

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Методические указания для обучающихся по организации и проведению
самостоятельной работы по дисциплине**

**«Иммунология»
для студентов направления подготовки 06.03.01 Биология
направленность (профиль) Генетика, селекция и биоинформатика**

Введение

Методические рекомендации дисциплины «Иммунология» составлены в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом высшего образования по направлению подготовки 06.03.01 Биология-Генетика, селекция и биоинформатика

Содержание программы подготовки студентов предусматривает ознакомление студентов на профессиональном уровне с современными методами иммунологии в медицинских исследованиях, существующими подходами к решению диагностических и медицинских задач.

Иммунология - это раздел медицины, который занимается диагностикой и лечением нежелательных, обычно чрезмерно выраженных иммунных реакций на вещества из окружающей среды.

Основной **целью** пособия является получение необходимого объема знаний, навыков и умений в области иммунологии. Материал, собранный в разделах пособия, посвящен иммунологическим механизмам аллергических заболеваний, диагностике, лечению.

Объем информации отличается доступностью изложения основных аспектов этиологии, патогенеза, клиники, диагностики и лечения аллергических заболеваний.

Курс позволяет студентам приобрести знания о механизмах воздействия аллергенов на организм человека и функционировании его в новых условиях.

В основу подготовки студентов положено изучение современных достижений в области иммунологии. Практические занятия проводятся с целью выработки навыков клинического мышления и углубления теоретических знаний.

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по биохимическим закономерностям, представляющих важность при подготовке студентов медиков к системному восприятию естественнонаучных и профессиональных дисциплин, формировании у них навыков биохимического анализа, необходимых для последующей практической деятельности.

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по направлению подготовки 06.03.01 Биология-Генетика, селекция и биоинформатика

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при написании выпускной квалификационной работы, при прохождении преддипломной практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

ЗНАТЬ:

- о месте иммунологии, как медико-биологической науки, среди клинических медицинских дисциплин;
- о наиболее актуальных направлениях в иммунологии;
- об иммунобиотехнологии, как важнейшем звене иммунологии по разработке и получению высокоэффективных диагностических и лечебных средств на основе новых технологий.
- строение и функции иммунной системы;
- клеточные и гуморальные факторы врожденного и приобретенного иммунитета;
- межклеточные взаимодействия в иммунной системе;
- гормоны и медиаторы иммунной системы
- основы иммуногенетики
- болезни иммунной системы (иммунопатологию)
- принципы назначения иммуномодулирующих препаратов;
- основные принципы лечения иммунодефицитов.

УМЕТЬ:

- оценить иммунный статус в норме и патологии;

- обследовать пациентов с иммунопатологией;
- оценить иммунные нарушения при различных заболеваниях;
 - собрать иммунологический анамнез

ВЛАДЕТЬ:

- современными методами иммунного анализа;
- тестами оценки иммунного статуса человека 1 и 2 уровня

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к экзамену.

Методические рекомендации при подготовке к творческим проектам

Изучение основных разделов иммунологии заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На коллоквиум могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические рекомендации по подготовке к экзамену

Подготовка к экзамену по иммунологии должна быть систематической и планомерной. Результат освоения теоретического материала, написание и осмысление конспектов по основным и дополнительным темам, решение задач, а также проведение

лабораторного практикума, закрепление практических навыков и построение логической взаимосвязи между теорией и практикой – все это является залогом усвоения полного объема полученных знаний и достаточной базой для подготовки к экзаменам.

