

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 616.153.962.4-078.33

О. Т. Кудаева, Е. В. Ненашева, В. А. Козлов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Дано описание метода определения иммуноглобулинов в цельной крови, без отделения сыворотки или плазмы. Метод адекватно отражает концентрацию иммуноглобулинов в циркулирующем русле, требует значительно меньшего количества крови и пригоден для мониторинга даже у мелких лабораторных животных.

The method for definition of immunoglobulins in pure blood without serum or plasma separation has been studied. This method adequately has shown the concentration of immunoglobulins in circulating channel and it requires considerably less quantity of blood for diagnostics. The method may be used even for small laboratory animals during monitoring.

Уровень иммуноглобулинов в периферической крови является одним из наиболее часто тестируемых параметров иммунной системы, характеризующих иммунный статус в норме, при иммунопатологических расстройствах и при разнообразных воздействиях, включая введение лекарственных веществ. Современным, быстрым и довольно точным методом определения концентрации иммуноглобулинов является метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Чувствительность ИФА очень высока, поэтому определение количества иммуноглобулинов возможно в различных биологических жидкостях и супернатантах клеточных культур [2, 4].

При определении уровня иммуноглобулинов в периферической крови методом ИФА требуется минимальное количество сыворотки, однако для получения сыворотки из периферической крови приходится брать довольно большие объемы крови — около сотен микролитров в связи с потерями при выделении, несмотря на использование микрометодов. Это приводит к определенным трудностям, особенно при хроническом наблюдении за уровнем иммуноглобулинов в периферической крови у экспериментальных животных, что требует многократного забора крови. В случае такого объекта исследования, как мыши, единственный доступный выход — взятие крови из ретроорбитального синуса, что, кроме хронической кровопотери, вызывает также сильный стресс у животных.

Для уменьшения количества необходимой для анализа периферической крови нами разработан метод определения уровня иммуноглобулинов в цельной крови. Мы сравнили концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке и в цельной крови и апробировали метод определения количества иммуноглобулинов в цельной крови при хроническом наблюдении за уровнем иммуноглобулинов (концентрация 10—100 нг/мл). Результаты выражали в

ноглобулинов при развитии иммунопатологического состояния в экспериментальной модели.

Материалы и методы. В работе использовали мышей линии DBA/2 и гибридов (C57BL/6DBA/2) F_1 (самок) и (CBA × C57BL/6) F_1 (самцов) в возрасте 2—4 мес из питомника "Столбовая" (Москва).

Для получения периферической крови мышам надрезали кончик хвоста, кровь забирали микропипеткой в количестве 3—5 мкл и переносили в пробирки с 1000-кратным объемом холодного физиологического забуференного раствора (PBS), pH 7,4. После тщательного перемешивания пробирки с раствором центрифугировали при 400 g в течение 10 мин для осаждения форменных элементов. Для получения сыворотки микрометодом 200 мкл периферической крови собирали в тонкую поливиниловую трубку, оставляли для образования сгустка и затем центрифугировали при 400 g в течение 10 мин [5]. После взятия крови из хвоста мышей забивали путем декапитации и также забирали кровь из центральных сосудов двумя способами: в поливиниловую трубку для получения сыворотки и в пробирки с холодным PBS.

Определение количества иммуноглобулинов проводили твердофазным методом ELISA в 96-луночных плоскодонных планшетах ("Linbro E. I. A.", Великобритания) с помощью конъюгата, меченого пероксидазой хрена [3]. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин. Периферическую кровь использовали в конечном разведении 1:50 000, сыворотку в разведении 1:100 000. Интенсивность реакции оценивали на приборе "Multiskan" ("Titertek", Швейцария) при длине волны $\lambda = 492$ нм. Количественное определение IgG проводили с помощью калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору IgG абсолютных значениях (в мг/мл).

Содержание IgG в цельной крови и в сыворотке мышей СВF1 из периферических (ПК и ПС) и центральных (ЦК и ЦС) сосудов (в мг/мл)

Номер серии	n	ПК	ПК*	ПС	ЦК	ЦК*	ЦС
1	4	1,30 (1,2—1,4)	2,40 (2,2—2,6)	2,30 (2,0—2,5)	1,52 (1,3—1,7)	2,82 (2,4—3,1)	2,95 (2,3—3,6)
2	4	1,35 (1,2—1,5)	2,50 (2,2—2,8)	2,38 (1,6—3,9)	1,40 (1,4—1,4)	2,60 (2,6—2,6)	2,75 (2,4—3,2)
3	4	1,48 (1,2—1,7)	2,72 (2,2—3,1)	2,92 (2,4—3,4)	1,38 (1,2—1,6)	2,55 (2,2—3,0)	2,78 (2,5—3,1)
Объединенные данные	1,2	1,38 (1,2—1,7)	2,54 (2,2—3,1)	2,53 (1,6—3,9)	1,43 (1,2—1,7)	2,66 (2,2—3,1)	2,82 (2,3—3,6)

