

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ И КАЧЕСТВЕННОМУ АНАЛИЗУ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ИНВАЗИОННОЙ ЭТИОЛОГИИ

О.И. МАМЫКОВА

кандидат ветеринарных наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии
им. К.И. Скрябина, 177218, Москва, Б. Черемушкинская, 28,
тел. (499)124-56-55, e-mail: vigis@ncport.ru*

(одобрены секцией «Инвазионные болезни животных» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии 19 мая 2011 г., протокол № 2)

Сложность и непостоянство антигенного состава гельминтов, длительное антигенное воздействие создают условия для формирования антител различной специфичности. Избыток антител, недостаточность функциональной активности Т-клеточного звена иммунитета, индуцированная супрессорными факторами, выделяемыми гельминтами в процессе жизнедеятельности, создают условия для образования и персистенции комплексов антиген-антитело в сосудистом русле. Установлена прямая зависимость между уровнем циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови и интенсивностью инвазии (Мамыкова, Африкян, 1990). Кроме того, при смещении равновесия в сторону избытка антигенов размер иммунных комплексов уменьшается, возрастает не только длительность циркуляции иммунных комплексов, но и риск формирования иммунных комплексов с патогенным потенциалом, способных откладываться в органах-мишенях, вызывая патоморфологические изменения воспалительного и дегенеративного характера. Степень патоморфологических изменений при трихинеллезе крыс коррелирует с уровнем комплексов антиген-антитело, что позволяет признать патогенетическое значение иммунных комплексов в индукции почечных поражений, характерных для пролиферативного гломерулонефрита (Тодорова, 1988). Повреждение тканей, индуцированное иммунными комплексами, может развиваться без определенного количества циркулирующих в крови комплексов. Присутствие в циркуляторном русле высоких концентраций иммунных комплексов не является обязательным условием для формирования комплексов с патогенным потенциалом и, следовательно, индукции органных повреждений (Петров, 1982; Мамыкова, 1991). Поэтому наряду с количественным определением иммунных комплексов целесообразно осуществлять их качественный анализ. Определенное значение имеет оценка размеров иммунных комплексов, отражающих их патогенные свойства. Крупные иммунные комплексы активно захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы и удаляются из циркуляции по сравнению с более мелкими комплексами, которые длительно циркулируют и имеют тенденцию откладываться в различных органах (Сура и др., 1980).

Иммунные комплексы играют важную роль в патогенезе в связи со способностью подавлять иммунологические реакции. Персистенция ЦИК в сосудистом русле оказывает ингибирующее действие на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Взаимодействие специфических IgG-антител с иммуноглобулиновыми Fc-рецепторами лимфоцитов приводит к функциональному выключению клетки и подавлению пролиферативной или иной активности (Ryan, Henkart, 1976; Мамыкова, 1992).

Общие положения

Для выявления уровня ЦИК, как одного из факторов патогенеза болезней инвазионной этиологии, группы животных формируют с учетом получения статистически достоверных результатов. Контрольные и опытные животные должны быть одного пола и возраста, условия содержания и питания соответствовать установленным нормам.

Кровь у сельскохозяйственных животных берут путем венепункции яремной вены, лабораторных животных с экспериментальной инвазией декапитируют (для исследований используют пул образцов сывороток). Кровь отстаивают в течение 30 мин при комнатной температуре. Полученную сыворотку крови центрифугируют при 400 обор. в течение 10-15 мин. Допускается хранение сыворотки крови при низких минусовых температурах. Исследование сыворотки крови с признаками гемолиза может дать сомнительный результат.

В методических положениях для количественного определения ЦИК в сыворотке крови приводится метод Гриневича и Алферова (1981), для качественного анализа и оценки их патогенного потенциала - метод Стручкова с соавт. (1985).

1. Количественное определение циркулирующих иммунных комплексов

Метод основан на селективной преципитации комплексов антиген-антитело 3,75%-ным раствором полиэтиленгликоля М-6000 (ПЭГ) с последующим фотометрическим определением плотности преципитата при длине волны (λ) 450 нм.

Реагенты и оборудование:

1. 0,1 М боратный буфер (рН = 8,4) – 3,410 г борной кислоты и 4, 275 г тетрабората натрия (бура) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л (ББ).

2. 3,75%-ный раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) – 10 г полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 растворяют в 240 мл боратного буфера.

3. Спектрофотометр.

Техника реакции. В пробирки вносят по 0,3 мл исследуемой сыворотки и добавляют 0,6 мл 0,1 М боратного буфера, тщательно перемешивают и переносят по 0,3 мл в 2 пробирки. В одну из них приливают 2,7 мл боратного буфера (контроль), в другую – 2,7 мл 3,75%-ного раствора полиэтиленгликоля М-6000 (опыт). Содержимое пробирок тщательно перемешивают и выдерживают 60 мин при комнатной температуре. Затем определяют оптическую плотность преципитата на спектрофотометре при длине волны 450 нм. По окончании серии измерений экстинкции (Е) исследуемых образцов проб вычисляют разность показателей оптической плотности, и результат умножают на 1000. Получают количественные значения ЦИК в 100 мл сыворотки крови. Ответ выражают в единицах оптической плотности.

Содержание иммунных комплексов в сыворотке крови агельминтных овец, при гельминтоо- и гельминтоларвоскопическом обследовании которых получены отрицательные результаты, составляет $39,66 \pm 7,87$ ед. опт. пл.

2. Качественный анализ циркулирующих иммунных комплексов

Метод заключается в одновременной оценке концентрации и размера иммунных комплексов, и основан на способности полиэтиленгликоля разной концентрации преципитировать иммунные комплексы, имеющие различную молекулярную массу (размер). Чем больше размер иммунных комплексов, тем меньшая концентрация (ПЭГ) требуется для их преципитации. Коэффициент К, характеризующий размер иммунных комплексов, и, следовательно, их патогенный потенциал, рассчитывают как отношение концентрации иммунных комплексов, осаждаемых 4%-ным ПЭГ (C_4) и концентрации иммунных комплексов, осаждаемых 3%-ным ПЭГ (C_3), то есть $K = C_4 : C_3$.

Реагенты и оборудование:

1. 0,1 М боратный буфер (рН = 8,4) (ББ).

2. 10%-ный раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000, приготовленный на 0,1 М боратном буфере.
3. 0,1 М раствор NaOH.
4. Центрифуга с рефрижератором К 70D.
5. Спектрофотометр.

Техника реакции. Исследуемую сыворотку вносят в 2 пробирки по 0,2 мл. В первую пробирку добавляют 3,3 мл 0,1 М ББ и 1,5 мл 10%-ного раствора ПЭГ, во вторую – 2,8 мл ББ и 2 мл 10%-ного раствора ПЭГ. Таким образом, конечная концентрация ПЭГ составит 3 и 4 % соответственно. Содержимое обеих пробирок тщательно перемешивают и инкубируют 18 ч при t 4 °С. По окончании времени инкубации пробирки центрифугируют при 2000 обор. (3000 об./мин). Супернатант удаляют и к осадку, содержащему иммунные комплексы, добавляют по 0,2 мл 0,1 М раствора NaOH. Далее на спектрофотометре определяют концентрацию белка в иммунных комплексах – C_3 и C_4 соответственно и рассчитывают коэффициент К как отношение концентрации C_4 и C_3 .

Значение коэффициента К в пределах 1,1–1,5 соответствует высокой концентрации иммунных комплексов среднего размера. Значение коэффициента $K > 1,5$ указывает на концентрацию иммунных комплексов малого размера, обладающих высоким патогенным потенциалом.