Перед сдачей экзамена рекомендуется просмотреть все источники библиографического списка и собственные конспекты. Вопросы к экзамену приведены в рабочей программе дисциплины

Рекомендуемая литература и интернет

Основная литература

1. Анохина, Н. В. Общая и клиническая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н. В. Анохина. — 2-е изд. — Электрон. текстовые данные. — Саратов : Научная книга, 2019. — 159 с. — 978-5-9758-1755-6. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/81032.html>

2. Основы клинической иммунологии и аллергологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / А.А. Алексеева [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2016. — 152 с. — 978-5-906332-32-5. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70801.html>

3. Чхенкели, В. А. Иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / В. А. Чхенкели. — Электрон. текстовые данные. — СПб. : Проспект Науки, 2015. — 144 с. — 978-5-906109-21-7. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/80076.html>

Дополнительная литература

1. Магер, С. Н. Физиология иммунной системы [Электронный ресурс] : учебное пособие / С. Н. Магер, Е. С. Дементьева, О. М. Горшкова. — Электрон. текстовые данные. — Новосибирск : Новосибирский государственный аграрный университет, 2010. — 248 с. — 2227-8397. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/64800.html>

2. Основы общей иммунологии [Электронный ресурс] : учебное пособие для студентов медицинских вузов / Л.В. Ганковская [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2014. — 124 с. — 978-5-906332-39-4. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70802.html>

3. Павлович С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учебное пособие / С.А. Павлович. — Электрон. текстовые данные. — Минск: Вышэйшая школа, 2013. — 800 с. — 978-985-06-2237-2. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/24067.html>

4. Хаитов, Р. М. Иммунология : Учеб. для мед. вузов / Р. М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. — М. : Медицина, 2000. — 432 с. — (Учебная литература для студентов медицинских вузов). — Гриф: Рек. МО. — ISBN 5-225-04543-X

5. Чурилов, Л. П. Патофизиология иммунной системы [Электронный ресурс] : учебное пособие / Л. П. Чурилов, А. Г. Васильев. — Электрон. текстовые данные. — СПб. : Фолиант, 2014. — 664 с. — 978-5-93929-251-1. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/60938.html>

Интернет-ресурсы

1. <http://diagnozlab.com/> - Сайт о лабораторной диагностике
<http://rudocctor.net/> - Медицинский портал
<http://www.e-reading.club/> - Большая онлайн библиотека
<http://www.livemedical.ru/> - IT-медицина
<http://www.pubmed.com/> - база данных полнотекстовых статей по медицине
<https://dic.academic.ru/> - Словари и энциклопедии
<https://www.rmj.ru/> - Русский медицинский журнал

8. <http://immunology.ru> - Проект для профессионалов и пациентов, посвященный проблемам иммунитета при различных заболеваниях.
9. <http://kl-im.ru> - Клиника Иммунопатологии Института Клинической Иммунологии.
10. <http://www.bronho.ru> - Клиника астмы и иммунологии.
11. <http://www.kl-im.ru> - Клиника Иммунопатологии ГУ НИ ИКИ СО РАМН.
12. mysitecost.ru/аллергология-и-иммунология/ - «аллергология и иммунология», профессиональный сайт.

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Методические указания по выполнению практических работ по дисциплине

«Иммунология»
для студентов направления подготовки 06.03.01 Биология
направленность (профиль) Генетика, селекция и биоинформатика

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к лабораторным занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в лабораторном практикуме, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название лабораторной работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода.
5. Ход выполнения работы.
6. Результаты.
7. Выводы..

Лабораторная работа № 1

Тема: ЛАБОРАТОРИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
МНОГОПРОФИЛЬНОГО ЛПУ. ЗАДАЧИ. СТРУКТУРА. ПРАВИЛА РАБОТЫ В
ЛАБОРАТОРИИ. ЭТАПЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

План занятия

1. Структура лаборатории клинической иммунологии. Задачи. Техническая оснащённость. Автоматизация.
2. Основы техники безопасности. Санэпидрежим. Дезинфицирующие средства. Правила работы с дезинфицирующими средствами.
3. Этапы лабораторных иммунологических исследований: преаналитический, аналитический, постаналитический. Задачи этапов, характеристика возможных ошибок.
4. Виды биоматериала, поступающего на исследование. Техника обработки, получение проб, условия хранения проб.

