структура практикуму відповідає затвердженій робочій навчальній програмі з дисципліни «Основи імунології».

У лабораторних роботах викладено основні теоретичні відомості, перелічено основні матеріали, реактиви та обладнання, розписано порядок виконання роботи, запропоновано запитання, які потребують не лише запам'ятовування, але й аналітичного мислення від виконавців, допомагають пояснити отримані результати, що має важливе значення для підготовки студентів до самостійної роботи.

# Модуль I. ОСНОВНІ ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОГО І СПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ

---

## Лабораторна робота 1

### ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРАЦІ В ІМУНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ З ЖИВИМИ ОБ'ЄКТАМИ ТА БІОЛОГІЧНИМ МАТЕРІАЛОМ

**Мета роботи** – засвоїти техніку безпеки праці в імунологічній лабораторії та ознайомитися з правилами роботи з живими об'єктами та біологічним матеріалом.

#### Завдання

1. Охарактеризувати вимоги до роботи в імунологічній лабораторії.
2. Обґрунтувати правила роботи в імунологічній лабораторії.
3. Обґрунтувати правила роботи з радіоактивними сполуками в імунологічній лабораторії.
4. Проаналізувати способи імунізації лабораторних тварин.
5. Проаналізувати способи отримання крові лабораторних тварин.
6. Провести серійні розведення антисироватки та визначити титр антитіл макро- та мікротитруванням.

#### 1.1. Заходи безпеки та робота з живими об'єктами і біологічним матеріалом в імунологічній лабораторії

##### Основні теоретичні відомості

###### *1. Вимоги до роботи в імунологічній лабораторії*

Підготовці до імунологічних досліджень треба приділяти багато уваги. При виконанні імунологічних досліджень потрібна висока точність і стерильність. Лабораторія повинна мати гарну вентиляцію і розташовуватися в такому приміщенні, яке має стіни, підлогу, лабораторні столи, що легко миються. Норма площі для кожного співробітника становить 12–14 м<sup>2</sup>, а робоче місце – 0,9 м<sup>2</sup>.

У лабораторії повинна бути кімната для виділення і посіву бактерій, а також бокси для роботи з культурами клітин і тканин,

спеціально обладнані місця для проведення імунохімічних і біохімічних досліджень. В окремих приміщеннях слід зберігати матеріали для роботи в імунологічній лабораторії, реактиви, мити лабораторний посуд, а також утримувати тварин.

В імунологічній лабораторії мають бути такі прилади: водяні бані, сушильні шафи, рН-метри, терези, центрифуги, холодильники, термостати, автоклави, мікроскопи, люмінесцентні мікроскопи, спектрофотометри, фотоколориметри, прилади для імуоелектрофорезу та імуоферментного аналізу, дозатори, гомогенізатори.

Також лабораторії мають бути оснащені таким посудом: пробірками різної місткості, колбами мірними, плоскодонними, лійками, ділильними лійками, хімічними склянками, мірними циліндрами, піпетками пастеровськими і градуйованими, кристалізаторами, ексікаторами, чашками Петрі, флаконами різної місткості.

Лабораторний посуд миють розчином миючого засобу, а потім занурюють у хромову суміш (50 г біхромату калію, 100 г концентрованої  $H_2SO_4$ , 1000 мл води), після чого промивають водою. Сушать посуд за кімнатної температури або у сушильній шафі, потім зберігають у спеціальних лабораторних шафах для посуду.

В імунологічній лабораторії використовують різноманітні матеріали: штативи, шприци різної місткості, ватно-марлеві і гумові пробки, капронову сітку, вату, марлю.

Стерилізацію проводять в автоклаві, а інструменти та шприци можуть стерилізуватися кип'ятінням. Для цього їх кладуть у металічний стерилізатор, в який заливають дистильовану воду і кип'ятять упродовж 20–30 хв.

Для культивування лімфоцитів використовують такі середовища: Ігла, Хенкса, 199, RPMI-1640, обов'язковим компонентом для культивування є ембріональна теляча сироватка. В культуральне середовище обов'язково додають антибіотики для пригнічення росту бактерій.

## *2. Правила роботи в імунологічній лабораторії*

1. Усі роботи проводять у халатах. При роботі з кров'ю використовують гумові рукавиці.

2. У лабораторії їдять у спеціально відведених місцях.

3. Після роботи мийть руки з милом і використовуйте дезінфікуючі розчини.

4. Посуд та матеріали, які використовували для роботи, обробляють дезінфекційними розчинами або стерилізують у спеціальних апаратах.

5. Дезінфекційними розчинами обробляють робочі місця.

6. Групи тварин спалюють або відносять в спеціальні контейнери після обробки їх дезінфекційними засобами.

*3. Правила роботи з радіоактивними сполуками в імунологічній лабораторії*

1. Робота з радіоактивними сполуками проводиться в радіоізотопному боксі.

2. Радіоізотопи зберігають у закритих контейнерах.

3. Із ізотопами можуть працювати лише люди, які мають на це медичне і юридичне право.

4. Для роботи з ізотопами треба мати спецодяг.

5. Працювати з ізотопами треба обережно, щоб вони не потрапили на тіло, одяг, робочі столи та обладнання.

6. Забруднивши тіло, одяг, підлогу радіоактивними сполуками, необхідно вимити їх водою з милом, детергентом або спеціальними миючими засобами, перевірити після цього радіометричною апаратурою і обов'язково попередити відповідального за радіаційну безпеку.

7. Після роботи з радіоактивними сполуками треба прибрати робоче місце і дезактивувати посуд, інструменти, обладнання і за потреби – одяг.

8. Забороняється викидати та виливати радіоактивні відходи у сміттєві ящики і каналізацію загального користування.

*4. Робота з тваринами в імунологічній лабораторії*

Для імунологічних досліджень найчастіше використовують мишей, шурів, морських свинок, кроликів, рідше баранів, віслуків, свиней, курей, качок. Тварин розміщують в клітках у віварії, для якого відводять сухі, добре освітлені і вентилязовані приміщення. Підлогу у віварії роблять з нахилом до каналізаційного стоку, стіни обкладають кахлями. Вибір тварин для імунологічних дослідів має особливе значення. Необхідно зважати на загальну й індивідуальну специфіку розвитку імунологічної реакції організму на той чи інший антиген. Головними критеріями при виборі тварин є вид,

лінія, розміри, вік, генетичні й анатомічні особливості. Для отримання адекватних результатів за мінімальної кількості тварин бажано використовувати чистолінійних тварин. Чистолінійними тваринами вважають гомозиготних тварин, отриманих у результаті схрещування близьких родичів упродовж 20 і більше поколінь. На сьогодні відомо майже 200 ліній мишей, 20 ліній щурів, 7 ліній морських свинок і декілька ліній кроликів. У імунологічних дослідженнях частіше використовують мишей ліній СВА, С57BL, СЗН, щурів Вістар, Август. Чистолінійні тварини дуже примхливі та мають понижено життєздатність, тому вони вимагають особливих умов харчування, утримання і догляду. У дослідах треба використовувати лише здорових тварин однакової ваги, статі та віку.

Під час досліду тварин нумерують. При роботі з тваринами треба уникати стресових ситуацій, оскільки вони можуть змінити імунологічну реакцію організму на той чи інший антиген.

#### *5. Способи імунізації лабораторних тварин*

1. Внутрішньошкірне введення. Перед введенням антигену шерсть зі шкіри видаляють ножицями, шкіру обробляють спиртом і майже паралельно до поверхні тіла проколюють шкіру тонкою гострою голкою та вводять в одну точку 100 мкл розчинного антигену, який легко через лімфосудини досягає регіональних лімфатичних вузлів і індукує в них імунологічну відповідь.

2. Підшкірне введення. Місце для ін'єкції готують так само, як і при внутрішньошкірному введенні. Пальцями збирають шкіру в складку, біля її основи вводять голку, яку потім відхиляють убік, вливають розчин антигену і витягують її під гострим кутом, щоб не вилився розчин антигену. Цю ін'єкцію краще робити в бічну поверхню спини та живота. Максимальна доза для мишей – 1 мл, для щурів – 10 мл, морських свинок – 15 мл, кроликів – 30 мл. За таким способом імунізації антиген поширюється повільно, тому що підшкірна клітковина не має розвинених лімфатичних протоків.

3. Внутрішньом'язове введення. Антиген вводять у м'язи стегна, заздалегідь обробивши місце введення антигену спиртом. Для мишей максимальна доза – 0,5 мл, для щурів – 3 мл, морських свинок – 5 мл, кроликів – 8 мл.

4. Внутрішньочеревне введення. Тварин фіксують головою вниз, щоб знизити ймовірність проколу кишечника. Трохи



відступивши від середньої лінії живота, у задній треті черевної порожнини проколюють стінку притупленою голкою. Кількість розчину антигену не повинна перевищувати для мишей 2 мл, щурів – 5 мл, морських свинок – 10 мл, кроликів – 30 мл.

5. Внутрішньовенне введення. Мишам і щурам вводять у бокову вену хвоста. Для набухання судин хвіст нагрівають на водяній бані за температури 50–55 °С. Кроликам антиген вводять у крайову вену вуха.

6. Інтраназальне введення антигену. Зафіксовану тварину наркотизують ефіром і за допомогою шприца або піпетки каплями вливають у ніс розчин антигену. Мишам вводять 0,03–0,05 мл антигену, щурам – 0,05–0,1 мл, морським свинкам – 0,2–0,4 мл, а кроликам – до 1 мл.

7. Оральне введення. Як правило, за такого способу імунізації антиген вводять через резиновий чи металевий зонд або через шприц, голка якого має голівку у вигляді оливи.

#### *6. Способи отримання крові у лабораторних тварин*

1. У мишей та щурів кров можна взяти з хвоста, перед цим нагрівши його на водяній бані за температури 50–55 °С, а потім надрізавши кінчик хвоста. Після забору крові рану обробляють розчином 3 %-го пероксиду водню або 5 %-м розчином йоду.

2. Досить поширеним способом забору крові у мишей та щурів є отримання крові із ретроорбітального венозного сплетіння за допомогою пастерівської піпетки. Пастерівською піпеткою проколюють кон'юнктиву внутрішнього кута ока і вводять її за очне яблуко на глибину 2–4 мм. Після проколу кров надходить у піпетку із венозного сплетіння.

3. Кров із серця можна брати у мишей, щурів, морських свинок, кролів. Перед цим тварину наркотизують, фіксують животом догори. На місці проколу вистригають шерсть, шкіру дезинфікують етанолом. Пальпацією визначають місце серцевого удару і відступивши 2–5 мм ліворуч від грудини, роблять прокол, вводять голку за напрямом середньої лінії на глибину 0,5–1,0 см. Після забору крові із серця тварині підшкірно вводять подвійний об'єм ізотонічного розчину хлориду натрію, підігрітого до температури тіла тварини.

4. Кров у кроликів можна взяти також із вушної крайової вени. Кров збирають стерильним шприцом або у пробірку.

## 1.2. Приготування серійних розведень

### Основні теоретичні відомості

Серійні розведення – це набір розведень, за якого фактор розведення є однаковим на кожному етапі. Серійні розведення використовуються для приготування розчинів з високим ступенем розведення при застосуванні невеликої кількості пробірок та мінімального об'єму розчинника. Ця процедура часто використовується при визначенні титру антитіл у сироватці крові. Традиційно в цій методиці використовували серологічні піпетки, проте сьогодні широко застосовують автоматичні мікропіпетки. Необхідно приготувати серію подвоєнних розведень антисироватки за допомогою традиційних серологічних піпеток і автоматичних мікропіпеток та порівняти отримані результати.

**Обладнання, прилади та матеріали:** анти-А або анти-В антисироватка, серологічні піпетки об'ємом 1 мл, автоматичні мікропіпетки, пластикова мікротитрувальна планшета, пробірки розміром 12×75 мм, фізіологічний розчин, гепарин, 4 %-на суспензія еритроцитів II або III групи крові, центрифуга та пробірки до неї.

### Порядок виконання

#### 1.2.1. Макротитрування

1. Готують розведення 1:10 анти-А (анти-В) антисироватки шляхом додавання 1 мл анти-А (анти-В) антисироватки до 9 мл фізіологічного розчину.

2. За відсутності комерційного препарату еритроців готують 4 %-ну суспензію еритроцитів, використовуючи кров відповідної групи. Кров збирають у центрифужну пробірку з позначками об'єму, додають гепарин як антикоагулянт та центрифугують упродовж 10 хв при 1500 об/хв. Обережно видаляють сироватку та додають фізіологічний розчин до еритроцитів, що залишилися на дні пробірки. Знову проводять центрифугування упродовж 10 хв та визначають колір верхнього шару фізіологічного розчину. Фізіологічний розчин видаляють та еритроцити ресуспендують в додатковому об'ємі фізіологічного розчину, при цьому всі еритроцити мають бути однорідно ресуспендовані. Процедуру повторюють тричі або доти, поки фізіологічний розчин стане

прозорим. Визначають кінцевий об'єм ущільнених центрифугуванням еритроцитів та готують 4 %-ну суспензію еритроцитів, розбавляючи їх фізіологічним розчином.

3. Вісім пробірок розміром 12×75 мм позначають так: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280.

4. Використовуючи серологічну піпетку, дають 0,2 мл фізіологічного розчину до пробірок з другої до восьмої.

5. За допомогою нової серологічної піпетки додають 0,2 мл анти-А (анти-В) антисироватки до першої та другої пробірок.

6. Новою піпеткою перемішують вміст другої пробірки шляхом збирання та випускання рідини 5–10 разів.

7. 0,2 мл розчину переносять з другої пробірки до третьої та перемішують піпетуванням.

8. Послідовно повторюють процес внесення аліквот та перемішування вмісту всіх наступних пробірок (рис. 1.1). Після перемішування вмісту восьмої пробірки видаляють 0,2 мл розчину для встановлення однакових об'ємів рідин у всіх пробірках.

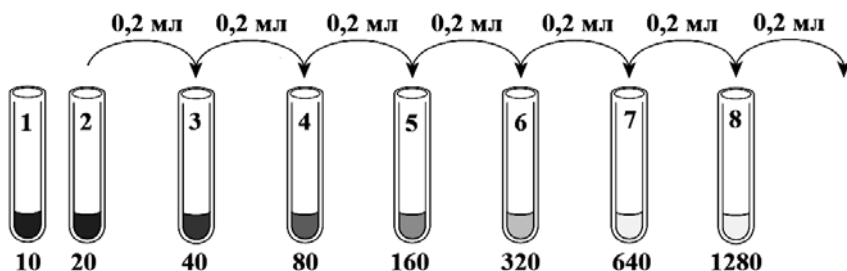


Рис. 1.1. Схема приготування серійного розведення антисироватки

9. До кожної пробірки додають 0,2 мл 4 %-ї суспензії еритроцитів відповідної групи крові.

10. Пробірки центрифугують упродовж 30–45 с.

