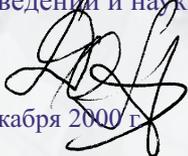


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

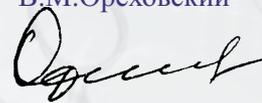
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



26 декабря 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский



26 декабря 2000 г.

Регистрационный № 174-0012

**АНТИГЕНЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ
ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА
НА СТАФИЛОКОККОВЫЙ АНАТОКСИН**

Минск 2000

[Перейти к оглавлению](#)

Основное учреждение-разработчик: НИИ гематологии и переливания крови

Учреждение-соисполнитель: Республиканская станция переливания крови

Авторы: В.И. Левин, Э.Л. Свирновская, Г.В. Семенов, А.Е. Калмыкова, В.С. Бондаренко

Рецензенты: д-р мед. наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук, доц. Л.А. Смирнова

На основании сопоставления различных параметров системы антигенов главного комплекса гистосовместимости (система HLA) и титров специфических антител сыворотки крови у доноров, проиммунизированных стафилококковым анатоксином, предложены маркеры системы HLA, прогнозирующие высокий и низкий уровень иммунного ответа на изученный антиген. Даны рекомендации для комплектования групп иммунизируемых доноров и общие представления об антигенах системы HLA. Методические рекомендации предназначены для врачей службы крови и врачей всех профилей, работающих по проблеме «HLA и болезни».

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
АНТИГЕНЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА	7
ТКАНЕВОЕ ТИПИРОВАНИЕ	18
ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ	19
1. Сепарация суммарной популяции лимфоцитов	19
2. Получение В-лимфоцитов для HLA-DR-типирования	19
3. Постановка реакции	21
4. Учет результатов реакций в микролимфоцитотоксическом тесте при любом способе окраски	23
5. Приготовление реактивов, используемых в микролимфоцитотоксическом тесте	23
ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОВНЯ ИММУННОГО ОТВЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ СИСТЕМЫ HLA	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27

ВВЕДЕНИЕ

Терапия гнойно-воспалительных заболеваний, вызываемых условно-патогенными возбудителями, относится к актуальным проблемам современной медицины. Лидирующее положение среди возбудителей данного вида патологии по-прежнему занимают стафилококки. Антибиотикотерапия, даже с использованием препаратов последнего поколения, далеко не всегда способна купировать прогрессирование инфекционного процесса, особенно у новорожденных и в случаях развития вторичного иммунодефицита. Наблюдаемое в последние десятилетия существенное повышение эффективности терапии больных со стафилококковой инфекцией, особенно в остром периоде заболевания, когда требуется быстрое купирование патологического процесса, обусловлено внедрением в практику здравоохранения компонентов и препаратов крови, содержащих иммуноглобулины направленного действия. Единственным источником их получения являются доноры, в плазме крови которых содержатся α -антистафилолизины, вырабатываемые вследствие направленной (искусственной) иммунизации добровольцев стафилококковым анатоксином. Однако низкие титры специфических антител, регистрируемые в достаточно большом проценте случаев у проиммунизированных доноров, обуславливают непригодность их крови для получения гипериммунных препаратов, что ограничивает широкое использование последних в клинической практике. Объяснение указанному обстоятельству находится в одном из основных принципов современной иммунологии — концепции о конкретности иммунного ответа. В основе последней лежит представление о том, что способность к иммунному ответу на любой антигенный стимул генетически детерминирована и подвержена значительным индивидуальным колебаниям. При этом низкий уровень иммунного ответа индивидуума на один антиген может сочетаться с высокой отвечаемостью на иммунизацию другим антигеном. Таким образом, повышение эффективности проводимой иммунизации непосредственно

связано с определением потенциальной иммунологической реактивности индивида на каждый конкретный антиген. Вместе с тем, схемы получения гипериммунных препаратов не предусматривают ни одного критерия отбора доноров, позволяющих прогнозировать исход иммунизации.

Согласно действующей «Инструкции по иммунизации доноров стафилококковым анатоксином и проведению плазмафереза для получения антистафилококковой плазмы» (Москва, 1977), предусмотренный комплекс клиничко-лабораторного обследования доноров, привлекаемых к иммунизации, направлен исключительно на охрану их здоровья.

