СТРУКТУРА КОМПЕТЕНТНОСТНО-ОРИЕНТИРОВАННОЙ РАБОЧЕЙ ПРОГРАММЫ ДИСЦИПЛИНЫ НА ОСНОВЕ ФГОС ВПО

Рабочая программа по дисциплине включает в себя следующие разделы:

1. Цель освоения дисциплины.
2. Место дисциплины в структуре ООП магистратуры.
3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины.
4. Структура дисциплины по видам учебной работы, соотношение тем и формируемых компетенций.
5. Содержание дисциплины.
   5.1. Темы и аннотации к ним.
   5.2. Планы практических занятий
   5.3. Программа самостоятельной работы студентов.
6. Образовательные технологии.
7. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации.
8. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины.
9. Материально-техническое обеспечение дисциплины.
10. Порядок утверждения рабочей программы.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «УДМУРТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

факультет
Медицинской биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

_____

«_____» _____20__ г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Экспериментальное моделирование иммунопатологий»

Направление подготовки

020400 БИОЛОГИЯ

Наименование магистерской программы

«Иммунобиотехнология»

Степень выпускника

МАГИСТР

Ижевск 2013

1. Цель и задачи освоения дисциплины

Целью освоения дисциплины является получение знаний и умений в области экспериментального моделирования в иммунологии.

Задачи освоения дисциплины: научить воспроизводить известные экспериментальные модели и разрабатывать новые, работать с лабораторными животными, планировать, проводить эксперимент, анализировать полученные результаты.

2. Место дисциплины в структуре ООП магистратуры

Дисциплина входит в профессиональный цикл (М3.ВР.06) вариативную часть ООП магистратуры. Осваивается во 2 семестре.

Дисциплина адресована магистрантам программы «Иммунобиотехнология» 1 года обучения.

Изучению дисциплины предшествуют: иммунология, большой иммунологический практикум, иммунохимия.

Для успешного освоения дисциплины должны быть сформированы на продвинутом уровне следующие компетенции:

следует этическим и правовым нормам в отношении других людей и в отношении природы (принципы биоэтики), имеет четкую ценностную ориентацию на сохранение природы и охрану прав и здоровья человека (ОК-1);

использует нормативные правовые документы в своей деятельности (ОК-5);

использует в познавательной и профессиональной деятельности базовые знания в области математики и естественных наук, применяет методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ОК-6);

способен использовать базовые знания и навыки управления информацией для решения исследовательских профессиональных задач, соблюдает основные требования информационной безопасности, в том числе защиты государственной тайны (ОК-13);

заботится о качестве выполняемой работы (ОК-16);

использует методы наблюдения, описания, идентификации, классификации, культивирования биологических объектов (ПК-2);

демонстрирует знание принципов структурной и функциональной организации биологических объектов и механизмов гомеостатической регуляции; применяет основные физиологические методы анализа и оценки состояния живых систем (ПК-3);

демонстрирует знание принципов клеточной организации биологических объектов, биофизических и биохимических основ, мембранных процессов и молекулярных механизмов жизнедеятельности (ПК-4);

применяет современные экспериментальные методы работы с биологическими объектами в полевых и лабораторных условиях, навыки работы с современной аппаратурой (ПК-5);

оперирует правовыми основами исследовательских работ и законодательства РФ в области охраны природы и природопользования, соблюдает нормы авторского права (ПК-13);

способен эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ (ПК-15);

применяет на практике приемы составления научно-технических отчетов, обзоров, аналитических карт и пояснительных записок (ПК-16);

понимает, излагает и критически анализирует получаемую информацию и представляет результаты полевых и лабораторных биологических исследований (ПК-17);

Программа дисциплины построена линейно-хронологически, в ней выделены разделы

Раздел 1. Экспериментальные и теоретические модели в научных исследованиях и клинической практике.

Раздел 2. Экспериментальные животные.

Раздел 3. Экспериментальные модели реакций гиперчувствительности.

Раздел 4. Экспериментальные модели аутоиммунных реакций и заболеваний.

Раздел 5. Модель "исчезновения" антител при психо-физическом стрессе (плавание) у мышей.