11. Аглютинацію визначають, обережно струшуючи ущільнені центрифугуванням еритроцити на дні пробірок. Позитивна реакція визначається, якщо клітини залишаються зчепленими разом при струшуванні. Розмір кластера зчеплених еритроцитів зменшується у пробірках з високим ступенем розведення антисироватки, однак будь-який видимий клітинний кластер вважається позитивним результатом.

### 1.2.2. Мікротитрування

1. Маркером позначають один ряд лунок пластикової мікротитрувальної планшети так: 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280.

2. За допомогою автоматичної мікропіпетки додають 20 мкл фізіологічного розчину до лунок планшети з другої до восьмої.

3. Мікропіпеткою з новим наконечником додають 20 мкл анти-А (анти-В) антисироватки до першої та другої лунки.

4. Використовуючи новий наконечник мікропіпетки, перемішують вміст другої лунки шляхом декількаразового вбирання та випускання розчину. Потім відбирають 20 мкл розчину з другої лунки та переносять його до третьої лунки.

5. Процедуру розведення повторюють для всіх лунок, щоразу використовуючи новий наконечник мікропіпетки.

6. До кожної позначеної лунки додають 20 мкл 4 %-ї суспензії еритроцитів II або III групи крові.

7. Планшету струшують колоподібними рухами на поверхні столу упродовж 1 хв та витримують за кімнатної температури упродовж 30 хв.

8. Визначають лунки, де відбулася аглютинація еритроцитів, тримаючи планшету проти джерела світла. Рівні краї суспензії на дні лунки вказують на відсутність аглютинації, а нерівні, зубчаті, шорсткі краї свідчать про те, що аглютинація відбулася (рис. 1.2).

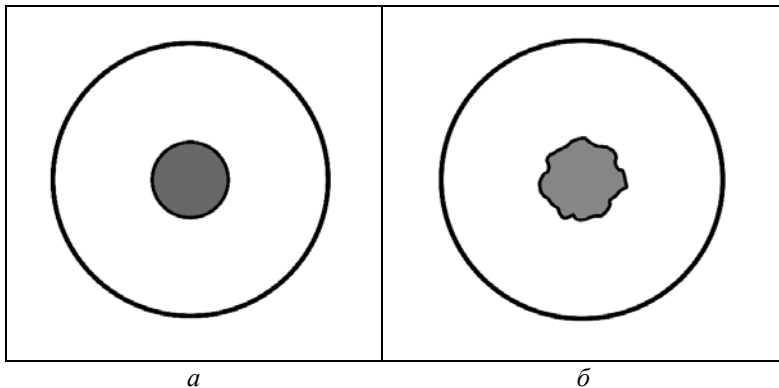


Рис. 1.2. Результати аглютинації в мікротитрувальній планшеті:  
*a* – негативний результат; *б* – позитивний результат

## **Обробка експериментальних даних**

Титр антитіл визначається за останньою пробіркою з видимою аглютинацією. Титр записується як значення, зворотне до розведення, наприклад, якщо пробірка 1:160 є останньою з позитивним результатом, титр записується як 160.

Титр антитіл при мікротитруванні визначається за останньою лункою, де відбулася аглютинація.

## **Аналіз отриманих результатів**

Результати дослідів з макро- та мікротитрування порівнюють. Визначений двома методами титр антитіл може відрізнитися лише на одне розведення.

## **Запитання для самоперевірки**

1. Які правила роботи в імунологічній лабораторії?
2. Які особливі умови роботи з радіоактивними речовинами в лабораторії?
3. Яких тварин використовують для імунологічних досліджень? Як необхідно з ними працювати, як їх утримувати?
4. Які існують способи імунізації тварин?
6. У чому полягають переваги та недоліки макро- і мікротитрування?

**Джерела:** [1]; [9].

## **Лабораторна робота 2**

### **ОЦІНКА АКТИВНОСТІ ГУМОРАЛЬНИХ ФАКТОРІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ**

**Мета роботи** – оцінити активність гуморальних факторів неспецифічної резистентності організму на прикладах анти-мікробної активності лізоциму з різних джерел та тесту на визначення схильності до карієсу.

## **Завдання**

1. Визначити активність ферментів неспецифічної резистентності організму.
2. Порівняти активність лізоциму з різних джерел.
3. Приготувати поживне середовище Снайдера.
4. Підготувати та простерилізувати лабораторний посуд.
5. Визначити схильність людини до розвитку у неї карієсу.

## 2.1. Оцінка активності ферментів неспецифічної резистентності організму

### Основні теоретичні відомості

Клітини організму людини синтезують безліч сполук з антимікробною активністю. Серед них вирізняють два найважливіші білки вродженого імунітету людини – лізоцим та комплемент. Комплемент є важливим компонентом у взаємодії антитіл з мембраною патогенних мікроорганізмів. Лізоцим – протеолітичний фермент, що міститься в слюзах, слині та носових виділеннях. Він також наявний у фагоцитах як біоцидний агент, яєчному білку (3,5 % білка, перерахованого на суху масу) та молоці (13 г/ 100 мл).

Механізм антимікробної дії лізоциму ґрунтується на його здатності руйнувати пептидоглікановий шар клітинної стінки бактерій, тим самим ослаблюючи та руйнуючи патогенні організми. Лізоцим особливо активний проти грампозитивних бактерій, у яких пептидоглікановий шар клітинної стінки розташований зовні.

У промисловості препарати лізоциму використовуються як природні консерванти.

**Обладнання, прилади та матеріали:** стерильні чашки Петрі, пробірки, склянки, піпетки, диски фільтрувального паперу, дистильована вода, культури грампозитивних *Micrococcus luteus* та грамнегативних *Escherichia coli* бактерій, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, свіжий яєчний білок, стандартизований препарат лізоциму з активністю 60 000 од/мг, дві пробірки з 20 мл м'ясопептонного агару (МПА) в кожній, пробірка з 20 мл середовища Сабуро, пінцет, спиртівка, термостати, лінійка.

### Порядок виконання

1. Маркером розділяють нижню частину трьох стерильних чашок Петрі на чотири сектори: «слина», «сльози», «яєчний білок», «препарат лізоциму». Також на чашках Петрі зазначають назву культури мікроорганізмів, дату та прізвища виконавців досліду.

2. У стерильних умовах готують суспензії мікроорганізмів та піпеткою вносять 1 мл суспензії у відповідні чашки Петрі. Розтоплене та охолоджене до 50 °С поживне середовище МПА виливають у чашки Петрі з бактеріальними суспензіями, а поживне середовище Сабуро – в чашку Петрі з суспензією дріжджів. Вміст

чашок Петрі обережно перемішують круговими рухами на горизонтальній поверхні для рівномірного розподілу клітин мікроорганізмів у шарі поживного середовища. Чашки Петрі залишають на горизонтальній поверхні до повного застигання поживного середовища.

3. Слину та сльози збирають у стерильні хімічні склянки. Білок яйця обережно відділяють від жовтка та вносять в окрему стерильну склянку. Стандартизований препарат лізоциму з активністю 60 000 од/мг розводять у 10 разів. Так отримують лізоцим з чотирьох різних джерел.

4. Стерильним пінцетом беруть диск фільтрувального паперу, змочують його в одному з досліджуваних джерел лізоциму та обережно кладуть на поверхню поживного середовища у відповідному секторі чашки Петрі. Процедуру повторюють для всіх джерел лізоциму з трьома чашками Петрі, попередньо інкульованими мікроорганізмами.

5. Чашки Петрі з *E. coli* та *M. luteus* термостатують упродовж 24 год за температури 37 °С, а чашку Петрі з *S. cerevisiae* – упродовж 48 год за температури 37 °С.

### Обробка експериментальних даних

1. За допомогою лінійки визначають діаметр зони інгібування росту мікроорганізмів навколо дисків фільтрувального паперу, змочених у різних джерелах лізоциму. Результати заносять до табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Антимікробна активність лізоциму з різних джерел

Мікроорганізм	Діаметр зони інгібування, мм			
	Слина	Сльози	Яєчний білок	Препарат лізоциму
<i>E. coli</i>				
<i>M. luteus</i>				
<i>S. cerevisiae</i>				

2. Розраховують активність лізоциму слини, сліз та яєчного білка шляхом порівняння квадратів діаметрів зон інгібування росту мікроорганізмів навколо дисків фільтрувального паперу, змочених досліджуваними об'єктами з квадратом діаметра зони інгібування

росту мікроорганізмів навколо диска, змоченого стандартизованим препаратом лізоциму. Результати заносять до табл. 2.2.

Таблиця 2.2

### Одиниці активності лізоциму різних джерел

Мікроорганізм	Активність лізоциму, од./мг		
	Слина	Сльози	Яечний білок
<i>E. coli</i>			
<i>M. luteus</i>			
<i>S. cerevisiae</i>			

## 2.2. Тест Снайдера на схильність до карієсу

### Основні теоретичні відомості

Емаль та дентин при формуванні зубного карієсу руйнуються через продукування молочної кислоти бактеріями (*Streptococcus mutans* та ін.) та за наявності у ротовій порожнині високого рівня сахарози. Серед всіх методів визначення схильності до утворення карієсу тест М. Л. Снайдера є відносно простим у виконанні та має досить високу надійність.

Метод ґрунтується на здатності мікроорганізмів слини знижувати рівень рН поживного середовища, що містить 2 % глюкози (середовище Снайдера, див. дод. 1). Оскільки декальцинація емалі починається при значеннях рН 5,5 та швидко прогресує зі зниженням рівня рН до 4,4 і нижче, зниження рівня рН поживного середовища зі слиною є ознакою схильності до утворення карієсу. Для ідентифікації процесу продукування молочної кислоти мікроорганізмами до середовища додається індикатор бромкрезоловий зелений. Цей індикатор має зелений колір при рН 4,8 та набуває жовтого кольору при рН 4,4, залишаючись жовтим і за нижчих значень рН.

Надійність тесту підвищується за його щоденного проведення впродовж трьох днів в один і той самий проміжок часу. Якщо тест виконується відразу після чищення зубів, а не через дві-три години, його надійність знижується.

**Обладнання, прилади та матеріали:** агаризоване середовище Снайдера (див. дод. 1), стерильні пробірки, склянки об'ємом 10–50 мл, піпетки об'ємом 1, 2, 10 мл, спиртівки, термостат, водяна баня, колбонагрівник, сухожарова шафа.



## Порядок виконання

1. Підготовчі роботи потрібно проводити на попередньому занятті. Для цього у стерильній колбі готують необхідний об'єм поживного середовища Снайдера (див. дод. 1) та передають його для автоклавовання. Хімічні склянки об'ємом 10–50 мл і піпетки об'ємом 1–2 мл загортають у папір та стерилізують у сухожаровій шафі за температури 180 °С упродовж 1 год.

2. На наступному занятті автоклавоване середовище Снайдера розтоплюють, охолоджують до температури 50–55 °С та за стерильних умов розливають по 5 мл у пробірки.

3. Слину збирають у стерильну хімічну склянку та ретельно перемішують для рівномірного розподілу мікроорганізмів, які у ньому містяться.

4. Стерильною піпеткою відбирають 0,2 мл слини та обережно, не торкаючись стінок пробірки, вносять її в охолоджене до 50 °С середовище Снайдера. Перед тим, як середовище застигне, вміст пробірки ретельно перемішують, обертаючи пробірку між долонями рук (рис. 2.1). Пробірку підписують.

5. Пробірки з усіма зразками слини терmostатують за температури 37 °С, визначаючи кожні 24 год зміни кольору індикатора бромкрезолового зеленого на жовтий. Якщо колір змінився, тест вважається позитивним.

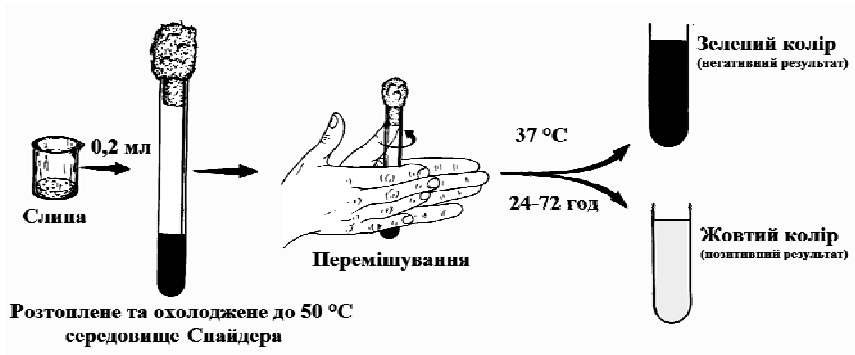


Рис. 2.1. Тест Снайдера на схильність до карієсу

## Обробка експериментальних даних

Ступінь схильності до карієсу визначають за допомогою табл. 2.3.

Таблиця 2.3

### Ступінь схильності до карієсу за тестом Снайдера

Ступінь схильності до карієсу	Термін зміни кольору індикатора, год		
	24	48	72
Значний	Позитивний		
Помірний	Негативний	Позитивний	
Слабкий	Негативний	Негативний	Позитивний
Відсутній	Негативний	Негативний	Негативний

### Аналіз отриманих результатів

Порівняти активність різних гуморальних факторів неспецифічної резистентності організму. Побудувати діаграму сукупності факторів гуморального імунітету організму та їх відносної активності.

### Запитання для самоперевірки

1. Який механізм дії лізоциму на бактеріальні клітини?
2. У чому полягає різниця у дії лізоциму та пеніциліну на бактеріальні клітини?
3. Які фактори визначають наявність та кількість бактерій у ротовій порожнині?
4. Які фактори впливають на надійність тесту Снайдера?
5. Що спричиняє зміну кольору індикатора в поживному середовищі Снайдера?

Джерела: [7]; [8]; [11].

### Лабораторна робота 3

## ОСНОВНІ ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ. ТИМУС, КІСТКОВИЙ МОЗОК, СЕЛЕЗІНКА, ЛІМФАТИЧНІ ВУЗЛИ, КРОВ. ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ ОСНОВНИХ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ ОРГАНІВ

**Мета роботи** – визначити морфологічні та функціональні особливості органів імунної системи.

### Завдання

1. Визначити загальну структуру органів імунної системи людини, а також розташування і морфологію основних імунокомпетентних органів.

2. Проаналізувати морфологічні особливості селезінки при мікроскопуванні зрізу селезінки миші.

3. Ідентифікувати різні типи клітин у мазку периферичної крові людини.

### Основні теоретичні відомості

Матеріальним субстратом імунної системи є інкапсульована (лімфовузли) та дифузно розсіяна лімфоїдна тканина. Зважаючи на це, імунну систему нерідко ототожнюють з лімфоїдною системою. В імунній системі виділяють центральні (первинні) та периферичні (вторинні) органи імунітету. *Центральними* називаються ті органи, в яких відбувається формування та дозрівання В- та Т-клітин, здатних розпізнавати антиген, а *периферичними* – органи, де ці клітини потім функціонують.

