

HOW THE IMMUNOGRAM MIGHT BE DECIPHERED

I. S. FREIDLIN

This paper describes the immunological tests used for the diagnosing and management of patients with disorders of the immune system. Some tests to define and measure cell types and immunoglobulins are described in details. Immunological tests may serve as good diagnostic or prognostic markers.

В статье раскрыты возможности лабораторных диагностических иммунологических исследований, предназначенных для оценки состояния иммунной системы организма. Рассказано о методах определения отдельных иммунологических показателей. Обсуждается их информативность. Показано значение иммунологических исследований для диагностики и лечения заболеваний.

КАК ЧИТАТЬ ИММУНОГРАММУ

И. С. ФРЕЙДЛИН

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова

Способен ли организм человека защититься от постоянно атакующих его бактерий и вирусов? Достаточно ли в организме клеток и молекул, призванных поддерживать постоянство его внутренней среды? Каковы соотношения таких клеток и молекул? На эти и другие вопросы, волнующие врача и его пациентов, можно найти ответы расшифровав результаты специальных исследований, объединенные понятием “иммунограмма” [2].

ЧТО БЕРУТ НА ИССЛЕДОВАНИЕ

На исследование берут кровь, уколоч специальной иглой кончик пальца на руке или введя тонкую иглу в просвет вены в локтевом сгибе. Кровь собирают в две пробирки. При попадании крови в обычную чистую, сухую стеклянную пробирку она быстро свертывается. Именно благодаря свертыванию (коагуляции) крови, вытекающей из пораненного сосуда, кровотечение, как правило, быстро прекращается. В этой пробирке взятая кровь разделяется на сгусток с попавшими в него форменными элементами (клетками) и прозрачную сыворотку крови, содержащую большинство интересующих нас молекул. В другую пробирку предварительно добавляют специальное вещество — антикоагулянт, которое препятствует свертыванию крови и обеспечивает сохранение интересующих нас клеток крови в виде суспензии в плазме.

Защитные молекулы и клетки могут находиться не только в крови. Если нас интересует состояние местной защиты слизистых оболочек, на исследование берут слизь из носоглотки, или слюну, или слезную жидкость. Если особое внимание привлекает нервная система больного, на исследование берут спинномозговую жидкость (ликвор), но для этого приходится делать пункцию спинного мозга.

КАКИЕ КЛЕТКИ И КАК ИССЛЕДУЮТ

Внимание иммунологов привлекают белые клетки крови — лейкоциты, к которым относятся гранулоциты, моноциты и лимфоциты. В кровь они поступают из костного мозга по мере созревания из клеток-предшественников. Каждая клетка прорабатывает свой индивидуальный жизненный цикл. Гранулоциты проводят жизнь в кровяном русле, покидая его только в случае экстренной необходимости при мобилизации в очаг инфекции или воспаления. Моноциты закономерно покидают кровяное русло, превращаясь в долгоживущие тканевые макрофаги.

Лимфоциты же в течение всей своей жизни находятся в состоянии перманентной рециркуляции, то есть постоянно меняют место своего пребывания: из крови переходят в лимфу, оседают на какое-то время в селезенке или лимфоузлах и снова устремляются в кровь [1]. Все это позволяет оценивать лейкоциты крови в качестве полномочных представителей клеток иммунной системы организма.

Прежде всего нас интересуют количество лейкоцитов в крови и соотношения отдельных типов клеток. Общее количество лейкоцитов подсчитывают после лизирования эритроцитов (красных клеток крови) в специальной счетной камере под микроскопом (рис. 1). Камера представляет собой капил-