Прогнозирование же уровня ответа организма на антиген, используемый для иммунизации (в нашем случае — на стафилококковый анатоксин), создает условия для рационального использования контингента добровольцев, привлекаемых к иммунизации. Исключение из группы иммунизируемых стафилококковым анатоксином доноров, у которых предполагается получение гипериммунной плазмы крови с низким титром α -антистафилолизиннов (ниже 3 ME), позволяет привлекать их к иммунизации другими антигенами, что при ограниченном контингенте доноров представляется достаточно перспективным. Включение в группу иммунизируемых лиц доноров с прогнозируемым высоким уровнем ответа на стафилококковый анатоксин позволяет получить плазму крови с высоким титром антител от большего количества доноров, что дает ощутимый экономический эффект. При этом повышается качество антистафилококковых препаратов крови, а следовательно, и лечебная эффективность их клинического использования. Несомненным преимуществом использования метода прогнозирования выраженности иммунного ответа на стафилококковый анатоксин и научно обоснованного, по его результатам, отклонения ареактивных доноров от иммунизации является исключение нежелательной для них антигенной нагрузки, связанной с проводимой иммунизацией.

Антигены главного комплекса гистосовместимости в прогнозировании иммунного ответа...

Данные, полученные в последние десятилетия в отношении механизма поддержания иммунологического гомеостаза организма, определили возможные пути прогнозирования выраженности иммунных реакций. Прежде всего к ним относится поиск маркеров высокого и низкого уровня иммунного ответа организма на конкретный антигенный стимул в системе антигенов главного комплекса гистосовместимости (система HLA), высокий полиморфизм которой, равно как и определяющая роль в поддержании гомеостаза организма, в настоящее время не вызывает сомнений.

АНТИГЕНЫ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Система антигенов главного комплекса гистосовместимости относится к наиболее важным из известных иммуногенетических систем человека в связи с ее высоким полиморфизмом и активным участием в жизненно важных биологических процессах, протекающих в организме.

Первый антиген этой системы был открыт в 1958 г. Ж. Доссе с помощью сывороток больных, которым осуществлялись многократные трансфузии крови. К настоящему времени известно более 200 антигенов этой системы, стандартная номенклатура которой установлена специальной комиссией ВОЗ как Human Leukocyte Antigens (система HLA). Главный комплекс гистосовместимости (ГКГС) человека расположен на коротком плече 6-й аутосомной хромосомы и занимает область 1,5–2 сантиморгана. Размеры комплекса позволяют разместиться в нем 10^5 – 10^6 генов. В настоящее время все HLA-гены и кодируемые ими антигены подразделяются на три класса. К I классу относятся гены, детерминирующие антигены локусов A, B и C, идентифицируемые серологически. Антигены HLA II класса контролируются, как минимум, 4–5 локусами, аллели которых выявляются либо по реакции с цитотоксическими Т-лимфоцитами в смешанной культуре лимфоцитов (локусы D и DP), либо серологически в микролимфоцитотоксическом тесте с В-лимфоцитами (локусы DR и DQ). Очевидно, что при столь большом числе аллелей в каждом локусе I и II классов система HLA характеризуется огромным полиморфизмом, усиливающимся существованием аллотипических форм молекул HLA класса III, кодирующих продукцию компонентов комплемента C2, C4a, C4b, Bf, а также ферменты стероидов (21-гидроксилаза) и цитокины (фактор некроза опухоли) и др. (см. табл. 1, 2).

Следует отметить, что HLA-антигены I класса экспрессированы на всех ядродержащих клетках организма, за исключением нейронов ЦНС, сперматозоидов человека, эндотелия роговицы, трофобласта, клеток эндокринных и экзокринных желез. Незначительно представлены они и на красных кровяных клетках. Антигены II класса имеют более ограниченное распространение и располагаются на поверхности мембраны В-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, включая макрофаги, дендритных клеток, купферовских клеток, эндотелиоцитов, кроме клеток ЦНС и плаценты. Наследование HLA-комплекса происходит по кодоминантному типу, а из-за неравновесного сцепления наблюдается устойчивость HLA-гаплотипов. Неравновесное сцепление объясняется низкой частотой рекомбинаций для системы HLA, которая составляет для генов III, II, I классов соответственно 0,94%, 0,74%, 0,31%.