Центральними органами імунітету є тимус та фабрицієва бурса (сумка) у птахів, а у ссавців – кістковий мозок; периферичними – лімфатичні вузли, селезінка, а також скупчення лімфоїдної тканини слизових оболонок.

Функціонуючою основою імунної системи є Т-, В-клітини, макрофаги, дендритні та інші допоміжні антигенпрезентуючі клітини (АПК).

**Обладнання, прилади та матеріали:** мікроскоп, імерсійне масло, вата, етанол, препарати зрізів селезінки, препарати периферичної крові.

## Порядок виконання

1. Порівняти органи імунної системи миші (рис. 3.1) та людини.

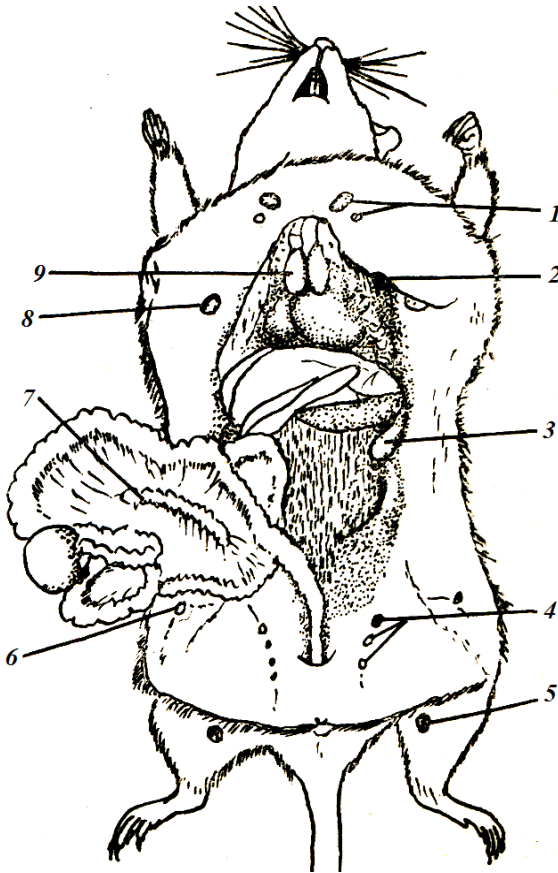


Рис. 3.1. Топографія лімфоїдних органів мишей: 1 – поверхневий шийний лімфатичний вузол; 2 – пахвовий лімфатичний вузол; 3 – селезінка; 4 – глибокий пахвовий та стегновий лімфатичні вузли; 5 – підколінний лімфатичний вузол; 6 – поверхневий пахвовий лімфатичний вузол; 7 – брижовий лімфатичний вузол; 8 – плечовий лімфатичний вузол; 9 – тимус

2. Замалювати органи імунної системи відповідно до рис. 3.2, підписати всі органи та охарактеризувати їх будову, функції та зв'язок з іншими органами.

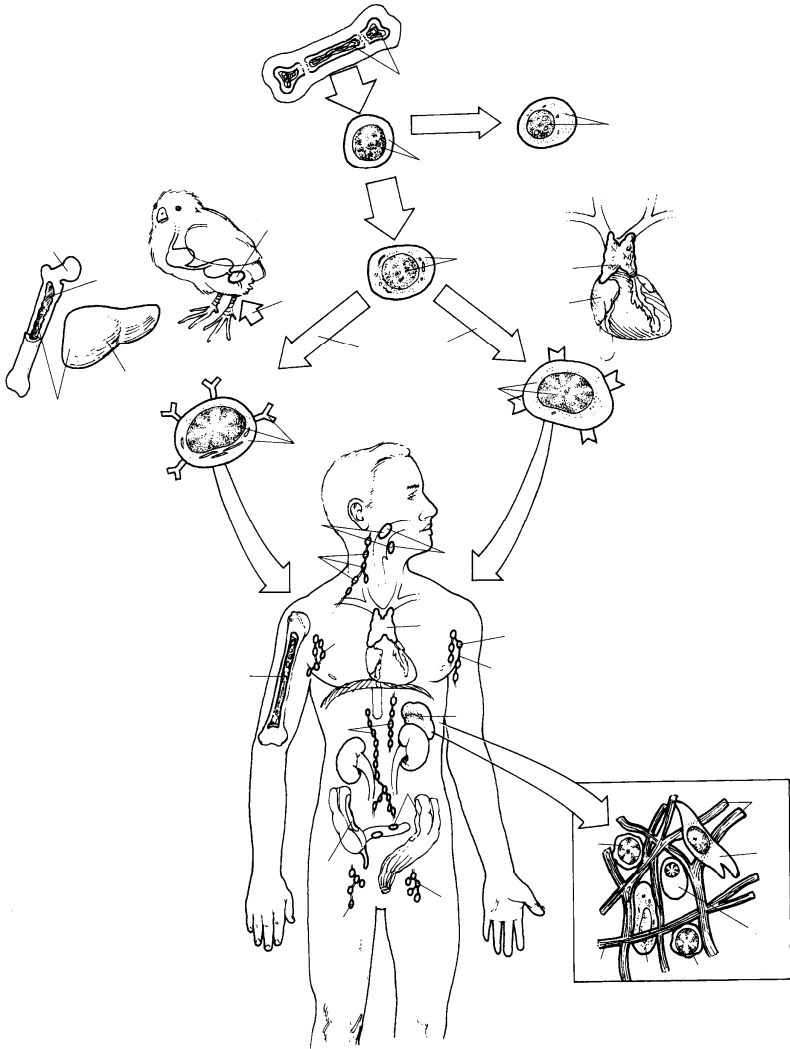


Рис. 3.2. Будова імунної системи

3. При мікроскопуванні препаратів зрізів селезінки спочатку необхідно встановити загальну орієнтацію тканини (рис. 3.3) при малому збільшенні мікроскопа. Потім знайти білу та червону пульпи і диференціювати окремі клітини всередині пульпи.

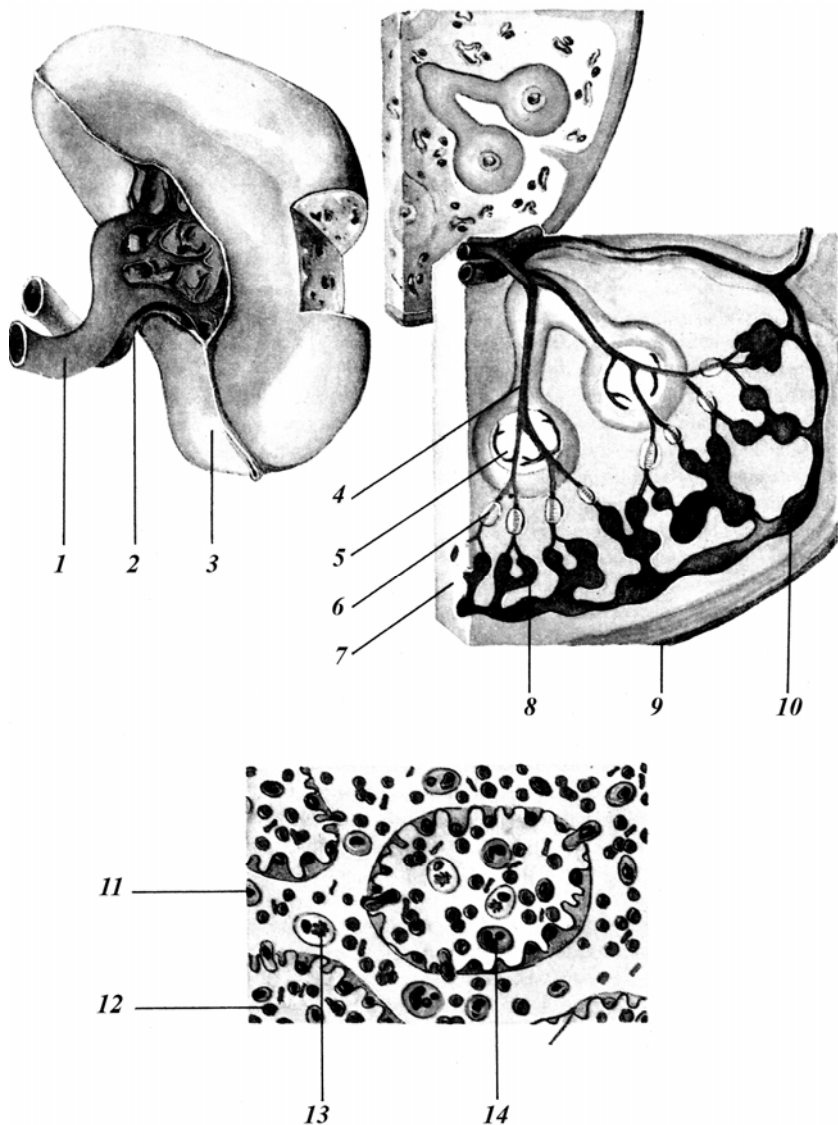
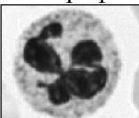
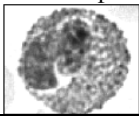
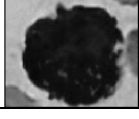
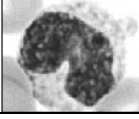
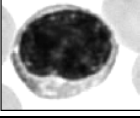


Рис. 3.3. Будова селезінки: 1 – артерія селезінки; 2 – вена селезінки; 3 – черевний покрив; 4 – центральна артерія; 5 – біла пульпа; 6 – закупорка судин; 7 – червона пульпа; 8 – синус; 9 – оболонка; 10 – периферичний синус; 11 – лейкоцити; 12 – еритроцити; 13 – плазматична клітина; 14 – моноцит

4. Під мікроскопом розглянути мазок периферичної крові, зафарбований барвником Романовського–Гімзи. Знайти п'ять типів лімфоцитів відповідно до дод. 2 та табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Морфологічні особливості лейкоцитів**

Тип клітин	Характерні особливості будови (середній діаметр, мкм)	Кількість клітин/мм <sup>3</sup> (частка від загальної кількості лейкоцитів, %)
<b>Гранулоцити</b>		
Нейтрофіл 	Сегментоване ядро, невеликі цитоплазматичні гранули (10–14)	3000–7000  (35–71)
Еозинофіл 	Дводольне ядро, великі цитоплазматичні гранули (10–14)	100–400  (0–4)
Базофіл 	Стиснене U- або S-подібне ядро, великі цитоплазматичні гранули (10–12)	20–50  (0–2)
<b>Агранулоцити</b>		
Моноцит 	U- або ниркоподібне ядро, без видимих гранул (15–20)	100–700  (1–10)
Лімфоцит 	Велике, округле ядро, що займає до 90 % об'єму клітини, цитоплазми майже не видно (5–17)	1500–3000  (24–44)

**Оформлення результатів експерименту**

Результати мікроскопування препаратів селезінки та периферичної крові замальовують або фотографують, позначаючи всі ідентифіковані компоненти.

## **Аналіз отриманих результатів**

Зробити висновки щодо подібності та відмінності будови імунної системи людини та миші. Охарактеризувати значення імунокомпетентних органів та клітин.

Визначити лейкоцитарну формулу досліджуваних зразків крові та порівняти отримані значення з даними табл. 3.1.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Який основний критерій класифікації органів імунної системи?
2. Які існують первинні та вторинні органи імунної системи?
3. Як класифікують імунокомпетентні клітини?
4. У чому полягає функція селезінки? Як анатомічна будова селезінки забезпечує її функції?

**Джерела:** [1]; [2]; [4].

## **Лабораторна робота 4**

### **ВИЗНАЧЕННЯ В СИРОВАТЦІ КРОВІ АНТИТІЛ РІЗНИХ КЛАСІВ**

**Мета роботи** – визначити рівень імуноглобулінів у сироватці крові методом радіальної дифузії в гелі (методом Манчіні).

#### **Завдання**

1. Приготувати реактиви та посуд.
2. Побудувати калібрувальну криву залежності діаметра кілець преципітації від стандартних концентрацій імуноглобулінів.
3. Визначити рівень імуноглобулінів у сироватці крові.

#### **Основні теоретичні відомості**

Антитіла – це білки, що належать до того чи іншого класу імуноглобулінів, синтез яких стимулюється після парентерального введення антигену. Відомо п'ять класів антитіл: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. До одного і того ж антигену можуть утворюватися усі класи антитіл, вони різняться між собою за важкими ланцюгами імуноглобулінів.

IgM має молекулярну масу 900 кД, він міститься в крові в концентрації 0,5–1,8 г/л, період напіврозпаду – 5–6 діб. IgG має молекулярну масу 150 кД, його концентрація у крові становить 6,0–16,0 г/л і період напіврозпаду – 21 доба. IgA має молекулярну



масу 170–350 кД, його концентрація в крові – 1–5 г/л, а період напіврозпаду – 6 діб. IgD – молекулярна маса 180 кД, концентрація в крові 0,03–0,04 г/л, період напіврозпаду – 3 доби, IgE – молекулярна маса 190 кД, концентрація у крові 0,00002–0,0002 г/л, період напіврозпаду – 2 доби. IgD існує лише у мембрано-зв’язній формі у вигляді рецепторів В-лімфоцитів. При диференціації В-клітин він з’являється після IgM.

Імуноглобуліни складаються з легких і важких ланцюгів. Активний центр антитіл формується важким і легким ланцюгом. Це стало відомо після досліджень англійського вченого Р. Портера та американського вченого Г. Едельмана у 1959 році. Портер обробив антитіло папаїном і отримав три фрагменти. Два з них із молекулярною масою 45 кД ідентичні один одному, їх назвали Fab<sub>1</sub> та Fab<sub>2</sub>. Фрагменти, які зв’язуються з антигеном (*antigen binding*). Третій фрагмент з молекулярною масою 55 кД специфічної активності не має, але має постійний амінокислотний склад, його було названо Fc-фрагментом (*crystallizable*).

Коли Г. Едельман обробив антитіло меркаптоетанолом у концентрованому розчині сечовини, то молекула імуноглобуліну розпалася на два легкі ланцюги з молекулярною масою 20–25 кД та два важкі ланцюги з молекулярною масою 50 кД кожний. Повноцінної активності антитіла жоден із ланцюгів не мав, тобто було встановлено, що активний центр формується важким та легким ланцюгом. Антитіла мають два активні центри і, відповідно, двовалентність, яка забезпечує можливість приєднуватися до них великій кількості антигенів. Реакція антиген-антитіло максимально відбувається лише в певному діапазоні концентрацій обох реагентів, тобто у зоні еквівалентності, і характеризується такими особливостями:

а) для її протікання необхідною умовою є наявність електролітів – 0,85 % NaCl та рН близьке до нейтральних значень;

б) реакція з’єднання антигену з антитілом відбувається дуже швидко;

в) реакція є зворотною. При зміні рН у лужний або кислотний бік та підвищенні концентрації NaCl до 15 %, а температури до 60 °С можна із комплексу антиген-антитіло виділити антитіло;

г) при взаємодії антигена з антитілом виділяється невелика кількість тепла.