Практические навыки:

- прием биоматериала, оценка качества биоматериала и сопроводительной документации, маркировка, регистрация, приготовление проб для анализа;
- освоение работы:
 - с центрифугой;
 - микроскопом;
 - на иономере;
 - с термостатом;
- техника обработки лабораторной посуды, подготовка посуды к работе, правила утилизации биоматериала;
- знания основ санэпидрежима;
- умение оформлять сопроводительные документы и результаты анализов.

Методические указания к выполнению заданий

В лаборатории клинической иммунологии проводятся исследования биоматериала, относящегося к группе потенциально инфицированного (кровь, суспензия клеток, сыворотка, плазма, секреты, моча и др.). Это требует соблюдения основных требований техники безопасности, санэпидрежима.

Правила работы в лаборатории клинической иммунологии:

- биоматериал студентам раздает преподаватель или ответственный по группе;
- работу с биоматериалом проводят в халатах, шапочках, перчатках;
- на рабочем месте не должны находиться предметы, не относящиеся к работе;
- на рабочем столе необходимо иметь емкость с дезинфицирующим раствором и ветошью;
- рабочее место после работы дезинфицируют;

- при попадании биоматериала на спецодежду или рабочую поверхность место дезинфицируют, одежду замачивают в кастрюле с дезинфицирующим раствором;
- одноразовый вспомогательный материал, использованные пробирки, инструменты и другие предметы, контактировавшие с биоматериалом, дезинфицируют в соответствующих маркированных емкостях с дезинфицирующим раствором;
- в конце занятия рабочее место приводят в порядок, перчатки погружают в соответствующую промаркированную емкость с дезинфицирующим раствором, моют руки.

Освоение техники работы с приборами:

- на центрифуге (центрифугирование смешанной слюны);
- на ионометре (измерение рН готового буферного раствора);
- с микроскопом (подсчет клеток мазка крови).

После выполнения задания провести обработку использованного оборудования: центрифугу и ионометр протереть ветошью, смоченной дезинфицирующим раствором; объектив микроскопа иммерсионного протереть сухой чистой ветошью, окуляры – 70° спиртом. Объективы установить в нерабочее положение.

Освоение техники обработки посуды и утилизации биоматериала

Утилизация биоматериала:

- а) сгустки крови сбрасывают в специальную маркированную емкость и засыпают сухой хлорной известью в соотношении 1 ч. сухой хлорной извести и 5 ч. сгустков крови;
- б) остатки слюны обрабатывают тем же способом;
- в) остатки сыворотки сливают в маркированную емкость и заливают дезинфицирующим раствором в соотношении 1:5.

Обработка лабораторной посуды:

- а) стеклянные пробирки после освобождения биоматериала закладывают в маркированную тару, заливают дезинфицирующим раствором, и после часа инкубации пробирки проходят этап предстерилизационной обработки и стерилизации;
- б) пластиковую одноразовую посуду после обработки в дезинфицирующем растворе сбрасывают в специальный пакет для лабораторных отходов;
- в) пластиковую посуду многоразового использования после обработки дезраствором тщательно промывают проточной, затем дистиллированной водой, подсушивают и готовят к работе;
- г) силиконируют посуду, предназначенную для работы с клетками (раствор для силиконирования: 1 ч. силикона + 10 – 16 ч. эфира).

Контрольные вопросы

1. Приготовление растворов, используемых для подщелачивания или подкисления основных рабочих растворов
2. Приготовление забуференного раствора.
3. Постаналитический этап иммунологических исследований, утилизация биоматериала.
4. Способы консервации крови в иммунологических исследованиях. Примеры ряда консервантов, их приготовление, использование, хранение.
5. Техника забора крови, получения сыворотки. Способы хранения.

Лабораторная работа № 2

Тема: ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ЛАБОРАТОРНЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

План занятия

1. Техника работы на основных приборах, используемых в иммунологической лаборатории.
2. Техника электро- и пожаробезопасности.