Биологическая роль антигенов ГКГС определяется их участием в различных сторонах жизнедеятельности организма человека, прежде всего, в развитии иммунного ответа организма на антигенный стимул. В основе объяснения участия HLA-антигенов в клеточном взаимодействии при иммунном ответе лежит теория «двойного распознавания». Сущность теории состоит в том, что распознающие антиген Т-лимфоциты должны «удостовериться», что чужеродный антиген представлен для распознавания клеткой собственного организма, т.е. одновременно с распознаванием чужеродного идет и распознавание «своего» по антигенам гистосовместимости.

Номенклатура антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса

HLA A	HLA B	HLA B	HLA C
A 1	B 5	B50 (21)	Cw 1
A 2	B 7	B 51(5)	Cw 2
A 203	B 703	B 5102	Cw 3
A 210	B 8	B 5103	Cw 4
A 3	B 12	B 52(5)	Cw 5
A 9	B 13	B 53	Cw 6
A 10	B 14	B 54(22)	Cw 7
A 11	B 15	B 55(22)	Cw 8
A 19	B 16	B 56(22)	Cw 9(w 3)
A 23(9)	B 17	B 57(17)	Cw 10(w 3)
A 24(9)	B 18	B 58(17)	
A 2403	B 21	B 59	

HLA A	HLA B	HLA B	HLA C
A 25(10)	B 22	B 60(40)	
A 26(10)	B 27	B 61(41)	
A 28	B 35	B 62(15)	
A 29(19)	B 37	B 63(15)	
A 30(19)	B 38(16)	B 64(14)	
A 31(19)	B 39(16)	B 65(14)	
A 32(19)	B 3901	B 67	
A 33(19)	B 3902	B 70	
A 34(10)	B 40	B 71(70)	
A 36	B 4005	B 72(70)	
A43	B 41	B 73	
A 66(10)	B 42	B 75(15)	
A 68(28)	B 44(12)	B 76(15)	
A 69(28)	B 45(12)	B 77(15)	
A 74(19)	B 46	B 7801	
	B 47	Bw 4	
	B 48	Bw 6	
	B 49(21)		

Номенклатура антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса

HLA D	HLA DR	HLA DQ	HLA DP
Dw 1	DR 1	DQ 1	DPw 1
Dw 2	DR 103	DQ 2	DPw 2
Dw 3	DR 2	DQ 3	DPw 3
Dw 4	DR 3	DQ 4	DPw 4
Dw 5	DR 4	DQ 5(1)	DPw 5
Dw 6	DR 5	DQ 6(1)	DPw 6
Dw 7	DR 6	DQ 7(3)	
Dw 8	DR 7	DQ 8(3)	
Dw 9	DR 8	DQ 9(3)	
Dw 10	DR 9		
Dw 11(w7)	DR 10		

HLA D	HLA DR	HLA DQ	HLA DP
Dw 12	DR 11(5)		
Dw 13	DR 12(5)		
Dw 14	DR 13(6)		
Dw 15	DR 14(6)		
Dw 16	DR 1403		
Dw 17(w7)	DR 1404		
Dw 18(w6)	DR 15(2)		
Dw 19(w6)	DR 16(2)		
Dw 20	DR 17(3)		
Dw 21	DR 18(3)		
Dw 21	DR 51		
Dw 22	DR 52		
Dw 23	DR 53		
Dw 24			
Dw 25			
Dw 26			

В обеспечении взаимодействия иммунокомпетентных клеток антигены I и II классов выполняют различные, зачастую взаимодополняющие друг друга, функции. Функции рестрикции (ограничения) иммунного ответа на уровне распознавания чужеродного антигена и взаимодействия аутологичных макрофагов-моноцитов (представляющих антиген) с Т-хелперами принадлежат HLA-D/DR-региону, в то время как во взаимодействии между клеткой-эффектором и мишенью основная функция в ограничении иммунного ответа принадлежит антигенам I класса. Гипотеза ассоциативного распознавания, наиболее соответствующая современным представлениям о функции антигенов II класса в рестрикции иммунного ответа, основывается на том, что макрофаг, имеющий на мембране молекулы класса II, взаимодействует с антигеном. Этот комплекс распознается Т-клетками и происходит образование активных Т-хелперов, опосредующих антигенный стимул на В-лимфоциты — продуценты антител. Респондер (индивидуум, активно отвечающий на конкретный антигенный стимул) несет клон макрофагов, который имеет молекулы класса II, ассоциирующиеся с чужеродным антигеном, результатом чего является сильный иммунный ответ.