**Обладнання, прилади та матеріали:** скляні пластини розміром 9×12 см, агар, моноспецифічна сироватка, мікрошприци, латунна П-подібна рамка завтовшки 1 мм, 0,1 М веронал-медіналовий буфер (рН 8,6), лінійка Behringwerke, креслярський вимірник і штангенциркуль, волога камера, холодильник.

### Порядок виконання

В основу цього методу покладено метод Манчіні, який ґрунтується на вимірюванні діаметра кільця преципітації, що утворюється при внесенні досліджуваної сироватки в лунки, вирізані в шарі агару, у якому попередньо дисперговані моноспецифічні антисироватки. За стандартних умов дослідження діаметр кільця преципітації прямо пропорційний концентрації досліджуваного імуноглобуліну. Вміст імуноглобулінів визначають щодо стандартної сироватки крові людини з відомою концентрацією імуноглобулінів (рис. 4.1).

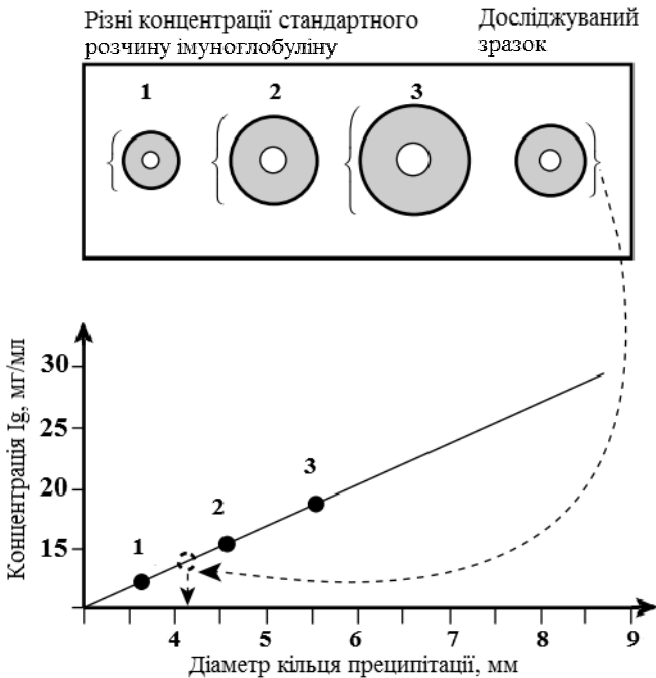


Рис. 4.1. Радіальна імунодифузія (метод Манчіні)

Скляні пластини розміром 9×12 см покривають рівномірним шаром суміші агару з моноспецифічною антисироваткою. Для цього на пластину поміщають латунну П-подібну рамку завтовшки 1 мм, зверху поміщають другу скляну пластину, змочену гідрофобною рідиною; простір між пластинами заливають сумішшю агару і антисироватки об'ємом 9 мл.

Для отримання суміші 3 %-го агару або агарозу (закордонного або вітчизняного виробництва) у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6 змішують при 56 °С у співвідношенні 1:1 з антисироваткою, в якій концентрація антитіл вдвічі перевищує робочий титр (титр у реакції імунної дифузії (РІД)), вказаний на ампулі. Розведення антисироватки готують у 0,1 М веронал-медіналовому буфері з рН 8,6.

У шарі агару з антисироваткою пробійником роблять лунки діаметром 2 мм на відстані 15 мм одна від одної. На пластині утворюється декілька рядів лунок. В усі лунки 1-го ряду за допомогою мікрошприца вносять 2 мкл стандартної сироватки нерозведеної і в розведеннях 1:2, 1:4, 1:8. Лунки наступних рядів заповнюються дослідними препаратами. Пластини інкубують у вологій камері упродовж 24 год за температури +4 °С, а пластини з анти-IgM сироваткою – 48 год. По закінченні інкубації вимірюють діаметри кільця преципітації.

На вологих нефарбованих пластинах виміри проводять під лупою з дворазовим збільшенням на темному фоні при косому освітленні за допомогою креслярського навскісному і штангенциркуля. На зафарбованих пластинах діаметри вимірника за допомогою лінійки Behringwerke.

Якщо коли діаметр кільця преципітації досліджуваних препаратів перевищує діаметр кільця преципітації нерозведеної контрольної сироватки, досліджувані матеріали необхідно розводити.

### **Обробка експериментальних даних**

Рівень імуноглобулінів визначають за калібрувальною кривою, що виражає залежність між рівнем імуноглобулінів і діаметром кільця преципітації. Для цього на осі абсцис відкладають діаметри кільця преципітації (в мм) контрольної сироватки у співвідношенні з моноспецифічною сироваткою, а на осі ординат – відому концентрацію імуноглобуліну в МО/мл (міжнародних одиниць/мл)

або мг/мл, що містяться в контрольній сироватці кожного розведення. Утворені точки з'єднують однією лінією. Так будують графіки для кожного імуноглобуліну окремо.

Для визначення рівня імуноглобулінів у досліджуваній сироватці необхідно на осі абсцис відкласти діаметр кільця преципітації досліджуваної сироватки. Встановлюють перпендикуляр до перетину з кривою і точку перетину проєктують на вісь ординат.

Отримане значення відповідає рівню імуноглобуліну (в МО/мл або мг/мл). Похибка у визначенні концентрації імуноглобулінів становить  $\pm 0,02$  мг/мл, а похибка вимірювання діаметра кільця преципітації –  $\pm 0,1$  мм.

### **Аналіз отриманих результатів**

Отримані значення вмісту різних класів імуноглобулінів у досліджуваному зразку сироватки порівнюють із середніми (табл. 4.1) та роблять висновки про стан імунної системи.

*Таблиця 4.1*

#### **Розподіл імуноглобулінів у сироватці крові людини**

IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
80 %	13 %	6 %	1 %	0,002 %

#### **Запитання для самоперевірки**

1. Що становлять собою антитіла?
2. Які класи антитіл існують?
3. Які характерні особливості реакції антиген-антитіло?
4. Які фактори впливають на результати визначення вмісту імуноглобулінів у сироватці методом Манчіні?

**Джерела:** [1]; [5]; [6]; [9].

## **Лабораторна робота 5**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2**

**Мета роботи** – оцінити біологічну активність інтерлейкіну-2 за допомогою бласттрансформації лімфоцитів клітин крові.

#### **Завдання**

1. Виділити лімфоїдні клітини крові.
2. Культивувати клітини та провести бласттрансформацію лімфоцитів.

3. Отримати джерело інтерлейкіну-2.
4. Оцінити біологічну активність інтерлейкіну-2 за допомогою повторної бласттрансформації лімфоцитів.

### Основні теоретичні відомості

Цитокіни за своєю природою є білками, поліпептидами, глікопротеїнами. Цитокіни – це біологічно активні молекули, що впливають на процеси клітинної проліферації, диференціації і функціональної активності клітин. Першими із цитокінів були виділені інтерферони, потім отримали розчинні пептидні регулятори імунних реакцій із активованих лімфоцитів – лімфокіни, із моноцитів отримали монокіни, а Арден (Aarden) у 1979 р. запропонував термін «інтерлейкіни». Інтерлейкіни – це поліфункціональні цитокіни.

ІЛ-2 – цитокін, що бере участь у регуляції імунологічної реакції. Клітинами-продуцентами є Т-лімфоцити, Т-хелпери I, тучні клітини, еозинофіли. Клітини-мішені – Т-, В-лімфоцити, натуральні кілери, тучні клітини, еозинофіли. ІЛ-2 активує проліферацію і диференціацію Т-лімфоцитів, активує цитотоксичні лімфоцити і макрофаги, активує проліферацію В-лімфоцитів, знижує синтез гістаміну еозинофілами.

**Обладнання, прилади та матеріали:** гепарин, скарифікатори, вата, 70 %-й етанол, 96 %-й етанол, стерильні піпетки об'ємом 0,1, 1, 5 мл, шприци, пробірки, штатив для пробірок, термостат, пастерівські піпетки, центрифуга, центрифужні пробірки, середовище 199, середовище для культивування лімфоцитів (суміш середовища 199, 20 % інактивованої телячої сироватки, 200 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину), фітогемаглютинин (ФГА), ліпополісахарид (ЛПС) *E. coli*, 6 %-й розчин декстрану, камера Горяєва, мікроскоп, 10 %-на оцтова кислота, предметні скельця, барвник Романовського–Гімзи, дистильована вода.

### Порядок виконання

#### *Виділення лімфоїдних клітин крові*

Гепаринизовану кров (25 одиниць гепарину на 1 мл крові) змішують у пробірках з 6 %-м декстраном у співвідношенні 5:1 та поміщають на 1 год в термостат за температури 37 °С. Пробірки

термостатують перші 30 хв під кутом 45°, далі 30 хв – у вертикальному положенні.

Пастерівською піпеткою відбирають розташований над еритроцитами шар плазми разом з клітинами, переносять у центрифужну пробірку та двічі відмивають клітини в середовищі 199 центрифугуванням при 1000 об/хв упродовж 10 хв.

Клітини ресуспендують в невеликому об'ємі (2–3 мл) середовища культивування, визначають їх кількість в 1 мл суспензії, підраховуючи в камері Горяєва, далі розводять отриману клітинну суспензію середовищем культивування, доводячи кількість клітин до  $10^6$  в 1 мл.

### *Культивування клітин*

Розливають клітинну суспензію по 1 мл у пробірки, додають у кожную по 1 мл середовища культивування та вносять в дослідні пробірки неспецифічні стимулятори бластогенезу в мітогенних дозах (20 мкг/мл ФГА, 100 мкг/мл ЛПС), в контрольні проби мітогени не додають (кожную дослідну та контрольну проби необхідно ставити у трьох повторах). Культивують клітини за температури 37 °С упродовж 72 год.

Після культивування пастерівською піпеткою знімають надосадову рідину з кожної пробірки, використовують її як джерело ІЛ-2. Осад, що залишився, ретельно піпетують, додають 7 мл 10 % оцтової кислоти, центрифугують при 1500 об/хв упродовж 20 хв.

Надосадову рідину знімають, клітини ретельно ресуспендують в краплині середовища, що залишилось, додають 5–7 краплин 96 %-го розчину етанолу та відразу виливають вміст пробірки на сухе предметне скельце для приготування мазка (рис. 5.1). Мазок висушують на повітрі, зафарбовують барвником Романовського–Гімзи упродовж 30 хв та змивають його дистильованою водою.

Для визначення результатів реакції застосовують морфологічний аналіз клітин у зафарбованих препаратах під мікроскопом. Лімфоцити та їх трансформовані форми, що характеризують процес бласттрансформації лімфоцитів периферичної крові людини, ідентифікують за допомогою рис. 5.2.

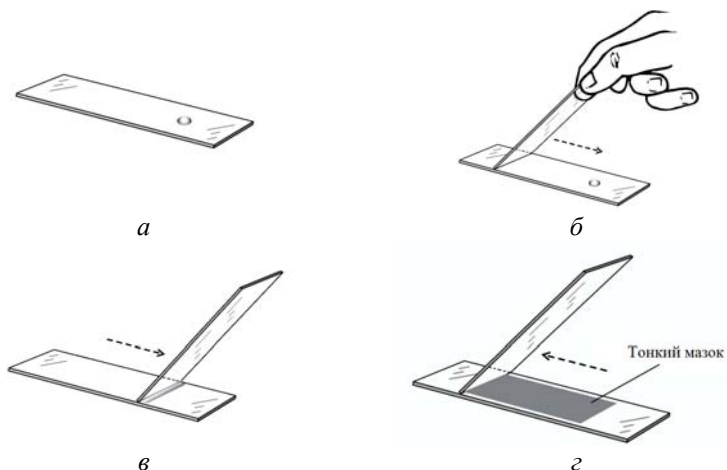


Рис. 5.1. Схема приготування мазка: *a* – невелику краплину клітинної суспензії розташовують на одному з кінців предметного скельця; *б* – друге предметне скельце рухають під кутом  $45^\circ$  назад за стрелкою; *в* – краплину клітинної суспензії перемішують так, щоб розподілити її до обох країв предметного скельця; *з* – друге предметне скельце рухають уздовж першого під кутом  $45^\circ$  вперед за стрілкою, розтягуючи клітинну суспензію по його поверхні

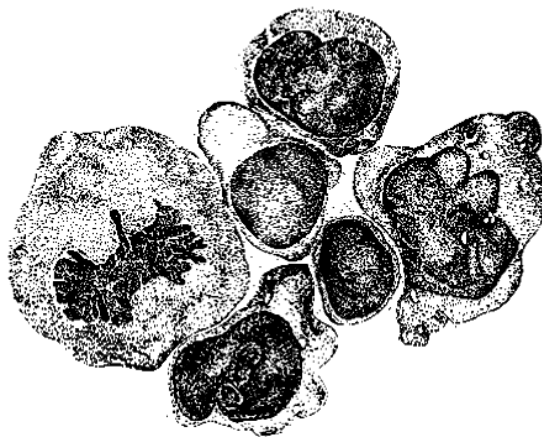


Рис. 5.2. Трансформація лімфоцитів

## *Оцінка біологічної активності інтерлейкіну-2*

Проводять повторне виділення та культивування лімфоцитів з мітогеном, додатково додаючи до пробірок як джерело ІЛ-2 різні об'єми надосадової рідини, отриманої при першому культивуванні. Після 72 год культивування за температури 37 °С проводять морфологічний аналіз клітин. Під дією ІЛ-2 кількість трансформованих лімфоцитів (див. рис. 5.2) має збільшитися порівняно з першим дослідом.

### **Обробка експериментальних даних**

В обох дослідях знаходять 250 лімфоїдних клітин, підраховують кількість бластів, включаючи мітози, перехідних пластоподібних форм та малих лімфоцитів. Розраховують відношення кількості трансформованих клітин (бластів та перехідних форм) до загальної кількості підрахованих у кожному мазку та визначають середні показники для дослідних та контрольних проб кожного зразка крові. Встановлюють кількість бластів (%) від загальної кількості лімфоцитів у досліджуваних зразках крові за різницею в досліді та контролі.

### **Аналіз отриманих результатів**

Замалювати або сфотографувати трансформовані клітини та описати їх морфологічні особливості.

Визначити активність ІЛ-2 як збільшення частки (%) трансформованих лімфоцитів відносно загальної їх кількості при культивуванні з додатковим джерелом цитокіну.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Що таке цитокіни?
2. Що собою становить інтерлейкін-2?
3. Яку функцію виконує інтерлейкін-2?
4. Що таке бласттрансформація лімфоцитів?
5. Які морфологічні особливості клітин типу бластів?

**Джерела:** [1]; [12].



## Модуль II. ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКЦІЇ

---

### Лабораторна робота 6

#### ВИЗНАЧЕННЯ В СЛИНІ ІМУНОГЛОБУЛІНУ А

**Мета роботи** – визначити вміст імуноглобуліну А в слині за допомогою імуноферментного аналізу.

#### Завдання

1. Ознайомитися з особливостями будови та функцій секреторного імуноглобуліну А.
2. Проаналізувати принципи різних типів імуноферментного аналізу.
3. За допомогою імуноферментного аналізу визначити вміст імуноглобуліну А в слині.