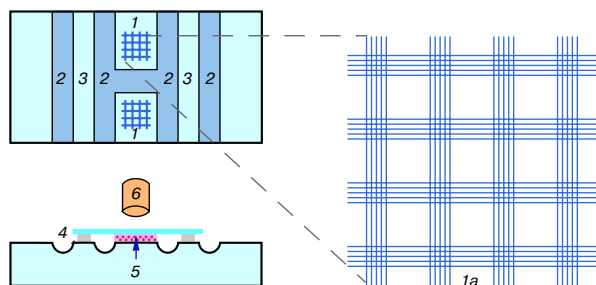


Рис. 1. Счетная камера Горяева для подсчета лейкоцитов крови – это толстое прямоугольное прозрачное стекло с двумя сетками (1), выгравированными на его поверхности. Две канавки (2) сетки отделены от пластинок (3), к которым притирается шлифованное покровное стекло (4). Сетка камеры (1а) образована системой взаимно перпендикулярных линий. Капля исследуемой крови заполняет капиллярное пространство над сеткой (5). Находят сетку под микроскопом (6) и подсчитывают количество лейкоцитов на площади нескольких квадратов сетки

лярную щель между предметным стеклом с нанесенной на него счетной сеткой и плотно притертым покровным стеклом. В такую камеру попадает минимальный объем исследуемой крови, в котором лейкоциты находятся в одном слое. Это дает возможность подсчитать количество клеток, оказавшихся на площади, ограниченной квадратами счетной сетки. Зная объем счетной камеры, мы пересчитываем количество лейкоцитов на 1 мкл крови. Чтобы распознать разные типы лейкоцитов, из крови готовят мазок на предметном стекле и окрашивают анилиновыми красителями, которые подобраны таким образом, чтобы прокрасились ядра клеток и цитоплазма с характерной для них зернистостью (рис. 2).

Лейкоциты различаются по форме ядер. Моноциты и лимфоциты относятся к мононуклеарам, так как имеют одно крупное ядро (нуклеус), занимающее большую часть площади клетки (рис. 2, 4, 5).

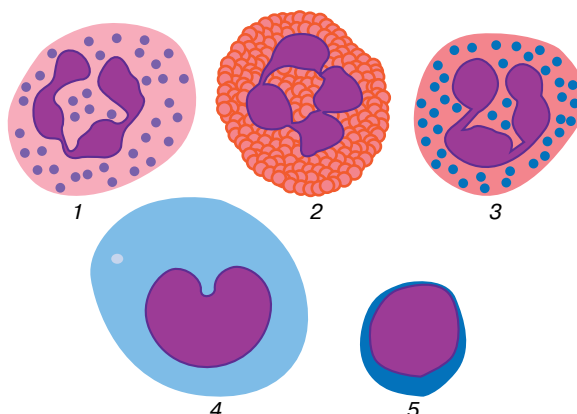


Рис. 2. Особенности строения разных лейкоцитов крови выявляются при их окраске азур-эозином: 1 – нейтрофил, 2 – эозинофил, 3 – базофил, 4 – моноцит, 5 – лимфоцит

Другие популяции лейкоцитов объединены под общим названием “полиморфноядерные”, так как их ядра в отличие от ядер мононуклеаров состоят из взаимосвязанных сегментов разной формы (рис. 2, 1–3). Эти же клетки называют еще гранулоцитами в связи с обилием в их цитоплазме гранул, которые при окраске приобретают разный цвет у различных типов гранулоцитов: красный – у эозинофилов (рис. 2, 2), синий – у базофилов (рис. 2, 3) и фиолетовый – у нейтрофилов (рис. 2, 1). Моноциты отличаются от лимфоцитов более крупными размерами, бобовидной формой ядра и серо-голубым цветом цитоплазмы (рис. 2, 4). Для лимфоцитов наиболее характерно круглое плотное ядро, окруженное узким ободком ярко-синей цитоплазмы (рис. 2, 5). Таким образом, при просмотре 100 лейкоцитов удастся идентифицировать (узнать) каждый из них и определить процентное содержание отдельных типов лейкоцитов. Результаты исследования записывают в виде так называемой лейкоцитарной формулы (табл. 1).