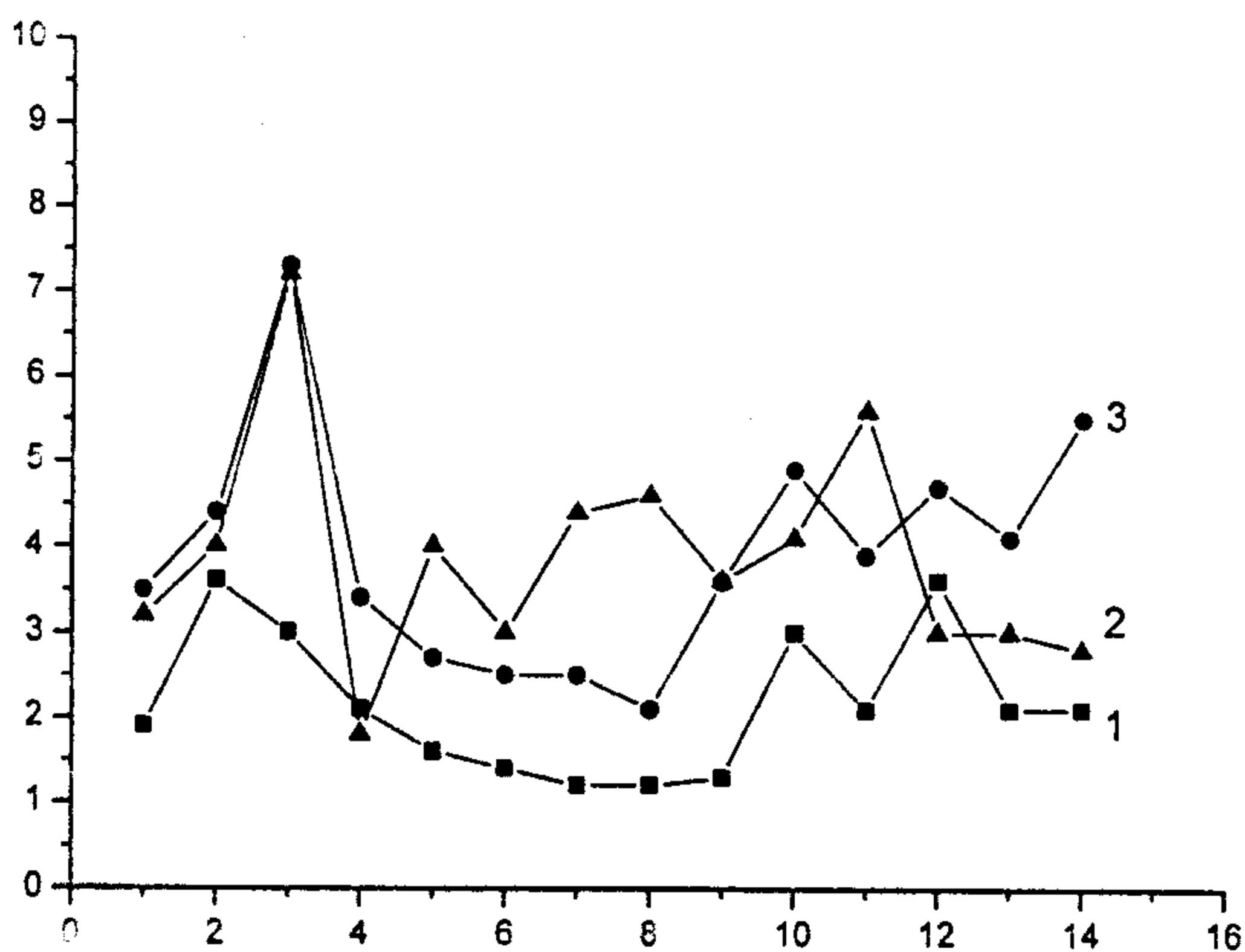
Примечание. Приведены средние значения и пределы колебаний показателей (в скобках) для каждой серии и для объединенных данных. ПК* и ЦК* — после пересчета с учетом значения гематокрита.

Сравнение уровней IgG в цельной крови и в сыворотке проводили в 3 отдельных сериях в разные дни (по 4 мыши в каждой серии). Результаты разных серий объединяли и оценивали методами непараметрической статистики [1].

Индукцию хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) у мышей осуществляли путем введения самкам (C57BL/6DBA/2)_{F1} лимфоидных клеток (клетки лимфатических узлов, тимуса и селезенки в соотношении 1:3:6) родительской линии DBA/2 по $50 \cdot 10^6$ клеток внутривенно двукратно с интервалом 5 дней [6]. Контрольным животным переносили клетки сингенных доноров. Уровень IgG при развитии хронической РТПХ определяли еженедельно в течение 14 нед.