#### Основні теоретичні відомості

IgA становить близько 15–20 % від загальної кількості імуноглобулінів крові, хоча він секретується передусім через слизову оболонку шлунка і кишечника. IgA запобігає адгезії мікроорганізмів на епітеліальних клітинах травного та дихального шляхів. Цей імуноглобулін допомагає боротися проти патогенних організмів, які контактують з поверхнею тіла людини при диханні або ковтанні їжі. Він не активує комплемент та має слабку здатність до опсонізації. IgA існує в двох формах: IgA1 (90 %) і IgA2 (10 %), які різняться своєю структурою. IgA1 має типову будову білкових молекул. Особливістю IgA2 є те, що його важкі та легкі ланцюги з'єднані нековалентними зв'язками, не дисульфідними. IgA1 міститься в сироватці крові та продукується В-клітинами кісткового мозку, а IgA2 продукується В-клітинами, розташованими в слизових оболонках. Встановлено, що IgA2 може секретуватися в молозиво, материнське молоко, слину, сльози.

Секреторний IgA має специфічну форму. Він є димером, з'єднаним двома додатковими ланцюгами, одним з яких є J-ланцюг (англ. *join* – з'єднувати) – поліпептид з молекулярною масою 1,5 kD.

Він містить багато цистеїну та структурно відрізняється від інших ланцюгів імуноглобулінів. Цей ланцюг продукується антигілосекретуючими клітинами. Димерна форма IgA зовнішніх виділень також містить поліпептид з молекулярною масою 1,5 kD, що називається «секреторний ланцюг» та продукується епітеліальними клітинами. У деяких випадках можливе формування тривимірного і навіть тетравимірного IgA.

Зниження або відсутність IgA може свідчити про наявність клінічно значущого імунодефіциту.

Принцип імуноферментного аналізу ґрунтується на виявленні в слині імуноглобуліну А за допомогою специфічного антиглобулінового кон'югату (анти-А). Компоненти, що не зв'язалися, відмиваються, активність ферменту в складі імунних комплексів визначають за допомогою субстрат-хромогенної суміші. Інтенсивність забарвлення зворотно пропорційна кількості антитіл у зразку.

**Обладнання, прилади та матеріали:** імуноферментна тест-система: планшета полістиролова з імобілізованим антигеном (IgA), фосфатно-сольовий буфер (ФСБ), стандартний зразок IgA, кон'югат, мічений пероксидазою (анти-А), цитратно-фосфатний буфер, розчин субстрату, зупиняючий розчин (трихлороцтова кислота), автоматичні мікропіпетки, імуноферментний аналізатор або фотометр.

## Порядок виконання

### *Підготовка реагентів*

Слід зазначити, що залежно від виробника імуноферментної тест-системи в її основу може бути покладено принцип прямого (рис. 6.1) або непрямого (рис. 6.2) імуноферментного аналізу. У цій роботі використовується непрямий аналіз.

Перед постановкою дослідження набір витримують за кімнатної температури упродовж 30 хв.

1. Готують необхідну кількість розчину ФСБ, для чого розводять його в 10 разів дистильованою водою. При випаданні солі в осад концентрат необхідно прогріти за температури 30–40 °С до повного розчинення осаду. Приготований розчин використовують для розведення слини, кон'югату та промивання планшети. Отриманий розчин стабільний упродовж двох діб за кімнатної температури чи 10 діб у холодильнику (+2...+10 °С).

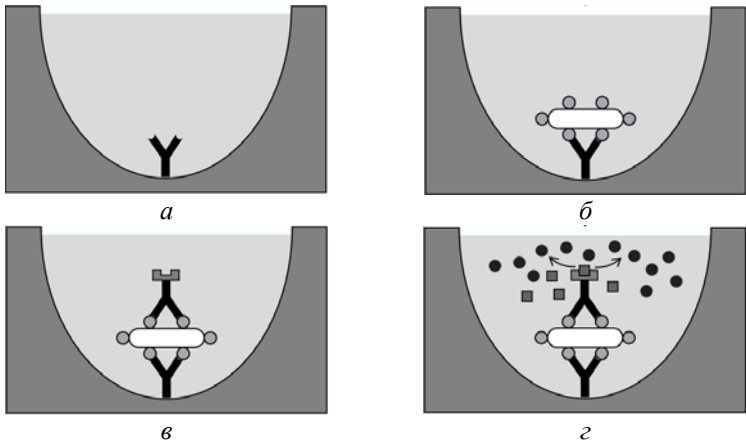


Рис. 6.1. Схема прямого імуноферментного аналізу: *а* – адсорбовані на поверхні лунки молекули антитіл; *б* – додавання тест-антигену (якщо він є комплементарним, антиген зв'язується з антитілом); *в* – додавання специфічних антитіл, мічених ферментом, що зв'язуються з антигеном; *г* – додавання фермент-специфічного субстрату (за інтенсивністю кольору реакції кількісно визначається тест-антиген)

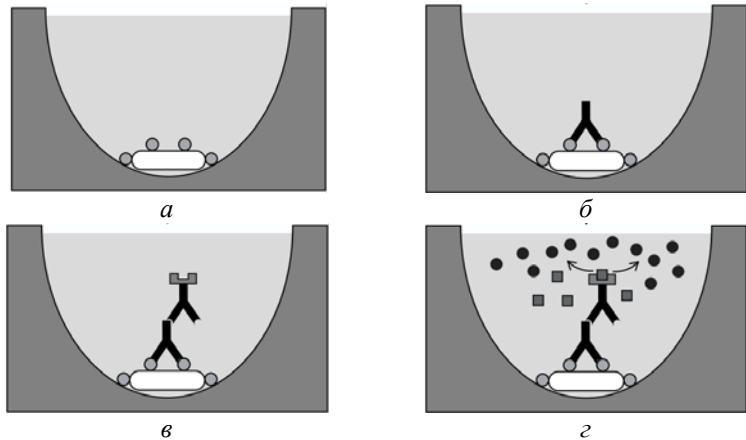


Рис. 6.2. Схема непрямого імуноферментного аналізу: *а* – адсорбований на поверхні лунки антиген; *б* – додавання тест-антисироватки (якщо антитіла є комплементарними, вони зв'язується з антигеном); *в* – додавання специфічних анти-антитіл, мічених ферментом; *г* – додавання фермент-специфічного субстрату (за інтенсивністю кольору реакції кількісно визначаються тест-антитіла)

2. Підготовка стандартного та досліджуваних зразків: перед дослідженням стандарт та слину розводять ФСБ в 200 разів (5 мкл в 1 мл).

3. Підготовка робочих розчинів кон'югату: анти А-ПХ – 20 мкл кон'югату розводять у 5 мл ФСБ. При постановці реакції лише на частині планшети кількість розчину кон'югату зменшується пропорційно. Робочий розчин кон'югату готують безпосередньо перед використанням.

4. Підготовка субстратної суміші: до 9 мл дистильованої води додають 1 мл цитратно-фосфатного буфера та 1 мл розчину субстрату. При постановці реакції лише на частині планшети кількість субстратної суміші зменшується пропорційно. Робочий розчин субстратної суміші готують безпосередньо перед використанням.

### *Проведення дослідження*

1. В усі лунки додають 100 мкл розчину ФСБ (холосте випробування), стандартного та досліджуваних зразків у двох повторах.

2. Додають в усі лунки 100 мкл кон'югату.

3. Інкують стрипи упродовж 60 хв за кімнатної температури, періодично струшуючи.

4. Промивають планшету 4–5 разів ФСБ, додаючи в усі лунки 250 мкл розчину.

5. Додають по 100 мкл субстратної суміші.

6. Інкують у захищеному від світла місці упродовж 15–20 хв залежно від ступеня розвитку забарвлення.

7. Доливають по 100 мкл зупиняючого розчину.

8. Не більше як через 5 хв вимірюють оптичну густину ( $D$ ) на імуноферментному аналізаторі або фотометрі за довжини хвилі 450 нм.

### **Обробка експериментальних даних**

Вимірюють оптичну густину ( $D$ ) в усіх лунках і проводять розрахунки, використовуючи зворотно пропорційну залежність:

$$C_x = \frac{D_{ст} \cdot C_{ст}}{D_x},$$

де  $D_{ст}$  – оптична густина стандартного зразка;  $C_{ст}$  – концентрація імуноглобуліну в стандартному зразку (IgA – 2,31 г/л);  $D_x$  –

оптична густина досліджуваного зразка;  $C_x$  – концентрація імуноглобуліну в досліджуваному зразку.

Очікувані коливання  $D$  стандартного зразка для IgA не нижче 0,3 оптичних одиниць (ОО).

### **Аналіз отриманих результатів**

Отримані дані щодо вмісту IgA в слині порівнюють між собою та роблять висновки щодо можливих причин зниження чи підвищення вмісту секреторного IgA.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Що собою являє секреторний імуноглобулін А? Яку функцію він виконує в організмі?
2. Чим відрізняється імуноглобулін А від секреторного імуноглобуліну А?
3. Які головні принципи імуноферментного аналізу?

Джерела: [9]; [10]; [11].

## **Лабораторна робота 7**

### **БЛОКАДА КЛІТИННИХ РЕЦЕПТОРІВ**

**Мета роботи** – визначити ступінь блокади клітинних рецепторів під впливом осмотичного тиску, барвника метиленового синього та туші.

### **Завдання**

1. Ознайомитися з основними функціями клітинних рецепторів та факторами, що на них впливають.
2. Визначити вплив осмотичного тиску, барвника метиленового синього та туші на клітинні рецептори за допомогою властивості лімфоцитів утворювати розетки з еритроцитами барана.

### **Основні теоретичні відомості**

T- та B-лімфоцити є ефекторними клітинами імунної системи. Їх характерною особливістю є наявність на зовнішній мембрані унікального рецептора для розпізнавання одного антигену, які у T-клітин скорочено позначаються TCR (*T cell receptor*), а у B-клітин – BCR (*B cell receptor*).

TCR зрілої T-клітини є білковим гетеродимером, головна частина якого в одного типу рецептора подана поліпептидними

ланцюгами  $\alpha$  та  $\beta$ , а у іншого –  $\gamma$  та  $\delta$ , з молекулярними масами відповідно 27 та 32, 35 та 45 кД. У їх складі є два домени: прилеглі до поверхні мембрани, константні, та виступаючі назовні від неї – варіабельні. Константними доменами рецептор TCR нековалентно зв'язується з іншим рецептором CD3 (*CD – cluster differentiation*) Т-клітини, до складу якого входять п'ять поліпептидних ланцюгів  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ , які є трансмембранними білками, що передають всередину клітини сигнали про зв'язування антигену.

Крім комплексів TCR-CD3, кількість яких на мембрані дозрілих клітин може досягати 30–40 тис. молекул, на мембрані Т-клітин містяться молекули-корцептори CD4 та CD8, що відіграють допоміжну роль при розпізнаванні антигенних пептидів. За їх наявністю виділяють дві основні популяції Т-лімфоцитів – CD4<sup>+</sup>-клітини, або Т-хелпери, які розпізнають комплекси антигенних пептидів на молекулах МНС класу II (*MHC – major histocompatibility complex*) макрофагів, дендритних клітин та В-лімфоцитах, та CD8<sup>+</sup>-клітини, або Т-кілери, які часто називають цитотоксичними лімфоцитами (ЦТЛ), які розпізнають пептиди на молекулах МНС класу I всіх ядерних клітин.

BСR мають імуноглобулінову природу. У зрілій В-клітині, яка перебуває в стані спокою, поданий IgM (сироватковий IgM пентамер) у комплексі з IgD та додатковими молекулами Iga та Ig $\beta$ , які беруть участь у передачі сигналу до клітини про зв'язування антигену.

Окрім імуноглобулінових рецепторів для розпізнавання антигену, кількість яких може досягати 150 000 молекул, зрілі В-лімфоцити мають мембранні молекули CD80, CD86 та CD40, що ефективно контактують із Т-хелперами, а також рецепторами для Fc фрагмента IgG, С3b фракції комплементу, інтерлейкінів 1 і 4, інтерферону  $\gamma$ . До того ж на їх мембранах експресовані антигени МНС класів I та II, які дозволяють В-лімфоцитам виконувати функцію антигенпрезентуючих клітин.

**Обладнання, прилади та матеріали:** мікроскоп, імерсійне масло, вата, 70%-й етанол, еритроцити барана, стерильний фізіологічний розчин, скарифікатори, вата, стерильні мікропіпетки, гепарин, градієнтний розчин, центрифужні пробірки, центрифуга, піпетки Пастера, предметні скельця, термостат, 1 %-й, 5 %-й та 10 %-й розчини NaCl, барвник метиленовий синій, туш.

## Порядок виконання

1. Спочатку готують 5 %-ну суспензію еритроцитів барана у фізіологічному розчині. Для цього 0,05 мл еритроцитів барана додають до 9,95 мл фізіологічного розчину та ретельно перемішують.

2. Відбирають периферичну кров, вносять її в центрифужну пробірку, до якої додають декілька краплин гепарину (для попередження згортання крові), фізіологічний розчин для дворазового розведення зразка крові та 2 мл градієнтного розчину.

3. Зразки крові центрифугують при 1500 об/хв упродовж 20–25 хв. Після центрифугування еритроцити та гранулоцити осідають на дно пробірки, а суспензія лімфоцитів та моноцитів залишається у міжфазній поверхні.

4. Піпеткою Пастера відбирають суспензію мононуклеарних лейкоцитів, розводять її вдвічі фізіологічним розчином та знову центрифугують для отримання чистої суспензії лімфоцитів. Цю процедуру повторюють декілька разів.

5. У пробірки, підписані як «контроль», «1 % NaCl», «5 % NaCl» та «10 % NaCl», «метиленовий синій», «туш» додають по 0,1 мл очищеної суспензії лімфоцитів, до якої доливають 0,1 мл відповідних розчинів NaCl, барвника метиленового синього та туші. Пробірки інкубують за температури 37 °C упродовж 30 хв.

6. У пробірки додають 0,2 мл 5 %-ї суспензії еритроцитів барана та знову інкубують за температури 37 °C упродовж 30 хв, після чого пробірки витримують за температури 4 °C у холодильнику упродовж 50 хв.

7. Вміст пробірок обережно переносять на знежирене розчином етанолу предметне скельце та за допомогою іншого скельця розподіляють суспензію по всій поверхні скельця (див. рис. 5.1).

8. Висушені на повітрі мазки клітин крові фіксують етиловим спиртом та фарбують барвником Романовського–Гімзи. Препарати мікроскопують та визначають ступінь блокади рецепторів лімфоцитів під дією осмотичного тиску, барвника метиленового синього та туші порівняно з контролем. Що більше рецепторів лімфоцитів було заблоковано, то менше еритроцитів формуватимуть розетку (рис. 7.1).