Наибольший интерес, с точки зрения иммунологов, представляют лимфоциты. Под микроскопом все лимфоциты выглядят одинаково, но по своим функциям они делятся на две популяции: Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Т-лимфоциты получили свое название от органа “тимус”, где происходит их созревание. Созревание В-лимфоцитов у человека происходит непосредственно в костном мозге. Т-лимфоциты участвуют в регуляции иммунного ответа, обеспечивают защиту в основном от вирусов, грибов, некоторых бактерий. В-лимфоциты после встречи с чужеродным антигеном превращаются в антителопродуцирующие плазматические клетки и обеспечивают защиту от бактерий и их токсинов [3]. Поскольку функции Т- и В-лимфоцитов различны, необходим раздельный учет количества клеток каждой из этих популяций в крови. Такая

Таблица 1. Лейкоцитарная формула

Количество клеток	Всего лейкоцитов	Число гранулоцитов			Число мононуклеаров	
		нейтрофилов	базофилов	эозинофилов	лимфоцитов	моноцитов
В 1 мкл крови	4000–10 000	3245–6000	1–75	100–250	1200–2800	200–600
В процентах к общему количеству лейкоцитов	—	57–73	0,5–1	1–4	25–30	6–8

возможность существует благодаря различному строению их поверхностных мембран, в составе которых удается обнаружить определенные белки, характерные для отдельной популяции. Так, например, человеческие Т-лимфоциты несут на мембране рецептор, связывающий эритроциты крови барана. Если лейкоциты крови человека соединить с эритроцитами из крови барана, образуются так называемые розетки, хорошо различимые под микроскопом. В центре каждой розетки находится Т-лимфоцит, окруженный прилипшими к нему эритроцитами барана. В-лимфоциты образуют аналогичные розетки, но только с эритроцитами из мышиной крови. Остается подсчитать процентное содержание розеткообразующих лимфоцитов в этих двух вариантах, чтобы узнать процентное содержание Т- и В-лимфоцитов.

Существует более современный и надежный метод дифференцировки разных популяций и субпопуляций лейкоцитов крови. Для этого используют так называемые моноклональные антитела, то есть антитела, заранее полученные против отдельных белков (в рассматриваемом случае компонентов клеточных мембран лейкоцитов) и способные соединяться только с этими белками. Такие антитела снабжаются меткой, например люминесцирующим красителем. Если каплю крови соединить с мечеными антителами против Т-клеточных белков, способность светиться приобретают только Т-лимфоциты. А для подсчета количества светящихся клеток в определенном объеме крови создан специальный прибор – флуоресцентный анализатор клеток, или проточный цитофлуориметр. Поток клеток проходит через тончайший капилляр, на который падает возбуждающий люминесценцию луч света. Каждая светящаяся клетка регистрируется специальным детектором в виде импульса испускаемого ею свечения (рис. 3). Прибор автоматически обрабатывает информацию и выдает результаты в виде гистограммы – графика распределения клеток с разной интенсивностью свечения. Используя широкий набор моноклональных антител, можно определить количественное содержание в крови не только Т- и В-лимфоцитов, но и субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), – каждая из которых несет на клеточной мембране свой характерный “маркер” CD4 или CD8, выявляемый специфическими моноклональными антителами. Естественные киллеры – разно-

видность лимфоцитов, не относящихся ни к Т-, ни к В-лимфоцитам, тоже несут на поверхностной мембране свой маркер, так что их количество также поддается подсчету [3].

Описанные методы позволяют получить достаточно полные количественные характеристики состава лейкоцитов крови, но этого часто оказывается недостаточно. Защита организма зависит не только от количества тех или иных лейкоцитов, но и от их функциональной полноценности, способности адекватно ответить на встречу с микроорганизмами и их антигенами. Для проверки функциональной активности лейкоцитов крови в лаборатории используют специальные тесты. Например, гранулоциты и моноциты крови испытывают на способность захватывать и переваривать предложенные им так называемые тест-объекты: стандартные микрочастицы или убитые бактерии. Таким образом оценивают их фагоцитарную активность.