3. Техника приготовления реактивов для проведения иммунологических исследований.

Практические навыки:

- умение работать:
 - на вертикальном фотометре;
 - на хемиллюминометре;
 - с пипеточными дозаторами;
 - на аналитических весах.
- умение приготовить реактивы и измерить их объем.

Методические указания к выполнению заданий

Выдачу химических реактивов проводит преподаватель или старший лаборант лаборатории. Работу на приборах контролирует преподаватель.

Реактивы и оборудование:

- вертикальный фотометр, предназначенный для определения оптической плотности исследуемых образцов в ИФА методе;
- пипеточные дозаторы со сменными наконечниками, предназначенные для точного измерения объема растворов: физиологического, ЭДТА, гепарина, глюкозы, лимонной кислоты.

Освоение работы на анализаторах:

- освоение работы на фотометре по программам «Качественный метод определения антител» и «Количественный метод определения антител» на примере определения антител к тиреоглобулину (ТГ);
- ввод маркировки образца;
- проведение дозирования раствора одно- и многоканальным дозатором в разных объемах.

После выполнения заданий приборы выключить, провести обработку поверхностей приборов и дозаторов дезинфицирующим средством.

Использованную посуду, наконечники, остатки клеточной суспензии, сыворотки обработать согласно требованиям санэпидрежима.

Освоение принципов приготовления реактивов

Приготовление физраствора (изотонический раствор NaCl):

физиологический раствор 0,9 %-ный, pH 7,0-7,2: взвесить на аналитических весах 9 г химически чистого хлорида натрия (NaCl), растворить его в небольшом количестве дистиллированной воды и довести объем до 1 л дистиллированной водой; измерить pH полученного раствора на ионометре. Доведение pH до нужных показателей проводится одномолярным раствором HCl (1 моль/л) или NaOH. Хранится физраствор при комнатной температуре.

Приготовление антикоагулянтов

Раствор гепарина с концентрацией 200 ЕД/мл: к 1 мл исходного раствора гепарина (коммерческий), содержащего 5000 ЕД/мл гепарина, добавить 24 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2. Хранить при + 4 °С. Конечная концентрация в смеси с кровью 20 ЕД/мл (10 мл крови + 1 мл гепарина с содержанием 200 ЕД/мл, или 0,1 мл гепарина + 1 мл крови).

2,7 и 6 %-ные растворы ЭДТА (трилон Б) – двунатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – Na ЭДТА: взвесить 2,7 г ЭДТА и 6 г ЭДТА; растворить каждую навеску в 100 мл стерильного физиологического раствора pH 7,2. Хранить при + 4 °С. Учитывая, что ЭДТА способствует снижению экспрессии CD4, а гепарин угнетает фагоцитоз, в клинической лабораторной иммунологии используют смесь гепарина и ЭДТА.

Смесь гепарина и ЭДТА: смешать 1 ч. гепарина с содержанием 200 ЕД/мл с 2 объемами 6 %-ного ЭДТА. Хранить при + 4 °С. Используют в соотношении 1:10 с кровью (1 мл антикоагулянта + 10 мл крови).

Приготовление цитратного гемостабилизатора (для предотвращения агрегации тромбоцитов). Взвесить 13,2 г цитрата натрия (хч), 4,8 г лимонной кислоты (хч), 25 г глюкозы (хч); довести до 1 л стерильной дистиллированной водой. Оптимальное значение рН 6,5. Хранить при + 4 °С. Используется в соотношении к лейкоцитарной взвеси 1 : 7. Записать основные моменты занятия и этапы лабораторных иммунологических исследований.

Контрольные вопросы

1. Техника безопасности при работе в лаборатории. Утилизация биоматериала.
2. Преаналитический этап иммунологических исследований. Прием биоматериала, требования к его качеству, обработка крови, получение и хранение проб сыворотки крови.
3. Приготовление цитратного гемостабилизатора.
4. Приготовление антикоагулянтов.