Раздел 6. Медикаментозная иммунодепрессия.

Раздел 7. Условнорефлекторная модуляция интенсивности иммунных реакций.

Раздел 8. Клеточные системы.

3. Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины

ОК-1: способен к творчеству (креативность) и системному мышлению;

ОК-2: способен к инновационной деятельности;

ПК-1: понимает современные проблемы биологии и использует фундаментальные биологические представления в сфере профессиональной деятельности для постановки и решения новых задач;

ПК-2: знает и использует основные теории, концепции и принципы в избранной области деятельности, способен к системному мышлению;

ПК-3: самостоятельно анализирует имеющуюся информацию, выявляет фундаментальные проблемы, ставит задачу и выполняет полевые, лабораторные биологические исследования при решении конкретных задач по специализации с использованием современной аппаратуры и вычислительных средств, демонстрирует ответственность за качество работ и научную достоверность результатов;

ПК-9: профессионально оформляет, представляет и докладывает результаты научно-исследовательских и производственно-технологических работ по утвержденным формам;

ПК-10: глубоко понимает и творчески использует в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов специальных дисциплин магистерской программы;

ПК-12: применяет методические основы проектирования и выполнения полевых и лабораторных биологических и экологических исследований с использованием современной аппаратуры и вычислительных комплексов (в соответствии с целями магистерской программы), генерирует новые идеи и методические решения;

ПК-13: самостоятельно использует современные компьютерные технологии для решения научно-исследовательских и производственно-технологических задач профессиональной деятельности, для сбора и анализа биологической информации;

ПК-15: использует знание нормативных документов, регламентирующих организацию и методику проведения научно-исследовательских и производственно-технологических биологических работ (в соответствии с целями магистерской программы), способен руководить рабочим коллективом, обеспечивать меры производственной безопасности;

СПК – 6 - имеет системные знания о структурно-функциональной организации иммунной системы, связь иммунной системы с другими системами организма, о механизмах патологий иммунной системы, владеет методами их лабораторной диагностики.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

Знать:

- роль и место биомоделей в научных исследованиях и клинической практике.
- принципы построения экспериментальных биомоделей биологических объектов и процессов.
- методы создания экспериментальных биомоделей.
- способы оценки адекватности экспериментальных биомоделей.
- границы применимости результатов исследования, полученных на экспериментальных моделях, в клинической практике.
- аспекты работы с лабораторными животными.

Уметь:

- работать с лабораторными животными.
- планировать, проводить эксперимент, анализировать полученные результаты.

4. Структура дисциплины по видам учебной работы, график и формы контроля

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетных единицы, 108 часов.

№ п/п	Разделы, темы дисциплины	Неделя семестра	Виды учебной работы (в часах)			Формы текущего контроля успеваемости
			Л	Пр	Сам. раб.	
	Экспериментальные и теоретические модели в научных исследованиях и клинической практике.	1		4	2	доклад
	Экспериментальные животные.	2		4	2	доклад
	Экспериментальные модели реакций гиперчувствительности, аутоиммунных реакций и заболеваний. Представление модели, задач исследования.	3		4	6	доклад
	Модель "исчезновения" антител при психо-физическом стрессе (плавание) у мышей. Условнорефлекторная модуляция интенсивности иммунных реакций. Представление модели, задач исследования.	4		2		
	Медикаментозная иммунодепрессия. Представление модели, задач исследования.	4		2		
	Клеточные системы. Представление модели, задач исследования.	5		2		
	Проведение эксперимента	4-11			30	
	Экспериментальные модели реакций гиперчувствительности, аутоиммунных реакций и заболеваний. Представление промежуточного отчета.	7		4	8	доклад
	Модель "исчезновения" антител при психо-физическом стрессе (плавание) у мышей. Условнорефлекторная модуляция интенсивности иммунных реакций. Представление промежуточного отчета.	8		4		
	Медикаментозная иммунодепрессия. Представление промежуточного отчета.	9		4		
	Клеточные системы. Представление промежуточного отчета.	10		2		
	Представление заключительного отчета	12		4	6	доклад
				36	**54**	

5. Содержание дисциплины

5.1. Темы и их аннотации

Раздел 1. Экспериментальные и теоретические модели в научных исследованиях и клинической практике.