Результаты и обсуждение. Для сравнения содержания IgG в цельной крови и в сыворотке определяли концентрацию IgG в периферической крови из хвостовой вены и капилляров — далее обозначено как периферическая кровь (ПК) и периферическая сыворотка (ПС), а также в суммарной крови крупных центральных сосудов, полученной при декапитации животного, — далее обозначена как центральная кровь (ЦК) и сыворотка из центральных сосудов (ЦС). Данные одновременного параллельного определения уровня IgG во всех 4 типах образцов представлены в таблице.

Концентрация IgG, измеренная в цельной крови, коррелировала с содержанием сывороточного IgG (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r = 0,41$, $p < 0,05$), однако оказалась почти в 2 раза ниже, чем в сыворотке, для всех исследованных образцов. Такое различие в содержании IgG при измерении в цельной крови и в сыворотке связано с тем, что объем сыворотки занимает примерно половину объема цельной крови; при использовании цельной крови половина объема приходится на форменные элементы, поэтому фактически в данном случае берется половинное количество сыворотки, что и приводит к



Содержание иммуноглобулинов в периферической крови мышей BDF1 в динамике развития хронической РТПХ.

По оси абсцисс — срок после индукции хронической РТПХ (в нед); по оси ординат — концентрация IgG (в мг/мл). 1 — контроль, 2 — опыт, 3 — опыт.

двукратному уменьшению определяемых значений. После пересчета содержания IgG на объем плазмы крови, т. е. с учетом значения гематокрита, которое для гибридов (CBA x C57BL/6)_{F1} самцов в возрасте 2—4 мес в среднем равно 46%, достоверных различий между значениями, измеренными в цельной крови и в сыворотке, не обнаружено (см. таблицу). Выявленные различия между уровнями IgG в крови из центральных сосудов и на периферии статистически недостоверны.

Полученные значения концентрации IgG в сыворотке мышей соответствуют общепринятым нормам для данного метода [7—9].

Для проверки пригодности описанного метода в экспериментальной работе мы определяли содержание IgG в цельной крови у мышей после индукции у них РТПХ на протяжении длительного времени при развитии иммунопатологического состояния. В зависимости от соотношения генотипов РТПХ может вызывать самые разные иммунопатологические состояния. В выбранном нами варианте (DBA/2 → (C57BL/6DBA/2)_{F1}) у мышей-реципиентов развивается хроническая РТПХ, приводящая к поликлональной активации В-клеток реципиента и повышению уровня IgG в циркуляции, что сопровождается у части животных аутоиммунным поражением по типу иммунокомплексного гломерулонефрита [6].

Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют о том, что многократное тестирование содержания IgG в цельной крови позволяет следить за развитием иммунопатологического процесса у индивидуальных животных, фиксируя начало изменений, динамику ответа и сопоставляя их с клиническим исходом РТПХ.

Таким образом, определение содержания IgG в цельной крови без предварительного отделения сыворотки, смягчая процедуру взятия крови, требует значительно меньшего ее объема (3 мкл по сравнению с 200 мкл, необходимыми для выделения сыворотки микрометодом), адекватно отражает уровень IgG в циркуляции и позволяет определять количество IgG в кровяном русле многократно, что делает возможным длительный мониторинг изучаемого параметра даже у мелких лабораторных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — М., 1978.
2. Иммуноферментный анализ / Под ред. Т. Т. Нго, Г. Ленхоффа. — М., 1988.
3. Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ // Антитела. Методы. — М., 1991. — Кн. 2. — С. 152—238.
4. Новые методы иммуноанализа / Под ред. У. П. Коллинза. — М., 1991.
5. Титова Л. Д., Юдин К. Б. Определение содержания иммуноглобулинов в капиллярной крови по Манчини // Лаб. дело. — 1983. — № 10. — С. 44—45.
6. Kimura K., Shimada K., Kanai Y. Specificity of anti-nuclear antibodies induced in F1 mice undergoing the graft versus host reaction: isotypes and cross-reactivities // Clin. Exp. Immunol. — 1987. — Vol. 69, N 2. — P. 385—393.
7. Klein-Schneegans A. S., Kuntz L., Fonteneau P., Looor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the Ipr (lymphoproliferation) locus // J. Autoimmun. — 1989. — Vol. 2, N 6. — P. 869—875.

8. Klein-Schneegans A. S., Kuntz L., Trembleau S. et al. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the nu (nude) locus // *Thymus*. — 1990. — Vol. 16, N 1. — P. 45—54.

9. Sarvas H. O., Seppala I. J., Tahtinen T. et al. Mouse IgG antibodies have subclass associated affinity differences // *Mol. Immunol.* — 1983. — Vol. 20, N 3. — P. 239—246.

Поступила 18.02.05