Что касается лимфоцитов, то для них наиболее характерным ответом на встречу с антигеном является пролиферация, связанная с активным синтезом ДНК. Для оценки их пролиферативного ответа

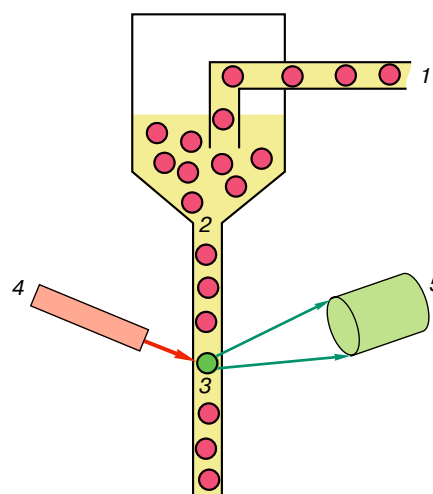


Рис. 3. Схема устройства проточного цитофлуориметра: 1 – резервуар для исследуемой крови; 2 – капилляр, в котором формируется струя клеток; 3 – лейкоцит в струе клеток; 4 – возбуждающий люминесценцию лазерный луч; 5 – детектор флуоресценции

к мононуклеарам крови добавляют какой-либо стандартный митоген (индуктор митозов, пролиферации клеток), например бактериальный липополисахарид. Нормальные лимфоциты должны ответить на это усилением синтеза ДНК, которое учитывается по приросту включения клетками меченого предшественника ДНК-³H-тимидина. Количество импульсов, регистрируемое автоматическим счетчиком, прямо пропорционально активности пролиферативного ответа лимфоцитов на стандартный митоген.

Очень важной функцией моноцитов и лимфоцитов крови являются продукция и секреция цитокинов [4]. Поэтому оценка способности мононуклеаров крови продуцировать цитокины (интерлейкины, интерфероны) также может быть использована для проверки их функциональной полноценности.

КАКИЕ МОЛЕКУЛЫ И КАК ИССЛЕДУЮТ

Важнейшими продуктами иммунного ответа являются антитела – иммуноглобулины, которые секретируются плазматическими клетками лимфоузлов и селезенки и поступают в кровь. Количество иммуноглобулинов разных классов (изотипов) в сыворотке крови и других биологических жидкостях определяют в качестве одного из показателей функциональной полноценности В-лимфоцитов и всей системы регуляции гуморального иммунного ответа – синтеза антител [3].

Инструментами для определения количества иммуноглобулинов отдельных классов (IgA, IgG, IgM, IgE) являются специфические для каждого из этих классов антииммуноглобулиновые антитела. В настоящее время предпочтение отдается моноклональным антителам против отдельных антигенных эпитопов (совокупности элементов полипептидных цепей, узнаваемые антителом), характерных для отдельных классов иммуноглобулинов. Достаточно чувствительным и специфичным методом количественного определения иммуноглобулинов является метод микропреципитации с нефелометрической или спектрофотометрической оценкой агрегации белков при взаимодействии иммуноглобулин – антииммуноглобулин. Наиболее чувствительный метод – иммуноферментный анализ, при котором моноклональные антитела против иммуноглобулинов определенного класса сорбируются в лунках специальных планшетов из пластика, прочно адсорбирующего белки (рис. 4, 1). Если поверхность пластика насыщена белками, то дальнейшая адсорбция становится невозможной. После промывания лунок для удаления неадсорбированных антител (рис. 4, 2) в лунки вносят исследуемые сыворотки, инкубируют (рис. 4, 3), затем промывают лунки от несвязавшихся белков сыворотки (рис. 4, 4) и вносят антисыворотку против человеческого иммуноглобулина, конъюгированную с ферментом пероксидазой (рис. 4, 5). Такая антисыворотка свя-