Экспериментальные модели. Значение биомоделей в научных исследованиях и клинической практике. Принципы построения экспериментальных биомоделей патологических состояний. Методы создания экспериментальных биомоделей. Оценка адекватности экспериментальных биомоделей. Границы применимости результатов исследования, полученных на экспериментальных моделях, в клинической практике. Математические модели.

Раздел 2. Экспериментальные животные.

Выбор животных в экспериментальной работе. Категории животных. Требования к условиям содержания экспериментальных животных. Физические, химические, биологические и социальные факторы, влияющее на экспериментальных животных. Биотические аспекты работы с лабораторными животными. Законодательство и организации, регламентирующие экспериментальную работу с лабораторными животными. Основы работы с лабораторными животными. Некоторые манипуляции с лабораторными животными.

Раздел 3. Экспериментальные модели реакций гиперчувствительности.

Виды и механизмы реакций гиперчувствительности. Анафилактический шок у морской свинки и феномен десенсибилизации. Местная анафилактическая реакция у морской свинки. Пассивный перенос анафилактической реакции. Гиперчувствительность замедленного типа.

Раздел 4. Экспериментальные модели аутоиммунных реакций и заболеваний.

Экспериментальная аутоиммунная гемолитическая анемия у мышей. Коллаген-индуцированный артрит у крыс. Адъювантный артрит у крыс. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит у крыс.

Экспериментальная модель атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП человека.

Раздел 5. Модель "исчезновения" антител при психо-физическом стрессе (плавание) у мышей.

Раздел 6. Медикаментозная иммунодепрессия.

Иммунодепрессия, вызванная метотрексатом и ее купирование фолиевой кислотой. Иммунодепрессия вызванная циклоспорином А в модели коллаген-индуцированного артрита крыс, аутоиммунной гемолитической анемии у мышей, аутоиммунного энцефаломиелита у крыс.

Раздел 7. Условнорефлекторная модуляция интенсивности иммунных реакций.

Иммуно-нейро-эндокринные взаимодействия. Условная вкусовая аверзия. УВА на сахарин, вызванная инъекцией хлорида лития. Модуляция ГЗТ состоянием условнорефлекторной вкусовой аверзии.

Раздел 8. Клеточные системы.

Линии клеток, используемые в иммунологических исследованиях. Экспериментальные модели, воспроизводящие in vitro функции клеток. Фагоцитоз с живыми бактериями. Реакция дегрануляции базофилов. Реакция бласттрансформации лимфоцитов.

5.2. Планы практических занятий

Краткое описание подходов к организации семинарских занятий.

Магистранты готовят сообщение по теме, опираясь на вопросы, вынесенные на семинар. Семинар включает сообщение и обсуждение темы.

5.3. Программа самостоятельной работы студентов

Структура СРС

Тема	Вид	Форма	Объем учебной работы (часов)
Экспериментальные и теоретические модели в научных исследованиях и клинической практике.	подготовка доклада	СРС без участия преподавателя	2
Экспериментальные животные.	подготовка доклада	СРС без участия преподавателя	2
Представление модели, задач	подготовка	СРС без участия	6

исследования.	доклада	преподавателя	
Проведение эксперимента	выполнение эксперимента в лаборатории	СРС под контролем преподавателя	30
Представление промежуточного отчета.	подготовка доклада	СРС без участия преподавателя	8
Представление заключительного отчета	подготовка доклада	СРС под контролем преподавателя	6
Итого			**54**

Виды СРС:
– подготовка к контрольной работе;
– подготовка к коллоквиуму;
– подготовка реферата, доклада;
– подготовка к деловым играм;
– решение задач;
– выполнение расчетно-графических работ;
– написание курсовой работы.
По одной теме может быть несколько видов СРС.

Формы СРС:
– СРС без участия преподавателя;
– КСР контроль самостоятельной работы студента.

5.4. Содержание СРС

Студенты самостоятельно готовятся к докладу по обозначенным выше темам с использованием литературы из списка. Так же студенты самостоятельно, под контролем преподавателя, планируют и выполняют эксперименты, анализируют полученные результаты, готовят отчеты.