Лабораторные работы № 3-4

Тема: СИСТЕМА ЛИМФОЦИТОВ. Т-И В-ЗВЕНО ИММУНИТЕТА.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА Т-ЛИМФОЦИТОВ (Е-РОК). ОПРЕДЕЛЕНИЕ
КОЛИЧЕСТВА В-ЛИМФОЦИТОВ (ЕАС-РОК)

План занятия

1. Характеристика маркеров Т- и В-лимфоцитов.
2. Принцип метода. Компоненты реакции.
3. Приготовление реактивов.
4. Подготовка биоматериала к анализу (выделение лимфоцитов).
5. Техника проведения анализа, учет результатов, контроль качества.

Практические навыки:

умение:

- подсчитать содержание лейкоцитов в камере Горяева и в мазке крови по общепринятым лабораторным методам;
- выделить лимфоциты в градиенте плотности;
- подсчитать абсолютное и относительное содержание лимфоцитов в выделенной популяции;
- приготовить раствор краски по Романовскому – Гимзе и покрасить мазки;
- приготовить реактивы для анализа;
- работать с центрифугой, микроскопом, пользоваться камерой Горяева.

Методические указания к выполнению заданий

На поверхности как В-лимфоцитов, так и Т-лимфоцитов имеются рецепторы. Важнейшие маркеры, характерные для В-лимфоцитов, – рецепторы иммуноглобулиновой природы. Для их выявления используют метод иммунофлюоресценции с мембранными иммуноглобулинами. Добавляя к лимфоцитам антисыворотку против иммуноглобулинов человека, меченных флюорохромом, можно подсчитать лимфоциты, несущие иммуноглобулиновые детерминанты, т. е. В-лимфоциты.

Кроме того, В-лимфоциты, как и Т-лимфоциты, можно определить по наличию на их мембране рецепторов к эритроцитам барана. (Е-РОК, ЕАС-РОК, розеткообразные клетки). Принцип метода заключается в выявлении Т- и В-клеток по их способности образовывать «розетки» с бараными эритроцитами. «Розетки» представляют собой лимфоцит, окруженный тремя или более эритроцитами барана. Процент содержания Т- и В-лимфоцитов определяется подсчетом числа «розеток» на 200 лимфоцитов.

Определение числа Т- и В-лимфоцитов имеет важное значение для диагностики иммунодефицитных состояний, оценки гуморального и клеточного иммунитета, выявления лимфопролиферативных, инфекционных и других заболеваний, для контроля за их лечением.

У здоровых людей В-лимфоциты составляют 20 – 30 % общего числа лимфоцитов; Т-лимфоциты – 50 – 70 %, около 10 % лимфоцитов не имеют рецепторов для Т- и В-лимфоцитов.

Реактивы и оборудование:

- раствор фиколл-верографина в градиенте плотности (для выделения лимфоцитов);
- раствор Хенкса или среды 199 (готовые);
- раствор глютаральдегида (для фиксации клеток);
- метанол;
- краски по Романовскому – Гимзе (для окраски мазков);
- эритроциты барана;
- смесь ЕАС (эритроциты барана, нагруженные АТ в среде комплемента) для определения количества В-лимфоцитов;
- центрифуга, микроскоп, камера Горяева;
- ареометр или денситометр (для измерения плотности раствора);
- силиконизированные или пластмассовые пробирки;
- предметные стекла (обезжиренные).