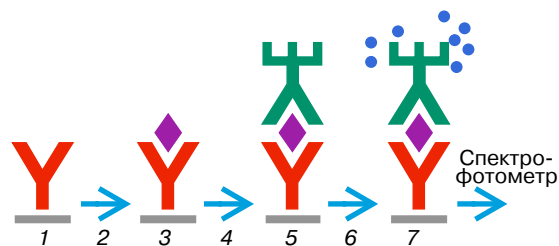


Рис. 4. Схема иммуноферментного анализа для количественного определения концентрации иммуноглобулинов отдельных классов в сыворотке крови: 1 – моноклональное антитело против иммуноглобулина определенного класса фиксируется в лунке планшета; 2 – лунку промывают; 3 – в лунку вносят исследуемую сыворотку крови, присутствующий в ней иммуноглобулин (антиген) связывается со своим антителом; 4 – лунку промывают; 5 – в лунку вносят конъюгат антиглобулиновой сыворотки с ферментом; 6 – лунку промывают; 7 – в лунку вносят субстраты данного фермента, один из которых в результате реакции дает окрашенное производное. Развивается окраска, оптическую плотность оценивают с помощью спектрофотометра

жется только в тех лунках, в которых со “своими” моноклональными антителами уже связались человеческие иммуноглобулины соответствующего класса. После промывания (рис. 4, б) и добавления в лунки субстратов: перекиси водорода и соединения, которое в результате окисления дает окрашенное производное, наблюдается развитие окраски в тех лунках, в которых произошло связывание меченой ферментом сыворотки (рис. 4, 7). С помощью спектрофотометра во всех лунках оценивают оптическую плотность, которая прямо пропорциональна концентрации в сыворотке иммуноглобулинов искомого класса.

Имуноферментный анализ позволяет определить в любой биологической жидкости количество молекул, против которых приготовлены заранее моноклональные антитела и “проявляющая” антисыворотка, несущая в качестве метки фермент. Кроме иммуноглобулинов разных классов таким методом определяют и количество цитокинов в сыворотке крови или надосадочной жидкости культур мононуклеаров крови.

Сведенные вместе результаты всех описанных исследований, характеризующие количество лейкоцитов разных популяций в крови и других биологических жидкостях, их функциональную активность, количество иммуноглобулинов разных классов и отдельных цитокинов в сыворотке крови и других биологических жидкостях, и составляют иммунограмму (табл. 2).

Таблица 2. Иммунограмма

Показатель		Интервал колебаний показателей в норме	
Т-лимфоциты	В процентах к общему количеству лимфоцитов	40–80	
Соотношение субпопуляций CD4 ⁺ /CD8 ⁺		1,5–2,0	
В-лимфоциты	В процентах к числу гранулоцитов	5–30	
Естественные киллеры		5–15	
Фагоцитирующие гранулоциты		20–70	
Иммуноглобулин А		Количество граммов в 1 л крови	0,3–4,0
Иммуноглобулин М			0,3–3,0
Иммуноглобулин G			6,0–20,0
Иммуноглобулин E			0

КАК РАСШИФРОВАТЬ ИММУНОГРАММУ

Непосвященному иммунограмма представляет шифровкой: длинный перечень непонятных сокращений, которым соответствуют какие-то цифры. При расшифровке конкретной иммунограммы прежде всего каждый показатель сравнивают с интервалом колебаний данного показателя в норме. Такие интервалы определены на основании результатов иммунологического обследования больших групп здоровых людей [2]. Если один или несколько показателей иммунограммы оказываются ниже уровня нормы, можно ли на основании этого сделать заключение, что у человека иммунодефицит? Нет, нужно повторить исследование через 2–3 недели, чтобы проверить, насколько стойко сохраняются выявленные изменения иммунограммы, не были ли они временной реакцией на какое-то внешнее воздействие.