6. Образовательные технологии

Технология обучения ориентирована на нетрадиционные формы: студенты в малых группах (2-3 человека) осваивают или разрабатывают экспериментальную модель.

Оценка знаний и умений студентов проводится с помощью семинаров и открытой защиты результатов своей экспериментальной деятельности.

В рамках практических занятий реализуется взаимообучение - интерактивное обучение, в форме взаимоконтроля самостоятельной работы, совместного

решение ситуационных задач, совместной разработки схем сложных процессов, обсуждения проблемных вопросов.

7. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины

Оценка качества освоения дисциплины включает текущий контроль успеваемости, экзамен.

Оценочные средства по дисциплине (по выбору преподавателя):

– **Примерный перечень вопросов к зачету / экзамену**

1. Экспериментальные модели. Значение биомоделей в научных исследованиях и клинической практике. Принципы построения экспериментальных биомоделей патологических состояний.
2. Методы создания экспериментальных биомоделей.
3. Оценка адекватности экспериментальных биомоделей. Границы применимости результатов исследования, полученных на экспериментальных моделях, в клинической практике.
4. Экспериментальные животные. Категории животных. Требования к условиям содержания экспериментальных животных. Физические, химические, биологические и социальные факторы, влияющее на экспериментальных животных. Биотические аспекты работы с лабораторными животными.
5. Математические модели в иммунологии.
6. Экспериментальные модели артрита.
7. Экспериментальные модели атеросклероза.
8. Экспериментальные модели рассеянного склероза.
9. Экспериментальные модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей.
10. Экспериментальные модели, демонстрирующие связь иммунной, нервной и эндокринной системы.
11. Экспериментально вызванная медикаментозная иммунодепрессия.

12. Модель "исчезновения" антител при психо-физическом стрессе (плавание) у мышей.

13. Линии клеток, используемые в иммунологических исследованиях. Экспериментальные модели, воспроизводящие in vitro функции клеток.

– Рекомендуемый перечень вопросов для вынесения на междисциплинарный итоговый государственный экзамен

1. Экспериментальные модели. Значение биомоделей в научных исследованиях и клинической практике. Принципы построения экспериментальных биомоделей патологических состояний. Методы создания и оценка адекватности экспериментальных биомоделей.
2. Экспериментальные модели иммунопатологических состояний.
3. Экспериментальные животные. Категории животных. Требования к условиям содержания экспериментальных животных. Физические, химические, биологические и социальные факторы, влияющее на экспериментальных животных. Биотические аспекты работы с лабораторными животными.

Для определения уровня сформированности компетенции(й) предлагаются следующие критерии оценки – наличие знаний, умений и навыков обозначенных в **п. 3** настоящей программы.

8. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

Основная литература

1. Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Фомина К.В. Экспериментальные модели иммунопатологий. Учебное пособие - Ижевск, 2013.
2. Буреш Я., Бурешова О. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: В.ш. 1991. 399 с.
3. Иммунофизиолоия. Под ред. Корневой Е.А. Спб.: Наука. 1993. 683 с.
4. Меньшиков И.В., Фомина К.В., Бедулева Л.В., Сергеев В.Г. Экспериментальная модель атеросклероза у крыс, вызванного иммунизацией нативными липопротеинами человека // Вестник Удмуртского университета. 2012. №1. 80-86.
5. Корепанов А.С., Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Князев А.В. Идиотипические механизмы регуляции развития аутоиммунной реакции в экспериментальной модели аутоиммунной гемолитической анемии у мышей // Вестник Удмуртского университета. 2012. № 2. С. 62-67.

Дополнительна литература

1. Биомедицинская этика // Под ред. В.И. Покровского. М., 1997.
2. Международная конвенция прав животных. Редакция - ноябрь 1987 г.
3. Лещинский Л.А. К этическим вопросам клинических испытаний новых лекарственных средств. Клин. Медицина. 1999 г. №6: 50-51.
4. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Каркищенко Н.Н, Грачева С.В. - 2010. 344 с.
5. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования М.: ВПК. 2004.
6. Материалы сайта http://accoona.ru/referat/ref8070.html.
7. Меньшиков И.В., Бедулева Л.В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия в патогенезе СПИДа//Иммунология. - 2006. - № 5. - С316-321.
8. Новиков Д.К, Новикова В.И. Оценка иммунного статуса. М-Витебск. 1996. 281 с.
9. Подопригора Г.И. Медицинская гнотобиология. М.: МИА. 2003. 271 с.