Молекулы антигенов I класса образуют комплекс с чужеродным аллоантигеном на клеточной мембране, затем происходит взаимодействие комплекса с Т-киллерами, результатом чего является гибель клетки-мишени. Частично функцию антигенов локусов А, В и С могут выполнять и антигены класса II. Таким образом, молекулы класса II в основном функционально включены в «инициацию» иммунного ответа, а молекулы класса I — в его реализацию.

ГКГС регулирует взаимодействие не только между иммунокомпетентными клетками (ИКК), но и между любыми клетками организма, тем самым обеспечивая его функциональную целостность. Считается, что эта функция принадлежит антигенам I класса, в то время, как антигены II класса распознают «свое — чужое» в организме лишь при взаимодействии ИКК.

Приведенные литературные данные свидетельствуют о том, что система антигенов ГКГС играет первостепенную роль в поддержании не только иммунологического равновесия, но и гомеостаза организма в целом.

Одним из самых перспективных направлений в изучении системы HLA на современном этапе, тесно связанным с предметом настоящих методических рекомендаций, является разработка проблемы «HLA и болезни», которая охватывает вопросы выявления ассоциативных связей между параметрами системы HLA и различными заболеваниями, а также патогенетических механизмов их реализации. Начало разработки этого направления исследований относится к 1967 г., когда появилось сообщение о связи определенных HLA-детерминант с лимфогранулематозом. К настоящему времени накоплен большой фактический материал о наличии ассоциативных связей между различными параметрами системы HLA и заболеваниями. Нестрого детерминированные связи HLA-антигенов и болезней определены для ряда эндокринных, онкологических, ревматических, аутоиммунных заболеваний и заболеваний неясной этиологии. Основной перечень достоверно связанных с ГКГС HLA-зависимых болезней приведен в **табл. 3**.

Связь антигенов системы HLA с заболеваниями

Болезнь	Антиген	Относительный риск
Анкилозирующий спондилит	B 27	> 88–90
Синдром Рейтера	B 27	36
Аддисонова болезнь	B 8	4
Гемохроматозы	B 14, A 3	9,8–10
Рассеянный склероз	A 3, B 7	2,2
Ювенильный сахарный диабет	B 8, B 15	2,2
Болезнь Грейвса	B 8	3,0
Миастения	B 8	4,0
Псориаз	B 13, B 17	5,5
Хронический гепатит	B 8	13,0
Ревматоидный артрит	Dw 4	3,0
Системная красная волчанка	B 8	3,0
Подострый тиреоидит	B 35	36

Наиболее ярким примером ассоциации между системой HLA и болезнями является выраженная связь между анкилозирующим спондилитом и антигеном HLA B27. Это антиген имеют до 96% больных, в то время как среди здоровых лиц частота его встречаемости не превышает 3–7%. Относительный риск развития болезни Бехтерева для носителей антигена B27 приближается к 100%. С учетом того, что антиген HLA B27 встречается у больных анкилозирующим спондилоартритом в 15–20 раз чаще, чем у здоровых людей, его определение используется с диагностической целью. В случае других заболеваний, даже при высоком относительном риске (больше 20%), HLA-антигены-маркеры с диагностической целью не используются, а учитываются только при выделении групп повышенного или пониженного риска развития заболевания. Таким образом, определение того или иного антигена может прогнозировать возможность развития заболевания или определенного уровня иммунного ответа.