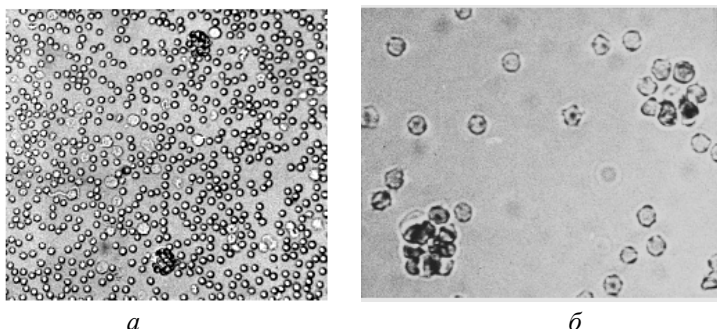


Рис. 7.1. Мікрофотографії розеткоутворення: *a* – $\times 600$ ; *б* – $\times 1350$

### Обробка експериментальних даних

Результати визначення блокади рецепторів лімфоцитів осмотичним тиском заносять до табл. 7.1.

Таблиця 7.1

#### Блокада клітинних рецепторів

Показник	Розчин NaCl, %			Барвник метиленовий синій	Туш	Конт-роль
	1	5	10			
Кількість розеток						
Середня кількість еритроцитів у розетці						
Кількість вільних лімфоцитів у мазку						

#### Аналіз отриманих результатів

За результатами визначення кількості та морфологічних особливостей розеток визначають ступінь блокади клітинних рецепторів під впливом осмотичного тиску, барвника метиленового синього та туші.

#### Запитання для самоперевірки

1. Як відрізняються рецептори Т- та В-лімфоцитів?
2. Які головні функції рецепторів лімфоцитів?
3. Яку кількість рецепторів може мати лімфоцит?



4. Які фактори спричиняють блокаду клітинних рецепторів?
5. Які наслідки блокади рецепторів імунокомпетентних клітин?
6. Чим обумовлюється ризик утворення лімфоцитів з еритроцитами барана?
7. Як пояснюється вплив осмотичного тиску на рецептори лімфоцитів?

**Джерела:** [1]; [10]; [12].

## **Лабораторна робота 8**

### **ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕРГІЧНОЇ РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТУ ДЕГРАНУЛЯЦІЇ БАЗОФІЛІВ**

**Мета роботи** – за допомогою тесту дегрануляції базофілів визначити алергічний стан організму.

#### **Завдання**

1. Приготування розчинів алергенів.
2. Виділити базофіли із крові кролика.
3. Отримати сироватку крові досліджуваного об'єкта.
4. Провести тест дегрануляції базофілів.

#### **Основні теоретичні відомості**

Термін «алергія» походить від грецьких слів «*allos*» – інший, «*ergos*» – дію. Це якісно змінена реакція організму на дію речовини антигенної природи, яка призводить до різних порушень в організмі – запалення, спазму бронхів, некрозу, шоку тощо. Отже, алергія – це комплекс порушень, які виникають в організмі під дією гуморальних і клітинних реакцій. У 1902 р. Портъє і Ріше вперше описали це явище як реакцію собак на повторне введення екстракту з моллюсків. Сам термін «алергія» запропонував австрійський педіатр К. Пірке у 1906 р. для характеристики випадків патологічно посиленої реактивності, які він спостерігав у дітей при сироватковій та інфекційних хворобах. Алергічні реакції вивчає окрема галузь медицини – алергологія. Результатом імунних реакцій є захист від антигену, а алергічних – пошкодження власних тканин. Алергічні реакції розвиваються у схильних до них осіб. Алергени поділяються на ендogenous та екзогенні. Алергени можуть бути повні і неповні. Неповні алергени викликають утворення антитіл лише до певних компонентів алергенів.

Розрізняють три стадії алергічних реакцій: імунологічну, біохімічну (патохімічну) та патофізіологічну або стадію функціональних і структурних порушень.

**Обладнання, прилади та матеріали:** холодильник, термостат, центрифуга, предметні та покрівні скельця, мікроскоп, імерсійне масло, спиртівка, барвник нейтральний червоний, фізіологічний розчин, гепарин, відалівські пробірки, скарифікатор, абсолютний етиловий спирт, тканинний та рослинний алергени, вазелін, фільтрувальний папір.

### **Порядок виконання**

#### *Приготування тканинного антигену (алергену)*

Тканину промивають водою, потім – фізіологічним розчином, промочують, зважують та розтирають зі скляним піском до отримання гомогенної маси, а потім розводять у стерильному фізіологічному розчині в 5 разів, наприкінці ставлять у морозильну камеру на добу. Потім розморожують, центрифугують при 3000 об/хв декілька разів до зникнення осаду і заморожують. Через добу знову розморожують та центрифугують до зникнення осаду. Для приготування робочого розчину тканинного антигену отриманий розчин розводять двома частинами фізіологічного розчину.

Алерген рослинного походження готують за інструкцією виробника.

#### *Приготування барвника (нейтрального червоного)*

Нейтральний червоний – 300 мг/100 мл абсолютного етилового спирту ставлять на добу у термостат за температури 37 °С. Фільтрують через звичайний папір. Предметні скельця трохи підігрівають над полум'ям спиртівки і наносять відразу краплю барвника. Вона розтікається і висихає.

#### *Контроль сироватки*

*I етап.* Відбирають кров з крайової вени вуха кролика в кількості 1,5 мл у відалівську пробірку з гепарином. Центрифугують при 1500 об/хв уродовж 3 хв. Отримують лейкоцитарну плівку, яку використовують як джерело базофілів.

*II етап.* На предметне скельце, зафарбоване нейтральним червоним барвником, наносять частину лейкоцитарної плівки та краплину сироватки досліджуваної тварини і краплину фізіологічного розчину. Бажано, щоб усі нанесені краплини були однакового об'єму. Це контроль сироватки.

Несильно натискаючи, краєм покривного скла змішують краплини; краї цього ж покривного скла (краще брати великого розміру) покривають вазеліном і накривають предметне скельце. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Якщо відсоток дегрануляції перевищує 10 % (тобто дві клітини), то сироватку варто розвести в 2 рази і так далі доти, доки дегрануляція буде на рівні 10 % або менше. Оптимальними умовами є відсутність у контролі сироватки зруйнованих клітин.

#### *Контроль алергену*

Частину лейкоцитарної плівки, краплину алергену та краплину фізіологічного розчину накривають покривним склом так само, як і контроль сироватки. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Досягають дегрануляції не більше двох клітин. Щодо концентрації хімічної речовини, то необхідно брати таку, що сенсibiliзує тварин, і якщо вона виявиться занадто великою (тобто дегрануляція більше 10 %), потрібно розвести алерген. Необхідно отримати таку дозу хімічних речовин або іншого алергену, яка не спричинятиме дегрануляцію базофілів. Як розчинник потрібно використовувати фізіологічний розчин для створення ізотонічного середовища.

#### *Постановка експерименту*

Частину лейкоцитарної плівки, краплину сироватки та краплину алергену змішують і накривають покривним склом. Препарат термостатують за температури 37 °С упродовж 15 хв та мікроскопують в імерсійній системі, рахуючи 20 базофілів. Якщо кількість змінених клітин перевищує 10 %, тоді ця реакція вважається позитивною (слід рахувати не більше 20 хв, тому що потім відбувається спонтанна дегрануляція базофілів).

## Обробка експериментальних даних

Проводять морфологічний аналіз базофілів. Нормальні базофіли мають яскраво-оранжеву зернистість (нейтрофіли менші за розміром і зернистість у них жовтого кольору). Визначають ступінь руйнації окремих клітин базофілів: «+» – змінена форма, «++» – утворення виросту, «+++» – вихід гранул. Дані заносять до табл. 8.1.

Таблиця 8.1

### Ступінь руйнації окремих базофілів

Кількість базофілів з відповідним ступенем руйнації		
+	++	+++

Визначають ступінь руйнації субпопуляції базофілів: «+» – 20–30 % зруйнованих клітин, «++» – 31–50 % зруйнованих клітин, «+++» – понад 50 % зруйнованих клітин, «-» – негативна реакція, кількість зруйнованих клітин менше 20 %.

Визначають коефіцієнт дегрануляції базофілів ( $A$ ):

$$A = C/B,$$

де  $C$  – кількість дегранульованих клітин;  $B$  – загальна кількість базофілів.

### Аналіз отриманих результатів

Ступінь розвитку алергічної реакції залежно від природи та концентрації алергену оцінюють за ступенем руйнації окремих клітин базофілів, ступенем руйнації субпопуляцій базофілів та коефіцієнтом дегрануляції базофілів.

### Запитання для самоперевірки

1. Що таке алергія?
2. Хто вперше відкрив алергічну реакцію?
3. Що таке сенсibiliзація?
4. Із яких стадій складається алергічна реакція?
5. Які типи алергічних реакцій?
6. Які умови навколишнього середовища та життєдіяльності людини спричиняють виникнення алергічних реакцій, особливо у дітей?

Джерела: [1]; [3]; [4].

## Лабораторна робота 9

### ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН

**Мета роботи** – кількісно визначити вміст фактора некрозу пухлин (ФНП) у сироватці крові за допомогою імуноферментного аналізу.

#### Завдання

1. Ознайомитися з основними функціями ФНП.
2. Провести імуноферментний аналіз для визначення ФНП.
3. Порівняти отримані дані щодо вмісту ФНП у сироватці крові в нормі та за різних патологічних станів організму.

#### Основні теоретичні відомості

Є два фактори некрозу пухлин: ФНП $\alpha$  та ФНП $\beta$ . ФНП $\alpha$  продукується здебільшого моноцитами-макрофагами, а ФНП $\beta$  – Т-лімфоцитами, стимульованими різноманітними антигенами та мітогенами. Фактори є глікопротеїнами з молекулярною масою 17,4 кД (ФНП $\alpha$ ) – 20–25 кД (ФНП $\beta$ ). Діють вони на один і той самий рецептор, викликаючи однакові ефекти, зокрема руйнують пухлинні та інфіковані вірусами і паразитами клітини з розвитком геморагічного некрозу тканин та загальної кахексії організму. Ступінь їх активності неоднаковий. Більш виражена вона у ФНП $\alpha$ , що може бути пов'язано зі швидкістю його утворення. Так, у максимальній кількості він накопичується вже через 2–3 год після стимуляції антигенами, а ФНП $\beta$  – лише на 2–3 доби. За спектром клітин-мішеней та біологічними ефектами ФНП близькі до ІЛ-1 та ІЛ-6. Крім трансформованих клітин на них реагують майже всі клітини, що беруть участь у запальних процесах. Зокрема, ФНП підсилюють експресію молекул, що сприяють адгезії на ендотелії, впливають на хемотаксис фагоцитів, обумовлюють синтез білків гострої фази запалення. У розвитку імунної відповіді вони беруть участь як кофактори ростових цитокінів, індукуючи проліферацію В- та Т-лімфоцитів, підсилюють антитілоутворення, пригнічують гіперчутливість уповільненого типу, перешкоджають формуванню імунологічної толерантності. Значний інтерес викликають дані про

те, що ФНП беруть участь у формуванні лімфовузлів та пещерних бляшок, а також у формуванні зародкових центрів під час імунної відповіді.

**Обладнання, прилади та матеріали:** імуноферментна тест-система: планшета полістиролова з імобілізованими мишачими моноклональними антитілами до людського ФНПа, біотин-кон'югат (анти-ФНПа поліклональні антитіла), концентрат промиваючого буферного розчину (фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з 1 % Твіну 20), стандартний зразок людського ФНПа, кон'югат стрептовідин-пероксидаза хрому, розчин субстрату (тетраметилбензидин), зупиняючий розчин (1 М ортофосфорна кислота), автоматичні мікропіпетки, пробірки, імуноферментний аналізатор або фотометр, зразки сироватки крові людини.

## **Порядок виконання**

### *Підготовка реагентів*

Перед постановкою дослідження набір витримують за кімнатної температури упродовж 30 хв.

1. Готують необхідну кількість промиваючого буферного розчину, для чого розводять його в 20 разів дистильованою водою. При випаданні солі в осад концентрат необхідно нагріти за температури 30–40 °С до повного розчинення осаду. Приготований розчин використовують для розведення сироватки, кон'югату та промивання планшети. Отриманий розчин стабільний упродовж 30 діб за умови його зберігання за температури 2–25 °С.

2. За кількістю досліджуваних та стандартних зразків, а також зразка для порівняння визначити кількість стрипів, необхідних для аналізу. Кожен досліджуваний, стандартний зразок та зразок для порівняння тестують у двох повторах. Зайві стрипи на планшеті видаляють. У табл. 9.1 наведено приклад розміщення зразків на стрипах планшети.

3. В окремих пробірках готують серійні розведення стандартного розчину людського ФНПа у промиваючому буферному розчині відповідно до табл. 9.1.

Таблиця 9.1

## Розміщення зразків на стрипах планшети

	1	2	3	4
A	Стандарт 1 (500,0 пг/мл)	Стандарт 1 (500,0 пг/мл)	Зразок 1	Зразок 1
B	Стандарт 2 (250,0 пг/мл)	Стандарт 2 (250,0 пг/мл)	Зразок 2	Зразок 2
C	Стандарт 3 (125,0 пг/мл)	Стандарт 3 (125,0 пг/мл)	Зразок 3	Зразок 3
D	Стандарт 4 (62,5 пг/мл)	Стандарт 4 (62,5 пг/мл)	Зразок 4	Зразок 4
E	Стандарт 5 (31,3 пг/мл)	Стандарт 5 (31,3 пг/мл)	Зразок 5	Зразок 5
F	Стандарт 6 (15,6 пг/мл)	Стандарт 6 (15,6 пг/мл)	Зразок 6	Зразок 6
G	Стандарт 7 (7,8 пг/мл)	Стандарт 7 (7,8 пг/мл)	Зразок 7	Зразок 7
H	Зразок для порівняння	Зразок для порівняння	Зразок 8	Зразок 8

4. Робочі розчини біотин-кон'югату та кон'югату стрептовідин-пероксидази готують за інструкцією виробника.

*Проведення дослідження*

1. В усі лунки наливають 100 мкл дистильованої води.
2. У відповідні лунки планшети додають 50 мкл досліджуваних зразків сироватки крові та відповідних розведень стандартних розчинів людського ФНПa у двох повторах. У лунки, позначені «зразок для порівняння», наливають 50 мкл дистильованої води.
3. В усі лунки додають 100 мкл біотин-кон'югату та 100 мкл кон'югату стрептовадин-пероксидази. Вміст лунок перемішують шляхом переміщення колоподібними рухами планшети на плоскій поверхні.
3. Планшету накривають кришкою або плівкою та інкубують за кімнатної температури упродовж 3 год, періодично струшуючи.
4. Відкривають планшету та видаляють вміст усіх лунок, струшуючи планшету над раковиною. Промивають планшету 6 разів, додаючи в усі лунки 400 мкл промиваючого буферного

розчину. За допомогою фільтрувального паперу обережно з планшети видаляють надлишок буферного розчину.