Интернет-ресурсы:

– PubMed (Citations for biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

– Pub Med Central (Free full-text archive of biomedical and life sciences journal literature at the U.S. National Institutes of Health's National Library of Medicine (NIH/NLM)). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/

– Словарь медицинских терминов. Источник http://lib.ru/NTL/MED/

Периодические издания: См. интернент ресурсы.

9. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Лабораторный практикум проводится в учебной лаборатории экспериментальной иммунологии. Занятия в лаборатории проводятся с соблюдением правил техники безопасности, санитарно-гигиенических норм, правил инфекционной безопасности. Работы с лабораторными животными проводятся в соответствии с «Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных», Законодательством РФ.

Требования к аудитории (помещению, местам) для проведения занятий – лаборатория экспериментальной иммунологии, оснащенная общелабораторным

оборудованием, лабораторной мебелью, посадочными местами, доской, компьютером, мультимедиа проектором, экраном или интерактивной доской.

Требования к аудиторному оборудованию, в том числе к неспециализированному компьютерному оборудованию и программному обеспечению общего пользования – наличие Microsoft Office, наличие интернета.

Требования к специализированному оборудованию.

№ п/п	Наименование комплекса, стенда, установки, системы	Дата изготовления	Дата ввода в эксплуатацию	Страна - производитель	Назначение
1.	**Автоклав 23л. настольный, полуавтоматический, скоростной, 2540МК, Tuttnauer**	**2011**	**15.04.11**	**Израиль**	**Стерилизация материалов и инструментов**
2.	**Весы RV 313, Ohaus**	**2007**	**30.05.07**	**Китай**	**Весы общего назначения для работы в исследовательской лаборатории**
3.	**ДНК-амплификатор Mastercycler Personal, Eppendorf**	**2011**	**27.07.11**	**Германия**	**Количественный и качественный анализ структуры генома**
4.	**Источник для полусухого переноса Semi Dry, Хеликон**	**2011**	**15.04.11**	**Россия**	**Исследование макромолекул методом иммуноблотинга**
5.	**Источник питания для э/ф УЭФ-01- "Эльф-4" ДНК-Технология О-ELF4**	**2011**	**15.04.11.**	**Россия**	**Компактный источник питания для проведения гельэлектрофореза**
6.	**Криостат медицинский Shandon Cryotome E, Thermo Electron Corp**	**2011**	**10.05.11**	**США**	**Изготовление замороженных срезов из нефиксированной ткани**
7.	**Ламинар С1-1.2, Ламинарные системы**	**2007**	**23.05.07**	**Россия**	**Предназначен для создания стерильной воздушной среды в рабочей зоне для защиты от внешних загрязнений**

8.	**Люминесцентный Микроскоп Nicon E 200F**	**2011**	**29.12.10**	**Япония**	**Изучения микробиологических, гистологических и других препаратов**
9.	**Микроскоп инвертированный тринокулярный Motic AE 20/21**	**2007**	**06.08.07**	**Испания**	**Для работ в светлом поле и фазовом контрасте**
10.	**Мини-камера для горизонтального электрофореза SE-1**	**2011**	**27.07.11**	**Россия**	**Для проведения горизонтального электрофореза**
11.	**PH-метр S-20K, mettler toledo**	**2007**	**08.06.07**	**Китай**	**Для измерения pH и окислительно-восстановительного потенциала.**
12.	**Сухожаровой шкаф 112 F, Sanyo**	**2000**	**01.12.00**	**Япония**	**Обеспечивает стерилизацию с постоянной температурой и рекомендован для эффективной сухожаровой стерилизации.**
13.	**Фотометр планшетный Statfax 3200, Awareness Technology**	**2007**	**21.05.07**	**США**	**Проведение измерений оптической плотности в ячейках микропланшета**
14.	**Центрифуга СМ-6.М для стекл. и пласт.пробирок (Elmi)**	**2003**	**30.09.03**	**Латвия**	**Центрифугирование**
15.	**Центрифуга СМ-50, (Elmi)**	**2008**	**26.11.08**	**Латвия**	**Центрифугирование микропробирок типа Эппендорф**
16.	**Шейкер термостатируемый ES-20, Biosan**	**2011**	**27.07.11**	**Латвия**	**Перемешивание и инкубация биологических жидкостей, выращивания культуры клеток**
17.	**Электрофорезная камера Sub-CeII GT System, BioRad**	**2011**	**15.04.11**	**США**	**Разделение биологических молекул**
18.	**Система высокоэффективной жидкостной хроматографии AKTApurifier UPC 10, GE Healthcare**	**2012**	**Май 2012**	**Швеция**	**Высокоэффективное аналитическое и препаративное разделения биологических макромолекул**