С конца 70-х гг. формулируется ряд гипотез, объясняющих механизмы возможной ассоциации системы HLA с заболеваниями. Одна из них наиболее адекватно объясняет суть явления. Это гипотеза связи генов HLA с генами иммунного ответа (Ig-генами). Высказывается предположение, что болезнь, равно как и уровень иммунного ответа, могут быть ассоциированы не с самими генами HLA, а с генами, тесно сцепленными с ними. Проведенные исследования на мышах показали существование гена, находящегося в тесной связи с комплексом H2 (аналогом системы HLA), контролирующего силу иммунного ответа. Исследования по изучению связи HLA-генов с Ig-генами у человека проводились как путем сопоставления уровней иммунного ответа при иммунизации в зависимости от HLA-фенотипа, так и по наличию ассоциативных связей между HLA-фенотипом и иммунным ответом у больных при различных патологических состояниях. Полученные в этих исследованиях данные подтверждают основные положения разбираемой гипотезы. Установлены корреляция антигена HLA B16 с низким уровнем ответа на вакцинацию живой инактивированной вакциной гриппа А. Присутствие в фенотипе антигена HLA B8 ассоциировано с активной выработкой антител при иммунизации гриппозным вирусом. Активная выработка антител к вирусу краснухи коррелировала с антигенами HLA B15, A11 и DR4, к вирусу Эпштейна — Барра — с антигеном HLA10, на токсин столбняка — с HLA B5 и т.д. Ассоциативные связи с выраженностью иммунного ответа установлены и для отдельных гаплотипов системы HLA. В настоящее время достаточно хорошо обоснована гипотеза, согласно которой гаплотип A1B8DR3 ассоциирован с гиперреактивностью к различным антигенам, как чужеродным, так и собственным. У носителей гаплотипа A2B7DR2, наоборот, отмечается повышенная активность Т-супрессоров и сниженный ответ В-лимфоцитов на неспецифическую стимуляцию.

ТКАНЕВОЕ ТИПИРОВАНИЕ

Для определения HLA-фенотипа человека используется двухступенчатый тест комплементзависимой лимфоцитотоксичности. Постановка метода проводится с применением стандартного оборудования и реактивов: набор типизирующих сывороток для идентификации HLA-антигенов I и II классов; микрошприцы «Гамильтон», 1705RN и 1725RN; диспенсер Терасаки RB600; фиколл 400 (Швеция); верографин; микроскоп.

В Республике Беларусь панель типизирующих сывороток для идентификации HLA-антигенов I класса, не уступающая по качеству типизирующим панелям ведущих мировых фирм, выпускается Республиканской станцией переливания крови.

HLA-антигены II класса в Республике выявляются с помощью коммерческих тест-панелей вышеперечисленных фирм.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

1. Сепарация суммарной популяции лимфоцитов

Выделение лимфоцитов проводится из свежезаготовленной гепаринизированной (20–25 ед./мл крови) или дефибринированной венозной крови методом флотации. Для этого 5 мл стабилизированной венозной крови смешиваем с 5 мл забуференного физраствора (ЗФР) или раствора Хэнкса без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и наслаиваем на 5 мл фиколл-верографинового градиента плотностью 1,076–1,078 г/мл. Центрифугируем в течение 20 мин при 450–500 g. Образовавшееся в интерфазе беловатое кольцо мононуклеаров собираем пастеровской пипеткой и дважды отмываем раствором ЗФР.

2. Получение В-лимфоцитов для HLA-DR-типирования

2.1. Выделение популяции В-лимфоцитов на нейлоновом волокне

1. Около 150 мг нейлоновой ваты набиваем в 2 мл одноразовый шприц. Шприц промываем 10 мл среды (McCoу Medium 5A с добавлением 5% инактивированной телячьей сыворотки), подогретой до 37° С. При этом следим, чтобы отсутствовали пузырьки воздуха.

2. Шприц сверху и снизу закрываем парафильмом и инкубируем 30 мин при 37° С.

3. Около 10^7 суммарной популяции лимфоцитов, ресуспендированных в 2 мл теплой (37° С) среды, наносим на нейлоновую вату. Шприц снова закрываем парафильмом и инкубируем 30 мин. при 37° С.

4. Т-лимфоциты отделяем, промывая шприц 15–20 мл подогретого до 37° С раствора Хэнкса, и собираем в пробирку.

5. В-лимфоциты вымываем 20 мл подогретого до 37° С раствора Хэнкса и собираем в центрифужные пробирки. При этом вату несколько раз сильно сжимаем поршнем шприца.

6. Т- и В-лимфоциты дважды отмываем раствором Хэнкса по 5 мин. при 1500 об./мин.

7. Приготавливаем рабочую взвесь Т- и В-лимфоцитов 2000–3000 кл/мл.