Приготовление реактивов:

1) раствор фиколл-верографина (для выделения лимфоцитов):

из раствора 76 %-ного верографина приготовить 33,8 %-ный верографин (плотность – 1020 – 1025): 33,9 мл 76 %-ного верографина + 42,1 мл, дистиллированной воды = 76 мл 33,8 %-ного верографина;

из фиколла приготовить 9 %-ный раствор: 10,8 г фиколла + 109,2 мл воды = 120 мл 9 % фиколла; соединить 7 ч. верографина и 16 ч. фиколла: 52,5 мл верографина + 120 мл фиколла = 172,5 мл раствора фиколл-верографина (плотность – 1,077). Плотность измерить ареометром. Для лучшего растворения использовать воду, подогретую до 37 °С. К верографину добавлять раствор фиколла, а не наоборот;

2) эритроциты барана: используют эритроциты одного животного или смесь, полученную от нескольких. Эритроциты можно хранить в течение двух недель при + 4 °С в растворе Олсвера. Перед употреблением эритроциты барана 3 – 4 раза отмыть фосфатным буфером и приготовить 0,5 %-ную по объему взвесь клеток;

3) раствор Олсвера : 2,05 г глюкозы + 0,8 г цитрата натрия + 0,42 г хлорида натрия + 100 мл дистиллированной воды (рН доводят до 6,1 раствором лимонной кислоты).

Выделение лимфоцитов из периферической крови для определения Т- и В-лимфоцитов:

- взятую из вены кровь в пробирку с ЭДТА (2,7 %-ный раствор ЭДТА из расчета 1 мл на 10 мл крови; рН 7,4) развести в соотношении 1 : 3 раствором Хенкса (без Ca^{++} и Mg^{++});

- в пробирку налить 3 мл раствора фиколл-верографина (плотность 1,077);

- с помощью пастеровской пипетки или шприца с длинной иглой осторожно наложить 8 мл разведенной крови на раствор фиколл-верографина, пробирку центрифугировать 30 мин в горизонтальном положении при 1500 об/мин;

- из белесого кольца, образовавшегося после центрифугирования на границе смеси фиколл-верографина и разведенной крови, осторожно пастеровской пипеткой собрать взвесь мононуклеарных клеток. Биоматериал готов к анализу.

Техника постановки анализа

1. Для определения количества Т-клеток: концентрацию эритроцитов барана довести раствором Хенкса (или средой 199) до 0,5 %-ной концентрации; в силиконизированные или пластиковые пробирки объемом 1,2 мл внести 0,1 мл суспензии выделенных в градиенте лимфоцитов, довести раствором Хенкса или средой 199 до объема 2×10^6 мл;

смесь инкубировать при 37 °С 5 мин, затем центрифугировать 5 мин при 750 об/мин и инкубировать 60 мин при + 12 °С; после инкубации клетки фиксируют глютаральдегидом

альдегидом (0,1 мл 0,8 %-ного раствора). Мазки фиксируют в метаноле (или смеси Никифорова), красят по Романовскому – Гимзе.

2. Для определения количества В-клеток: содержание лимфоцитов, выделенных в градиенте фиколл-верографина, довести раствором Хенкса или средой 199 до 2×10^6 мл; в силиконизированные или пластиковые пробирки внести 0,1 мл лимфоцитов и 0,1 мл 0,5 %-ного раствора ЕАС комплекса (эритроциты барана, нагруженные АТ в среде комплемента); смесь центрифугировать при 150 – 200 g/мин 5 мин.

Образовавшиеся «розетки» фиксируют, добавляя в пробирки 0,05 мл 3 %-ного раствора глутарового альдегида в фосфатном буфере. Фиксируют 20 мин при комнатной температуре и прекращают фиксацию добавлением избытка дистиллированной воды; затем клетки осаждают при центрифугировании (1000 об/мин).

Надосадочную жидкость удаляют. Оставшуюся взвесь тщательно пипетируют и заносят на хорошо обезжиренное стекло, которое потом высушивают на воздухе и фиксируют 5 мин в метаноле.

После окраски мазков по Романовскому – Гимзе препараты готовы для подсчета клеток. Время окрашивания – 17 – 20 мин в разведении 1:10.

Учет результатов

Полученные мазки Т- и В-клеток микроскопируют в иммерсионной системе микроскопа. Подсчитывают количество лимфоцитов, фиксирующих на своей поверхности 3 и более эритроцитов на 200 лимфоцитов.