	Bio-Sciences				
19.	**Инкубатор CO2 MCO-19 AIC (UV)**	**2011**	**Апрель 2012**	**Япония**	**Для культивирования клеток**
20.	**Вентилируемый шкаф для содержания лабораторных животных UniProtect Air Flow (Ehret).**	**2012**	**Май 2012**	**Германия**	**Содержание лабораторных животных в условиях контролируемой микробиологическо й контаминации.**

Требования к специализированному программному обеспечению - нет

Требования к перечню и объему расходных материалов и лабораторным животным

- фиколл-верогафин, трипановый синий, краситель Романовского-Гимза, масло иммерсионное, спирт, соли для приготовления физиологического раствора, натрий-фосфатного и цитратного буферов, антивидовые конъюгаты против иммуноглобулинов крысы, мыши, человека, ОФД, перекись водорода, гепарин, твин-20, БСА, серная кислота, Сандиммун-неорал, Метотрексат, фолиевая кислота, хлорид лития, сахарин, ЭДТА, цитрат натрия, коллаген II типа быка, ЛПНП человека, основный белок морской свинки, НАФ, ПАФ, лошадиная сыворотка, IgG крыс, IgG кролика, танин, глутаровый альдегид, адреналин, эфир, поликлональная сыворотка против иммуноглобулинов мыши, иммуноглобулинов крысы, лошадиная сыворотка, гемоцианин, альбумин человека, бычий сывороточный альбумин;

- наконечники для пипеток, стекла предметные, стекла покровные, камера Горяева, планшеты плоскодонные, планшеты круглодонные, набор хирургических инструментов, шприцы, пробирки стеклянные центрифужные, пробирки Эппендорф;

- крысы, мыши, морские свинки.

10. Порядок утверждения рабочей программы

Разработчик рабочей программы дисциплины

ФИО	**Ученая степень**	**Ученое звание**	**Должность**	**Контактная информация** (служебные E-mail и телефон)

Бедулева Л.В.	д.б.н.	доцент	профессор	blv76@mail.ru

Экспертиза рабочей программы

Первый уровень (оценка качества содержания программы и применяемых педагогических технологий)		
Наименование кафедры	**№ протокола, дата**	**Подпись зав. кафедрой**
Кафедра иммунологии и клеточной биологии		
Выписка из решения		

Второй уровень (соответствие целям подготовки и учебному плану образовательной программы)		
Методическая комиссия фак-та / инст. в структуре ООП которого будет реализовываться данная программа	**№ протокола, дата**	**Подпись председателя МК**
Выписка из решения		

Утверждение рабочей программы дисциплины

должностное лицо (ФИО директора института / декана факультета, заместителя по учебной работе)	**№ протокола, дата** решения ученого совета института / факультета	**подпись**

Иные документы об оценке качества рабочей программы дисциплины
(при их наличии - ФЭПО, отзывы работодателей, студентов и пр.)

Документ об оценке качества (наименование)	**Дата документа**

Приложение

Цитировано из

Бедулева Л.В., Меньшиков И.В., Фомина К.В. Экспериментальные модели иммунопатологий. Учебное пособие. Москва-Ижевск. РХД. 2013.