2.2. Выделение В-лимфоцитов с использованием иммуномагнитных бус (Lymphobeads HLA Klasse II (CD19))

Материалы:

– Lymphobeads HLA Klasse II (CD19) (Biotest, Art.-Nr 824123);
– магнит (Biotest, Art.-Nr 824130, или другой аналогичный магнит);
– растворы: ЗФР (рН 7,2) + 0.6% цитрат натрия (0,6 г цитрата натрия на 100 мл ЗФР);
ЗФР; раствор для ресуспендирования изолированных В-лимфоцитов (McCoy 5A, RPMI 1640, PBS + 5% инактивированная эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС));

– изоляция CD19-позитивных В-лимфоцитов.

1. Выделенные общепринятым способом из 15–20 мл периферической крови лимфоциты ресуспендируем в 8 мл холодного (2–8° С) ЗФР + 0,6% цитрата натрия).

2. Осторожно и тщательно ресуспендируем (во флаконе) иммуномагнитные бусы.

3. 100 мл бус добавляем к клеточной взвеси.

4. Инкубируем 3 мин при комнатной температуре (22° С). Периодически осторожно перемешиваем.

5. Пробирку помещаем в магнит и оставляем на 90 с.

6. Фиксируя пробирку в магните, переворачиваем ее и удаляем содержимое. В-лимфоциты остаются на внутренней стенке пробирки в виде «дорожки».

7. Изолированные В-лимфоциты отмываем:

– пробирку вынимаем из магнита;

– добавляем 5 мл холодного ЗФР + 0,6% цитрата натрия);

– помещаем пробирку в магнит на 1 мин;

– удаляем отмывающий раствор переворачивая пробирку с магнитом;

– повторяем процедуру.

8. Третий раз отмываем холодным (2–8° С) ЗФР.

9. Концентрацию выделенных В-лимфоцитов доводим до 1500–2000 кл/мл раствором для ресуспендирования изолированных В-лимфоцитов (McCoу 5А, RPMI 1640, PBS + 5% инактивированная ЭТС).

3. Постановка реакции

3.1. Идентификация HLA-антигенов I класса (локусы А, В, и С)

1. Микрокамеры, в лунках которых под вазелиновым маслом в объеме 1 мл раскапаны и заморожены стандартные анти-HLA сыворотки к антигенам I класса, оттаиваем в течение 15 мин. при комнатной температуре.

2. Доводим концентрацию лимфоцитов (суммарную или Т-лимфоцитов) до 2–2,5 × 10⁶ клеток/мл.

3. В каждую лунку микрокамеры с помощью шприца Гамильтона 1705 RN вносим по 1 мл суспензии лимфоцитов.

4. Инкубируем в термостате 45 мин при 22° С.

5. В каждую лунку с помощью шприца Гамильтона 1725 RN вносим по 5 мл кроличьего комплемента (лиофилизированный комплемент растворяем согласно инструкции фирмы изготовителя; замороженный комплемент размораживаем при комнатной температуре).

6. Инкубируем 1 ч при 22° С.

7. По завершении инкубации суспензия клеток обрабатывается 0,23% раствором трипанового синего. В лунку вносится по 3 мл краски. Экспозиция 15 мин при комнатной температуре.

8. После стряхивания избытка краски, с использованием инвертированного микроскопа (увеличение 100–150), производим учет реакции. Мертвые клетки в лунках, в которых произошла реакция антиген-антитело, окрашиваются в синий цвет.

При наличии люминисцентного микроскопа учет реакции лучше проводить после окраски клеток флуоресцентными красителями: растворами акридинового оранжевого (АО) и этидиума бромид (ЭБ). В этом случае первые четыре пункта постановки реакции не отличаются от вышеописанной. Далее:

5. Смешиваем 1 мл свежеприготовленного кроличьего комплемента с 0,04 мл основного раствора АО/ЭБ. Добавляем по 5 мл этой смеси в каждую лунку.

6. Инкубируем в темноте 60 мин при 22° С.

7. Для остановки реакции в лунку вносится по 5 мл 1% раствора туши.

8. Результаты реакции можно учитывать через 5 мин после ее прекращения или в течение 24 ч при хранении микрокамер в холодильнике (4–8° С). Мертвые клетки флуоресцентными красителями окрашиваются в красный цвет, живые — в зеленый.