Сниженные иммунологические показатели отражают снижение защиты организма, которое обязательно как-то проявляется. Пониженное количество и функциональная активность фагоцитирующих клеток крови встречаются у больных с хроническими нагноительными процессами. При самом тяжелом из известных иммунодефицитов – вирусном заболевании СПИДе выявляется дефект Т-лимфоцитов. Вирус иммунодефицита человека избирательно поражает Т-хелперы, количество которых снижается. Это влечет за собой снижение количества Т-лимфоцитов и общую лимфоцитопению. Поскольку Т-хелперы участвуют в регуляции иммунного ответа на инфекции и опухолевый рост, потеря их ведет к развитию инфекций и опухолей, от которых и погибают больные СПИДом. Самый ранний признак этого грозного заболевания улавливается иммунограммой как нарушение нормальных соотношений субпопуляций Т-лимфоцитов [3].

В иммунограмме могут быть обнаружены не только пониженные, но и повышенные показатели, которые такжестораживают врача. Так например, в норме в сыворотке крови не должны выяв-

ляться иммуноглобулины класса IgE. Повышение их уровня наблюдается у больных с глистными инвазиями и у больных с аллергией. Способность после встречи с определенным антигеном продуцировать антитела класса IgE вместо обычных классов IgG или IgM является генетически детерминированным признаком и встречается у членов одной семьи. У некоторых из них эта генетическая особенность ведет к развитию аллергического заболевания, например бронхильной астмы. Выявление у членов такой семьи повышенного уровня IgE в сыворотке крови позволяет прогнозировать развитие заболевания.

Повышение других показателей может отражать адаптационные реакции организма. Например, повышение количества лейкоцитов в крови – лейкоцитоз, как правило, сопутствует острому воспалению, острой инфекции. При бактериальных инфекциях усиливается продукция гранулоцитов в костном мозге: в крови появляются незрелые их формы с палочковидным ядром. При вирусных инфекциях в крови нарастает количество лимфоцитов, которые призваны выполнять защитные функции в противовирусном иммунитете.

Нарастание в крови уровней иммуноглобулинов IgG и IgM при инфекционном заболевании оценивается положительно как признак активного иммунного ответа на антигены возбудителя. Нарастание в крови уровней тех же иммуноглобулинов у больных аутоиммунными заболеваниями расценивается как неблагоприятный прогностический признак нарастающей продукции аутоантител против собственных антигенов организма, которая приведет к усилению аутоагрессии.

Из этих примеров видно, что однозначной трактовки иммунограммы не может быть. Однако иммунограмма позволяет ответить на вопросы, поставленные в начале этой статьи. Иммунограмма позволяет конкретизировать иммунологический дефект, если таковой имеется, и может служить основанием для проведения соответствующей заместительной терапии или иммунокоррекции. Например, выявленный

недостаток иммуноглобулинов IgG и IgM рассматривается как показание к внутривенному введению препаратов иммуноглобулина, приготовленных из донорской крови. При обнаружении дефектов Т-лимфоцитов могут быть использованы лечебные препараты, приготовленные из ткани тимуса теленка, содержащие пептиды тимуса, способствующие дифференцировке и активации Т-лимфоцитов. Плазмафорез как метод элиминации из крови накопившихся в ней иммунных комплексов, провоспалительных цитокинов и других компонентов проводится обязательно под контролем иммунограмм. С учетом динамики иммунограмм более целенаправленным становится лечение аллергических и инфекционных заболеваний. Иммунограмма служит своеобразным экраном, отражающим состояние и работу иммунной системы организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абелев Г.И.* Основы иммунитета // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 5. С. 4–10.

2. *Лебедев К.А., Полякина И.Д.* Иммунограмма в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с.

3. *Ройт А.* Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 328 с.

4. *Фрейдлин И.С.* Цитокины и межклеточные контакты в противоинойфекционной защите организма // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 7. С. 19–25.

* * *

Ирина Соломоновна Фрейдлин, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии С.-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, руководитель отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины РАМН, доктор медицинских наук. Область научных интересов – фундаментальная и прикладная иммунология. Автор более 200 научных работ, в том числе пяти монографий, и соавтор двух учебников.