Экспериментальные модели аутоиммунных заболеваний

Поражение тканей и органов при аутоиммунных заболеваниях вызвано агрессивной реакцией иммунной системы организма на собственные молекулы. Аутоиммунные заболевания возникают с результате нарушения механизмов регуляции аутореактивности.

Иммунные реакции на собственные антигены организма называют аутоиммунными реакциями. Аутоиммунные реакции является нормальной составляющей иммунореактивности. Аутореактивные лимфоциты и аутоантитела присутствуют и проявляют непатогенную активность к любым аутоантигенам в норме. Аутоиммунные реакции контролируют антигенный состав организма, пролиферацию и рост тканей организма, участвуют в регуляции функций клеток. Активность аутореактивных лимфоцитов может транзиторно повышаться при многих инфекциях. В норме аутореактивные лимфоциты находятся под регуляторным контролем, который ограничивает их активность. Аутоиммунное заболевание возникает в результате нарушения регуляторного контроля аутореактивных лимфоцитов. Аутоиммунные реакции становятся избыточными, приобретают самоподдерживающийся, самоусиливающийся - агрессивный характер по отношению к тканям организма. Поэтому аутоиммунные заболевания относят к V типу реакций гиперчувствительности - гиперчувствительности на аутоантигены.

Есть основания полагать, что регуляция активности аутореактивных лимфоцитов в норме осуществляется антиидиотипическими лимфоцитами и продуцируемыми ими антителами, направленные к TCR и Ig-рецепторам аутореактивных лимфоцитов. Регуляция, основанная на идиотип-антиидиотипических взаимодействиях единственный в организме механизм иммунорегуляции обеспечивающий специфичность регуляции. Изменение функциональной активности контролирующих лимфоцитов

(антиидиотипических по отношению к аутоклонам), например, в результате активации чужеродным антигеном, может привести к развитию аутоиммунного заболевания.

5.1. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит у крыс.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) у крыс является экспериментальной моделью рассеянного склероза человека - тяжелого хронического демиелинизирующего заболевание ЦНС аутоиммунной природы. ЭАЭ вызывают у крыс Lewis или DA иммунизацией основным белком миелина (ОБМ) морской свинки, а также гомогенатом спинного мозга или головного мозга морской свинки в ПАФ. Крысы DA также высокочувствительны к бычьему протеолипидному протеину, но для крыс LEW он является слабоэнцефалитогенным (Stepaniak, 1995).

Модель ЭАЭ полезна для изучения механизмов развития аутоиммунного поражения миелина, ведущих к рассеянному склерозу человека и механизмов регуляции иммунного ответа к аутоантигенам миелина.

Главный энцефалитогенный эпитоп для крыс LEW находится в молекуле ОБМ между аминокислотными остатками 68-86 (пронумерованы в соответствии с последовательностью ОБМ быка, который содержит два дополнительных остатка в этой области), последовательность YGSLPQKSQ—RSQDENPV (Hashim,1977; Mannie et al., 1985). Иммунный ответ крыс LEW на этот эпитоп ограничен MHC локусом RT-1Bl, который гомологичен мышиному I-A. Энцефалитогенные Т клетки преимущесвенно экспрессируют V-α-2 или 4 и V-β 8.2 на своих Т-клеточных рецепторах (Burns et al., 1989; Chluba et al., 1989). Этот эпитоп ОБМ также энцефалитогенен и для крыс DA, хотя заболевание протекает мягче, чем при иммунизации интактным ОБМ. (Stepaniaket al., 1995). Иммунный ответ у DA также ограничен I-A, но вовлеченность TCR в этот процесс еще не установлена.

Второй, минорный энцефалитогенный эпитоп локализован в молекуле ОБМ между остатками 87-99, последовательность VHFFKNIVTPRTP (Offner et al., 1989). Относительно высокие дозы этого пептида требуются для индукции

ЭАЭ у крыс LEW (Offner et al., 1989), а у крыс DA этот пептид не индуцирует ЭАЭ (Stepaniak et al., 1995). Иммунный ответ на ОБМ 87-99 ограничен RT-1Dl, гомологичным мышиному I-E (Offner et al., 1989).