3.2. Идентификация HLA-антигенов II класса (локусы DR и DQ)

Определение HLA-антигенов II класса осуществляется в модифицированном лимфоцитотоксическом тесте, отличающемся от вышеописанного использованием популяции лимфоцитов, обогащенной В-клетками и удлинением времени инкубации — антисыворотка + В-лимфоциты — до 60 мин и после добавления комплемента — 120 мин. При этом в случае использования В-лимфоцитов, выделенных на нейлоновой вате, допускается любой из вышеописанных способов окраски (трипановый синий, флуоресцентные красители). Если же для получения популяции В-лимфоцитов использовались иммуномагнитные бусы, необходимо применять исключительно флуоресцентные красители (АО и ЭБ).

4. Учет результатов реакций в микролимфоцитотоксическом тесте при любом способе окраски

100%–76% «мертвых» клеток — реакция резко положительная — + + + +;

75%–51% «мертвых» клеток — реакция положительная — + + +;

50%–25% «мертвых» клеток — реакция слабо положительная — + +;

менее 25% «мертвых» клеток — реакция отрицательная.

HLA-фенотип выводится на основании положительных реакций (4, 3 и 2 +) с анти-HLA сыворотками и соответствует HLA-специфичностям реагентов, с которыми произошла реакция. Например, 25–100% «мертвых» клеток зарегистрировано в лунках, в которых находятся анти-HLA сыворотки к антигенам HLA A1, HLA A2, HLA B7, HLA B35, HLA CW1, HLA CW6, HLA DR1, HLA DQ3. В этом случае HLA-фенотип обследуемого будет: HLA A1,2 B7,35 CW1,6 DR1 DQ3. Необходимо помнить, что в каждом локусе может присутствовать либо 1, либо 2 антигена. При идентификации в локусе двух антигенов можно говорить о полном выявлении экспрессированных в организме обследуемого HLA-антигенов данного локуса (в приведенном примере локусы A, B и C). Идентификация только одного антигена указывает на его гомозиготность в организме (в приведенном примере локусы DR, DQ). Однако, в этих случаях надо иметь в виду возможную вероятность нераспознавания второго антигена, т.к. типизирующие панели всех производителей содержат антисыворотки не ко всем известным в настоящее время HLA-специфичностям.

5. Приготовление реактивов, используемых в микролимфоцитотоксическом тесте

1. Раствор акридинового оранжевого и этидиум бромид. Основной раствор: 15 мг АО растворяем в 1 мл 96% этанола; 50 мг ЭБ растворяем в 49 мл ЗФР. Смешиваем оба раствора добавлением АО к раствору ЭБ. Смесь инкубируется в водяной бане 30 мин при 55° С. Храниться раствор при +4° С или –20° С.

2. Раствор ЭДТА 5%:

- 5 г ЭДТА растворяем в 90 мл ЗФР;
- доводим до конечного объема 100 мл (ЗФР);
- доводим рН раствора с помощью NaOH до 7,2.

3. Рабочий раствор туши 1%:

- 90 мл 5% раствора ЭДТА на ЗФР смешиваем с 10 мл инактивированной сыворотки АВ (IV);
- добавляем к 98 мл приготовленного раствора 1 мл 5% раствора азиды натрия и 1 мл туши черной (ТУ 6–15–458–86).

4. Раствор азиды натрия 5%: 5 г азиды натрия растворяем в 100 мл ЗФР.

5. ЗФР: 0,18g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1,98g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; 8,10g NaCl; до 1000 мл H_2O .

6. Раствор трипанового синего 0,23%:

- 230 мг трипанового синего растворяем в 100 мл 0,2% раствора хлористого натрия;
- смешиваем 4 объема раствора краски с 1 объемом гипертонического раствора Хэнкса (2,55 г хлористого натрия, растворенного в 100 мл стандартного Хэнкса).