Пересчет их количества на абсолютное число осуществляется по формуле
$$\text{абс кол-во Е-РОК} = \text{абс. кол-во лейкоцитов} \times \% \text{ лимфоцитов} \times 10000$$

Контрольные вопросы

1. Отличительные характеристики Т- и В-клеток
2. Основные функции Т-клеток.
3. Основные функции В-клеток.
4. Этапы получения клеточной взвеси с использованием градиента плотности.
5. В-система клеток. Субпопуляции. Методы идентификации.
6. Т-система клеток. Субпопуляции. Методы идентификации.

Рекомендуемая литература и интернет

Литература

Основная:

- 1 Анохина, Н. В. Общая и клиническая иммунология Электронный ресурс : Учебное пособие / Н. В. Анохина. - Общая и клиническая иммунология, 2020-02-05. - Саратов : Научная книга, 2019. - 159 с. - Книга находится в премиум-версии ЭБС IPR BOOKS. - ISBN 978-5-9758-1755-6
- 2 Основы клинической иммунологии и аллергологии Электронный ресурс : учебное пособие / Г.А. Новик / Д.А. Новикова / Е.В. Соколова / М.В. Хорева / Р.Я. Мешкова / Е.Л. Семикина / Л.С. Намазова-Баранова / Ю.Г. Левина / С.Э. Валиева / А.А. Алексеева / Л.В. Ганковская / Е.А. Вишнева / В.В. Греченко / Д.Д. Карташов / Г.А. Игнатьева ; Р.Я. Мешкова ; Л.В. Ганковская ; ред. Л.С. Намазова-Баранова. - Основы клинической иммунологии и аллергологии, 2022-09-26. - Москва : ПедиатрЪ, 2016. - 152 с. - Книга находи

дополнительная литература:

- 1 Магер, С.Н. Физиология иммунной системы Электронный ресурс : учебное пособие / О.М. Горшкова / Е.С. Дементьева / С.Н. Магер. - Физиология иммунной системы, 2018-05-30. - Новосибирск : Новосибирский государственный аграрный университет, 2010. - 248 с. - Книга находится в

базовой версии ЭБС IPRbooks.

- 2 Основы общей иммунологии Электронный ресурс : учебное пособие / С.М. Юдина / Э.Б. Белан / А.А. Алексеева / Д.Д. Карташов / Т.В. Куличенко / К.В. Русанова / Е.В. Соколова / Л.В. Ганковская / Р.Я. Мешкова / Л.С. Намазова-Баранова / Н.Г. Астафьева / М.В. Хорева / В.В. Греченко ; Р.Я. Мешкова ; Л.С. Намазова-Баранова ; ред. Л.В. Ганковская. - Основы общей иммунологии, 2022-09-26. - Москва : ПедиатрЪ, 2014. - 124 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-906332-39-4

«Интернет»-ресурсы , необходимые для освоения темы:

- 1 <http://diagnozlab.com/> - Сайт о лабораторной диагностике
- 2 <http://rudocctor.net/> - Медицинский портал
- 3 <http://www.e-reading.club/> - Большая онлайн библиотека
- 4 <http://www.livemedical.ru/> - IT-медицина
- 5 <http://www.pubmed.com/> - база данных полнотекстовых статей по медицине
- 6 <https://dic.academic.ru/> - Словари и энциклопедии
- 7 <https://www.rmj.ru/> - Русский медицинский журнал
8. <http://immunology.ru> - Проект для профессионалов и пациентов, посвященный проблемам иммунитета при различных заболеваниях.
9. <http://kl-im.ru> - Клиника Иммунопатологии Института Клинической Иммунологии.
10. <http://www.bronho.ru> - Клиника астмы и иммунологии.
11. <http://www.kl-im.ru> - Клиника Иммунопатологии ГУ НИ ИКИ СО РАМН.
12. mysitecost.ru/аллергология-и-иммунология/ - «аллергология и иммунология», профессиональный сайт.