5. В усі лунки додають 100 мкл розчину субстрату.

6. Планшету інкубують у захищеному від світла місці упродовж 10 хв.

7. В усі лунки додають 100 мкл зупиняючого розчину.

8. Не більше як через 5 хв вимірюють оптичну густина на імуноферментному аналізаторі або фотометрі за довжини хвилі 450 нм.

### **Обробка експериментальних даних**

Підрахувати середнє з двох значень оптичної густини для кожного стандартного та досліджуваного зразків. Значення повторних вимірювань не повинні відрізнятися більше ніж на 20 %. За отриманими даними побудувати калібрувальну криву залежності оптичної густини від концентрації ФН $\alpha$ . Визначити концентрацію ФН $\alpha$  у досліджуваних зразках сироватки крові.

### **Аналіз отриманих результатів**

Вміст ФН $\alpha$  порівнюють між собою та з даними нормального вмісту даного цитокіну в сироватці крові.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Які особливості будови та властивості ФН $\alpha$  і ФН $\beta$ ?
2. Які головні функції ФН $\alpha$  та ФН $\beta$ ?
3. Які методи, крім імуноферментного аналізу, можуть бути використані для кількісного визначення ФН $\alpha$ ?
4. Які переваги та недоліки використання імуноферментного аналізу для визначення ФН $\alpha$ ?

**Джерела:** [9]; [10]; [11].

## **Лабораторна робота 10**

### **ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ КЛІТИН-КІЛЕРІВ**

**Мета роботи** – визначити Т-лімфоцити-кілери з CD16 рецепторами.

### **Завдання**

1. Приготувати розділяючий розчин.
2. Визначити кількість лімфоцитів у зразку крові.



3. Приготувати суспензію еритроцитів барана.
4. До еритроцитів барана приєднати моноклональні антитіла до CD16 рецепторів лімфоцитів людини.
5. Провести реакцію розеткоутворення.
6. Приготувати нативні препарати для підрахунку розеток.
7. Приготувати забарвлені препарати для підрахунку розеток.
8. Визначити відносну кількість розеткоутворюючих клітин.

### **Основні теоретичні відомості**

Для визначення кількості клітин-кілерів використовують метод розеток.

Розеткоутворення – це процес взаємодії лімфоцитів і ксеногенних еритроцитів з утворенням клітинних конгломератів, що складаються з лімфоциту і приєднаних до нього чужорідних еритроцитів. За зовнішнім виглядом конгломерати нагадують розетки (див. рис. 12), тому лімфоцити отримали назву розеткоутворюючих клітин (РУК). Еритроцити можуть розташовуватися на одному з полюсів лімфоциту (полярні розетки), оточувати його у вигляді розірваного або повного віночка, повністю покривати клітину (розетки у формі морули), іноді навіть у декілька шарів.

Розетки, утворювані інтактними лімфоцитами без попередньої імунізації тварин-донорів ксеногенними еритроцитами, називають спонтанними. Вперше феномен спонтанного розеткоутворення описав А. Заальберг у 1970 р. Спонтанне розеткоутворення спостерігається між лімфоцитами і еритроцитами певних видів тварин. Так, Т-лімфоцити морської свинки формують розетки з еритроцитами кролика, а Т-лімфоцити людини – з еритроцитами барана. Виникнення спонтанних розеток обумовлено наявністю на поверхні Т-лімфоцитів рецепторів до еритроцитів відповідного виду.

Метод спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана або метод Е-розеткоутворення (E-erythrocyte) служить для визначення Т-клітин людини. Лімфоцити, що формують спонтанні розетки, позначають як Е-РУК (рис. 10.1).

**Обладнання, прилади та матеріали:** пробірки, гепарин, мірні колби, центрифуга, центрифужні пробірки, термостат, мікроскоп, лейкоцитарний змішувач, середовище 199, фікол-уротраст, моноклональні антитіла до CD16 рецепторів лімфоцитів, плитка,

барвник Романовського–Гімзи, барвник-фіксатор Мая–Грюнвальда, барвник трипановий синій, суміш Нікіфорова, 3 %-на оцтова кислота, камера Горяєва, пастерівські піпетки, шприци, дефібринована кров барана.

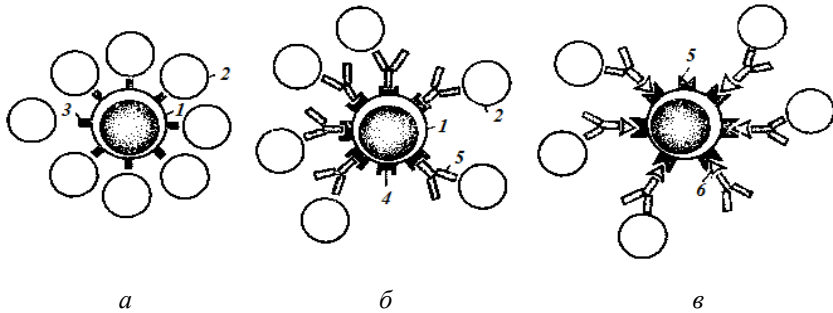


Рис. 10.1. Реакція утворення: *a* – Е-розеток; *б* – ЕА-розеток; *в* – ЕАС-розеток: 1 – лімфоцит; 2 – еритроцит; 3 – рецептор до еритроцитів; 4 – Fc-рецептор; 5 – антитіла до еритроцитів (*б*) і С3-рецептор (*в*); 6 – комплемент

### Порядок виконання

#### *Приготування розділяючого розчину (суміші фікол-уротраст)*

Фікол (4,5 г) розбавити кип'яченою гарячою дистильованою водою до об'єму 50 мл, довівши густину розчину до 1,2 та змішати з 20 мл уротраста (фікол додавати в уротраст) так, щоб густина суміші становила 1,077. Зберігати в щільно закритій посудині в темному місці.

#### *Визначення кількості лімфоцитів у крові*

Досліджувану кров зібрати в пробірки, що містять вільний від консерванту гепарин (100 од/мл крові).

Визначити відносну (*y* %) кількість лімфоцитів у крові. Із гепаринізованої крові приготувати на знежиреному предметному склі мазок, висушити на повітрі, зафіксувати в суміші Нікіфорова (15–20 хв) і зафарбувати барвником Романовського–Гімзи упродовж 20–30 хв. Підрахувати під мікроскопом кількість лімфоцитів, що припадає на 100 лейкоцитарних клітин.

Визначити кількість лейкоцитів в 1 мл крові. У лейкоцитарний змішувач набрати кров до мітки 0,5 і довести 3 %-м розчином оцтової кислоти до позначки 11, отримуючи розведення в двадцять

разів. За відсутності змішувача в пробірку додати 0,38 мл 3 %-го розчину оцтової кислоти і 0,02 мл крові. Суміш ретельно перемішати, заповнити камеру Горяєва, підрахувати лейкоцити в 100 великих квадратах і обчислити їх кількість в 1 мл крові, помноживши підраховану кількість лейкоцитів на 50.

Визначити кількість лімфоцитів в 1 мл крові: перемножити кількість лімфоцитів, отриманих під час підрахунку 100 лейкоцитарних клітин, і лейкоцитів в 1 мл крові та поділити добуток на 100.

#### *Виділення лімфоцитів*

Гепаринізовану кров (2 мл) розвести середовищем 199 у співвідношенні 1:2, обережно нашарувати пастерівською піпеткою з тонко витягнутим капіляром на розділяючий розчин (2 мл) у центрифужній пробірці (пробірку тримати під кутом 45 °) і відразу центрифугувати при 1500 об/хв упродовж 25 хв.

Пастерівською піпеткою або шприцем з довгою ін'єкційною голкою відібрати плазму разом з дифузним каламутним шаром тромбоцитів, а потім відібрати мононуклеарні клітини, що утворюють білуватий шар над розділяючим розчином. Перенести клітини в центрифужну пробірку і двічі відмити у п'яти–десятикратному розведенні об'єму середовища 119, центрифугувати при 1500 об/хв упродовж 10 хв. Осад ресуспендувати в 1 мл середовища 199, підрахувати кількість життєздатних клітин у камері Горяєва при забарвленні трипановим синім і довести кількість клітин у суспензії до  $3 \times 10^6$  (не менше  $1 \times 10^6$ ) на 1 мл середовища.

#### *Приготування суспензії еритроцитів*

Дефібриновану кров барана (2 мл) тричі відмити середовищем 199, центрифугувати при 1500–2000 об/хв упродовж 5 хв. Із відмитих еритроцитів приготувати 0,5 %-ну суспензію в середовищі 199: до 0,05 мл осаду еритроцитів додати 9,95 мл середовища, ретельно перемішати. Якщо в отриманій суспензії міститься  $1 \cdot 10^6$  лімфоцитів в 1 мл, слід використовувати 0,2–0,3 %-ну суспензію еритроцитів. Еритроцити зв'язати з моноклональними антитілами до CD16.

### *Постановка реакції*

У центрифужній пробірці змішати рівні об'єми (по 0,5 мл) суспензій лімфоцитів та еритроцитів, оброблених моноклональними антитілами. Інкубувати суміш за температури 37 °С упродовж 10–15 хв, центрифугувати при 1000 об/хв упродовж 1 хв та, не струшуючи, помістити пробірки в холодильник за температури 4 °С на 1–2 год (або залишити на ніч).

### *Приготування нативних препаратів*

Ресуспендувати осад обережним обертанням пробірки між долонями. Потім, уникаючи піпетування, внести краплю суспензії в камеру Горяєва, підрахувати під мікроскопом 100–200 лімфоцитів з приєднаними та неприєднаними еритроцитами (див. рис. 12).

### *Приготування забарвлених препаратів*

Відразу ж після ресуспендування осаду та заповнення камери Горяєва (для підрахунку кількості РУК у нативних препаратах) залишок клітинної суспензії вилити на знежирене предметне скло, зробити мазок (див. рис. 8) та висушити за кімнатної температури. Висушений мазок забарвити за Паппенгеймом–Крюковим. На нефіксований мазок налити піпеткою 10–15 крапель барвника-фіксатора Мая–Грюнвальда, через 3 хв додати ще 10–15 крапель нейтральної дистильованої води, через 1 хв змити барвник водою та висушити на повітрі. На мазок налити свіжоприготований розчин барвника Романовського–Гімзи на 10–15 хв, змити фарбу водою та висушити.

### **Обробка експериментальних даних**

У нативних препаратах визначити відносну ( $y\%$ ) кількість розеткоутворювальних клітин, вважаючи за РУК лімфоцит з трьома і більше приєднаними еритроцитами.

Розрахувати абсолютну кількість Е-РУК в 1 мл за формулою:

$$x = L \cdot a/100,$$

де  $x$  – абсолютна кількість Е-РУК;  $L$  – кількість лімфоцитів в 1 мл крові;  $a$  – відносна кількість Е-РУК.

У забарвлених препаратах визначити кількість РУК у такий же спосіб, як і в нативних препаратах. У забарвлених препаратах лімфоцити мають фіолетовий колір, еритроцити – рожевий.

### **Аналіз отриманих результатів**

Отримані значення абсолютної кількості клітин-кілерів у нативних та забарвлених препаратах порівнюють та роблять висновки щодо надійності обох способів підрахунку.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Що собою являють клітини, які формують розетки?
2. Яку функцію виконують Т-лімфоцити, лімфоцити-кілери та CD16-рецептори лімфоцитів?
3. Що таке моноклональні антитіла?
4. Чим пояснюється властивість лімфоцитів утворювати розетки з ксеногенними еритроцитами?
5. Які ще імунокомпетентні клітини, крім кілерів, можуть бути визначені методом розеткоутворення?
6. На якому етапі лабораторної роботи мажуть руйнуватися сформовані розетки та як цього уникнути?

**Джерела:** [1]; [6]; [10].

## **Лабораторна робота 11**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН**

**Мета роботи** – оцінити імунотропні властивості водно-солевих екстрактів різних лікарських рослин.

#### **Завдання**

1. Виділити лейкоцити.
2. Оцінити вплив екстрактів лікарських рослин на активність пероксидазних систем фагоцитів.

#### **Основні теоретичні відомості**

У галузі застосування нових імуномодуляторів відзначається повільний, але неухильний прогрес та відбувається помітне зрушення – перехід від використання препаратів, отриманих хімічним шляхом, до сполук природного походження або їх аналогів.

Імунотропні препарати належать до класу синтетичних, біотехнологічних та природних речовин, які впливають на клітини різних ланок імунної системи, внаслідок чого змінюються сила, характер та спрямованість імунних реакцій.

За характером впливу розрізняють імунотропні препарати чотирьох великих груп: імуномодулятори, імунокоректори, імуностимулятори та імунодепресанти. Згідно з іншими класифікаціями, усі імунотропні лікарські засоби прямої дії об'єднують в одну велику групу імуномодуляторів, серед яких вже виділяють імуностимулятори, імунодепресанти та імунокоректори.

**Обладнання, прилади та матеріали:** 1 %-ні водно-сольові екстракти лікарських рослин, пробірки, мікропіпетки, скарифікатори, 0,1 % нітросинього тетразолію (НСТ-реактив), фізіологічний розчин, гепарин, градієнтний розчин, барвник нейтральний червоний, центрифуга, термостат, предметні скельця, мікроскоп.

### Порядок виконання

1. Відбирають периферичну кров, вносять її в центрифужні пробірки, до яких додають декілька крапель гепарину (для попередження згортання крові), фізіологічний розчин для двократного розведення зразка крові та 2 мл градієнтного розчину.

2. Зразки крові центрифугують при 1500 об/хв упродовж 20–25 хв. Після центрифугування еритроцити та гранулоцити осідають на дно пробірки, а суспензія лімфоцитів та моноцитів залишається у міжфазній поверхні.

3. Піпеткою Пастера відбирають суспензію мононуклеарних лейкоцитів, розводять її вдвічі фізіологічним розчином та знову центрифугують для отримання чистої суспензії лімфоцитів. Цю процедуру повторюють декілька разів.

4. У позначені пробірки наливають по 0,1 мл очищеної суспензії лімфоцитів, до якої додають 0,1 мл відповідних екстрактів лікарських рослин. До контрольної пробірки замість екстракту додають 0,1 мл фізіологічного розчину. Пробірки інкубують за температури 37 °С упродовж 30 хв.

5. Після інкубування в усі пробірки додають 0,1 мл 0,1 %-го НСТ-реактиву. Пробірки знову інкубують за температури 37 °С упродовж 30 хв.

6. Вміст пробірок обережно переносять на знежирені розчином етанолу предметні скельця та за допомогою іншого скельця розподіляють суспензію по всій поверхні (див. рис. 5.1). Після висихання мазків їх фарбують барвником нейтральним червоним.

7. На кожному препараті рахують 100 лейкоцитів та визначають відсоток нейтрофілів, які містять темні гранули диформагану в цитоплазмі.