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УРОВНЯ ИММУННОГО ОТВЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ СИСТЕМЫ HLA

Маркеры системы антигенов ГКГС, прогнозирующие вероятность высокого или низкого уровня иммунного ответа организма на иммунизацию стафилококковым анатоксином, идентифицировались по результатам обследования 620 кадровых доноров крови Республиканской станции переливания крови. Все доноры иммунизировались стафилококковым анатоксином по методике, используемой всеми учреждениями службы крови, согласно «Инструкции по иммунизации доноров стафилококковым анатоксином и проведению плазмафереза для получения стафилококковой плазмы» (Москва, 1977). В сыворотке крови проиммунизированных доноров определялся титр α -антистафилолизин в реакции нейтрализации гемолитического действия стафилококкового α -токсина на эритроциты кролика. При анализе результатов учитывался максимальный титр антител, определяемый у каждого донора. У всех доноров определялся фенотип по антигенам ГКГС I класса (локусы A, B и C). С использованием общепринятых методов статистической обработки данных определялась корреляционная связь отдельных параметров системы HLA с выраженностью иммунного ответа. При лабораторном обследовании доноров крови — жителей Республики Беларусь — выявлен ряд параметров системы антигенов ГКГС ассоциированных с высоким уровнем иммунного ответа на иммунизацию стафилококковым анатоксином. К ним относятся HLA-антигены: HLA A1, HLA B35, HLA CW4; HLA-фенотипы: HLA A1, 2; HLA A 1, 11; HLA A1, 26; HLA AX, 35; и HLA CW 4, 7; HLA-гаплотипы: HLA A1 B8; HLA A1, B35; HLA A2, B18 HLA A2 B35 и HLA A11 B35. Для большинства проиммунизированных доноров их присутствие в организме коррелировано с титром α -антистафилолизин более 5 ME.

Напротив, экспрессия в организме HLA-антигенов: HLA A3; HLA A24 и HLA B7, равно как и HLA-фенотипов: HLA AX, 24; HLA A11, 26; HLA A11, 32; HLA B7, 27; HLA B27, 44 и HLA-гаплотипов: HLA A2 B7; HLA A3 B7; HLA A24 BX; HLA A24 B13; HLA A24 B27; HLA A24 B55 свидетельствовала о вероятности недостаточной эффективности иммунизации стафилококковым анатоксином и, следовательно, может явиться основанием для отклонения донора, у которого определяются вышеперечисленные параметры системы HLA, от иммунизации.

Полученные данные статистически достоверны, однако не носят облигатного характера. В ряде случаев, при иммунизации доноров, в фенотипе которых идентифицировались маркеры системы HLA, прогнозирующие высокий уровень иммунного ответа, титры α -антистафилолизиннов не превышали 3 ME. И наоборот, экспрессия в организме маркеров низкого уровня иммунного ответа сочеталась с достаточно высоким (выше 5 ME) титром антител, синтезированных в организме в процессе иммунизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование групп иммунных доноров в настоящее время предусматривает наряду с обеспечением безопасности здоровья иммунизируемых, прогнозирование потенциальной иммунологической реактивности индивида к конкретному антигену.

С целью выявления доноров с прогнозируемым высоким уровнем иммунного ответа на стафилококковый анатоксин предложены отдельные параметры системы антигенов ГКГС (антигены, фенотипы, гаплотипы). Использование рекомендуемых маркеров обеспечивает достаточную для практического использования точность прогноза. При этом среди вакцинированных повышается процент лиц с высоким уровнем иммунного ответа, что способствует увеличению объемов заготовки плазмы специфической направленности.

Отбор доноров с учетом их индивидуальной иммунологической реактивности создает условия для рационального распределения ограниченных донорских ресурсов, так как донор, слабо отвечающий на один антиген, может быть активным антителопродуктором при другом виде иммунизации. Отказ от иммунизации ареактивных индивидов позволяет избежать ненужных материальных затрат и снижает неоправданный риск сенсбилизации доноров, связанный с намеренной вакцинацией.

В основу отбора доноров по прогнозируемому уровню иммунного ответа на стафилококковый анатоксин положена процедура HLA-типирования. В работе подробно изложены не только современные принципы идентификации HLA-антигенов, но и основные положения, отражающие их роль в поддержании постоянства внутренней среды организма. Одновременно представлены данные об ассоциативных связях отдельных параметров системы HLA с рядом заболеваний, что наглядно иллюстрирует важность изучения различных аспектов «HLA и болезни».

Следует подчеркнуть, что воспроизведение метода HLA-типирования вследствие 100%-й обеспеченности его реактивами отечественного производства, выпускаемыми Республиканской станцией переливания крови, возможно практически во всех учреждениях, занимающихся направленной иммунизацией доноров или проблемой «HLA и болезни», а также подбором пар для трансплантации органов и тканей.