### **Обробка експериментальних даних**

Для оцінки активності пероксидазної системи визначають середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК):

$$\text{СЦК} = (1a+2b+3c+4d)/100,$$

де  $a$  – кількість клітин з гранулами формагану, що займають 1/4 площі цитоплазми;  $b$  – 2/4 площі цитоплазми;  $c$  – 3/4 площі цитоплазми;  $d$  – всю площу цитоплазми.

Результати заносять до табл. 11.1.

*Таблиця 11.1*

### **Вплив екстрактів лікарських рослин на активність пероксидазної системи нейтрофілів**

Номер з/п	Назва лікарської рослини	СЦК

### **Аналіз отриманих результатів**

На основі отриманих даних порівнюють вплив екстрактів різних рослин на активність пероксидазної системи нейтрофілів та визначають, як компонентний склад екстрактів рослин може впливати на функціонування імунокомпетентних клітин.

### **Запитання для самоперевірки**

1. Що таке імунотропність?
2. Які є типи імунотропності?
3. Як можна оцінити імунотропність рослин відносно фагоцитів?

**Джерела:** [1]; [4]; [9].

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Иммунология: практикум* / Е. У. Пастер, В. В. Овод, В. К. Позур, Н. Е. Вихоть. – К. : Изд-во при Киев. ун-те, 1989. – 304 с.
2. *Кюнцель Д.* Организм человека: пер. с нем / Д. Кюнцель. – Берлин: VEB Verlag und Gesundheit, 1988. – 480 с.
3. *Методические* рекомендации по оценке аллергических свойств фармакологических средств. – М. : МЗ СССР, 1988. – 20 с.
4. *Павлович С. А.* Микробиология с вирусологией и иммунологией: учеб. пособ. / С. А. Павлович. – 2-е изд. – Минск: Вышей. шк., 2008. – 799 с.
5. *Петров Р. В.* Иммунология / Р. В. Петров. – М. : Медицина, 1983. – 368 с.
6. *Ройт А.* Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М. : Мир, 2000. – 592 с.
7. *Atlas R.M.* Handbook of microbiological media / Ronald M. Atlas. – 4th ed. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2010. – 2036 p.
8. *Benson: Microbiological Applications Lab Manual.* – 8<sup>th</sup> ed. – New York, USA: The McGraw-Hill Companies, 2003. – 349 p.
9. *Dorresteyn Stevens C.* Clinical immunology and serology: a laboratory perspective / Christine Dorresteyn Stevens. – 3rd ed. – Philadelphia: F.A. Davis Company, 2010. – 454 p.
10. *Hay F.C.* Practical Immunology / Frank C. Hay, Olwyn M.R. Westwood. – 4<sup>th</sup> ed. – Oxford, UK: Blackwell Science, 2002. – 400 p.
11. *Kleyn J.* Microbiology Experiments: A Health Science Perspective / John Kleyn, Mary Bicknell. – New York, USA: The McGraw-Hill Companies, 2003. – 349 p.
12. *Cruse J.M.* Atlas of Immunology / Julius M. Cruse, Robert E. Lewis. – 2<sup>nd</sup> ed. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. – 836 p.



## Додаток 1

### Склад поживних середовищ для культивування та підрахунку лактобактерій у слині та визначення активності зубного карієсу

#### Середовище Снайдера

Агар.....	16,0 г
Глюкоза .....	20,0 г
Пептон з казеїну .....	13,5 г
Дріжджовий екстракт.....	6,5 г
NaCl.....	5,0 г
Бромкрезоловий зелений .....	0,02 г
Дистильована вода .....	1 л

pH  $4,8 \pm 0,2$  при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Приготування середовища: усі компоненти розчиняють у дистильованій воді та доводять загальний об'єм до 1 л. Ретельно перемішують, розливають у пробірки об'ємом 10 мл. Автоклавують упродовж 15 хв за тиску 1 атм та температури  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , не перегріваючи. Розливають у стерильні чашки Петрі або залишають у пробірках.

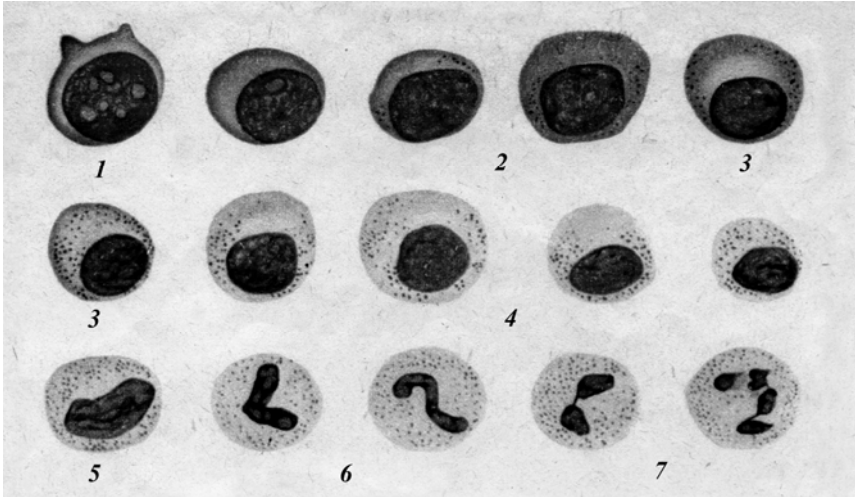
#### Тест-середовище Снайдера

Агар.....	20,0 г
Глюкоза .....	20,0 г
Пептон .....	20,0 г
NaCl.....	5,0 г
Бромкрезоловий зелений .....	0,02 г
Дистильована вода .....	1 л

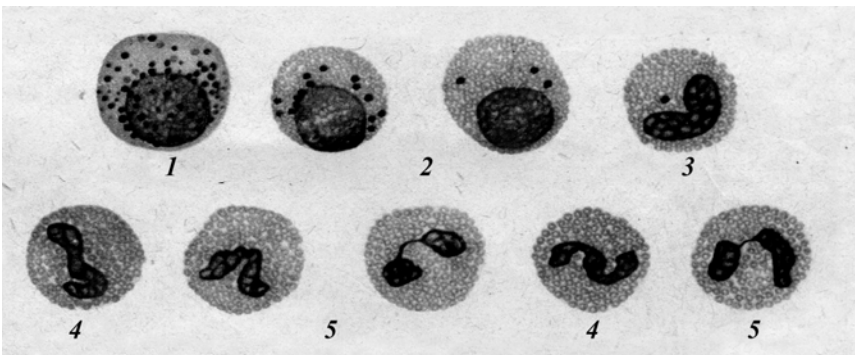
pH  $4,8 \pm 0,2$  при  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Приготування середовища: усі компоненти розчиняють у дистильованій воді та доводять загальний об'єм до 1 л. Ретельно перемішують, розливають у пробірки об'ємом 10 мл. Автоклавують упродовж 15 хв за тиску 1 атм та температури  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , не перегріваючи. Розливають у стерильні чашки Петрі або залишають у пробірках.

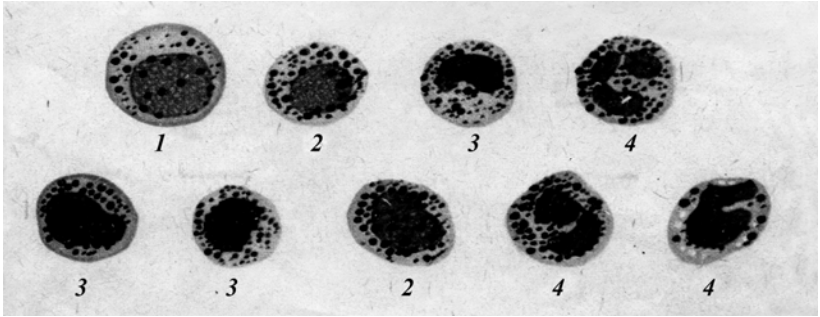
Клітини кровотворення



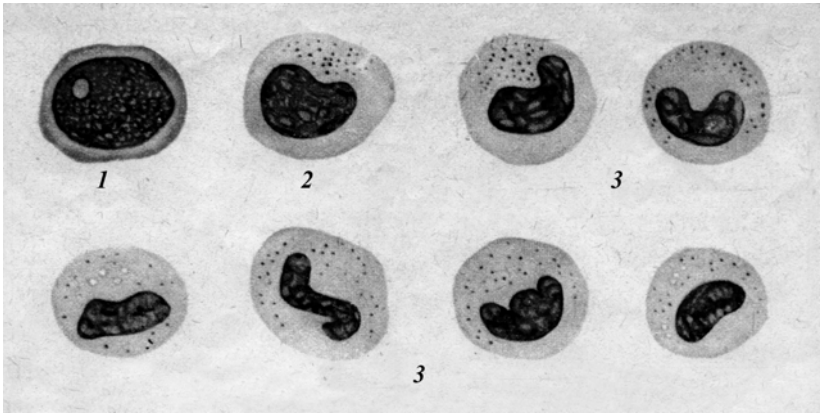
Розвиток нейтрофільного гранулоцита: 1 – мієлобласт; 2 – промієлоцит; 3 – материнський мієлоцит; 4 – дочірній мієлоцит; 5 – метамієлоцит; 6 – паличкоядерний нейтрофільний гранулоцит; 7 – сегментоядерний нейтрофільний гранулоцит



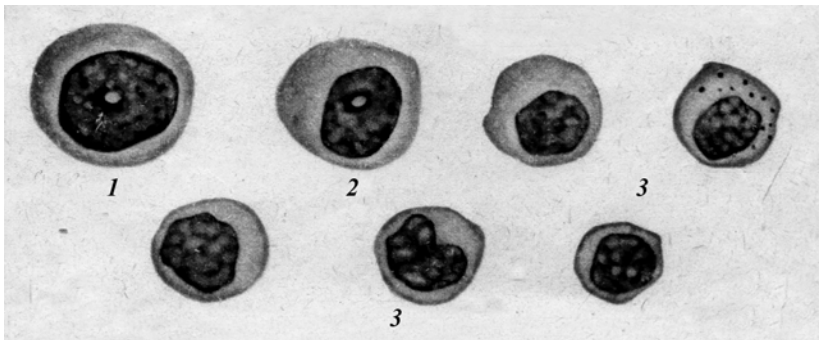
Розвиток еозинофільного гранулоцита: 1 – промієлоцит; 2 – мієлоцит; 3 – метамієлоцит; 4 – паличкоядерний еозинофільний гранулоцит; 5 – сегментоядерний еозинофільний гранулоцит



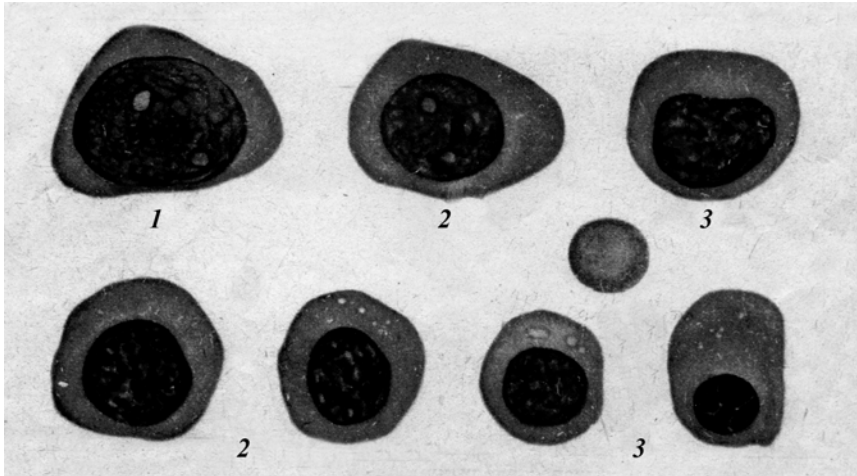
Розвиток базофільного гранулоцита: 1 – промієлоцит; 2 – мієлоцит; 3 – метамієлоцит; 4 – зрілий базофільний гранулоцит



Розвиток моноцита: 1 – монобласт; 2 – промоноцит; 3 – моноцит



Розвиток лімфоцита: 1 – лімфобласт; 2 – пролімфоцит; 3 – лімфоцит



Розвиток плазмоцита: 1 – плазмобласт; 2 – проплазмобласт;  
3 – плазмоцид (плазматична клітина)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	3
<b>Модуль I. ОСНОВНІ ФАКТОРИ НЕСПЕЦИФІЧНОГО І СПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ</b> .....	4
Лабораторна робота 1. ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРАЦІ В ІМУНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ. ПРАВИЛА РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ З ЖИВИМИ ОБ'ЄКТАМИ ТА БІОЛОГІЧНИМ МАТЕРІАЛОМ .....	4
Лабораторна робота 2. ОЦІНКА АКТИВНОСТІ ГУМОРАЛЬНИХ ФАКТОРІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ .....	12
Лабораторна робота 3. ОСНОВНІ ОРГАНИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ. ТИМУС, КІСТКОВИЙ МОЗОК, СЕЛЕЗІНКА, ЛІМФАТИЧНІ ВУЗЛИ, КРОВ. ВИВЧЕННЯ СТРУКТУРИ ОСНОВНИХ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ ОРГАНІВ .....	18
Лабораторна робота 4. ВИЗНАЧЕННЯ В СИРОВАТЦІ КРОВІ АНТИТІЛ РІЗНИХ КЛАСІВ.....	23
Лабораторна робота 5. ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-2 .....	27
<b>Модуль II. ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКЦІЇ</b> .....	32
Лабораторна робота 6. ВИЗНАЧЕННЯ В СЛИНІ ІМУНОГЛОБУЛІНУ А .....	32
Лабораторна робота 7. БЛОКАДА КЛІТИННИХ РЕЦЕПТОРІВ .....	36
Лабораторна робота 8. ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕРГІЧНОЇ РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТУ ДЕГРАНУЛЯЦІЇ БАЗОФІЛІВ .....	40
Лабораторна робота 9. ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРА НЕКРОЗУ ПУХЛИН .....	44
Лабораторна робота 10. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ КЛІТИН-КІЛЕРІВ .....	47
Лабораторна робота 11. ВИЗНАЧЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН .....	52
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	55
Додаток 1 .....	56
Додаток 2 .....	57

*Навчальне видання*

## ОСНОВИ ІМУНОЛОГІЇ

Лабораторний практикум  
для студентів напряму підготовки  
6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі: ГАРКАВА Катерина Григорівна,  
ДРАЖНІКОВА Анна Вікторівна

Редактор *Л. М. Дудченко*  
Коректор *Л. М. Романова*  
Технічний редактор *А. І. Лавринович*  
Комп'ютерна верстка *Н. С. Ахроменко*

Підп. до друку 10.03.2015. Формат 60x84/16. Папір офс.  
Офс. друк. Ум. друк. арк. 3,49. Обл.-вид. арк. 3,75.  
Тираж 100 пр. Замовлення № 28-1.

Видавець і виготівник  
Національний авіаційний університет  
03680. Київ-58, проспект Космонавта Комарова, 1

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру ДК № 977 від 05.07.2002