Условия индукции активного ЭАЭ у крыс.

ЭАЭ у крыс вызывают иммунизацией основным белком миелина (ОБМ) морской свинки, а также гомогенатом спинного мозга или головного мозга морской свинки. Бычий, кроличий или человеческий ОБМ неактивны (неэнцефалитогенны) у крыс. ОБМ крысы также обладает энцефалитогенностью, но существенно менее выраженной, чем ОБМ морской свинки. Для индукции ЭАЭ у крыс используют также протеолипидный протеин миелина, миелин-олигодендроцитарный гликопротеин. Для моделирования ЭАЭ используют молодых животных, возрастом 8-10 недель. Самки и самцы в равной степени чувствительны к индукции ЭАЭ.

Высокочувствительными к аутоиммунному энцефаломиелиту, вызываемому основным белком миелина морской свинки, являются инбредные крысы Lewis и Dark Agouti. Однако крысы Lewis, полученные из разных колоний обладают разной чувствительностью. Недостатком крыс Dark Aguiuti для моделирования ЭАЭ является их чувствительность к развитию артрита в ответ на введение полного адъюванта Фрейнда, используемого для индукции ЭАЭ. У крыс стока Wistar также можно вызвать ЭАЭ иммунизацией основным белком миелина морской свинки в ПАФ. Недостатком является невысокая чувствительность крыс Wistar (примерно у 20 % иммунизированных крыс наблюдается паралич задних конечностей). Однако использование крыс Wistar позволяет проводить сравнительный анализ особенностей иммунного ответа и механизмов его регуляции у больных и устойчивых животных.

Условием индукции ЭАЭ является иммунизация белками миелина в полном адъюванте Фрейнда (ПАФ), содержащем Mycobacterium butyricum в дозе 100 мкг на крысу. Данное количество бактерий необходимо для устойчивого воспроизведения клинической картины ЭАЭ. Модель ЭАЭ на крысах в отличие от модели на мышах не требует использования

дополнительных адъювантов, таких как pertussis toxin, тогда как большинство протоколов индукции ЭАЭ у мышей требуют их использования.

Возможен перенос ЭАЭ интактным крысам от ОБМ иммунизированных доноров – адоптивный перенос. При этом клиническая картина наблюдается через 4-5 дней после трансфера.

Наблюдение клинических признаков ЭАЭ у крыс *(Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease // Current Protocols in Immunology. 1996).*

Первые клинические проявления наблюдаются на 10-12 день после иммунизации и прогрессируют от потери тонуса хвоста до паралича задних конечностей. Большинство крыс выздоравливают спонтанно в течение 6-8 дней после начала клинических проявлений (на 18–20 день после иммунизации), при условии доступа к воде и еде в течение паралитической стадии.

Выраженность клинических признаков определят по шкале:

1+ потеря тонуса хвоста;

2+ слабость задних конечностей;

3+ паралич задних конечностей, сопровождаемый часто недержанием.

Полезно исследование воспалительных повреждений спинного мозга мононуклеарами крыс развивших энцефаломиелит. Для этого готовят срезы спинного мозга (толщиной 10 мкм) окрашенные гематоксилин-эозином от ЭАЭ крыс. Демиелинизация не заметна у крыс с острым ЭАЭ.

Оценка адекватности

Острое начало и спонтанная ремиссия, наблюдаемые у крыс, сходны с течением рассеянного склероза у человека.

<u>Индукция ЭАЭ у крыс ОБМ морской свинки.</u>

Методика.

1. Коммерческий полный адъювант Фрейнда не содержит необходимого количества Mycobacterium butyricum, поэтому готовят модифицированный ПАФ, добавляя необходимое число Mycobacterium к неполному адъюванту Фрейнда (НАФ). Для этого убитых Mycobacterium butyricum добавляют к неполному НАФ до концентрации 4 мг/мл.

2. Коммерческий лиофилизированный ОБМ морской свинки растворяют в дистиллированной воде. Доводят до концентрации 1 мг/мл.
3. Раствор белка и модифицированный ПАФ смешивают в равных соотношениях до получения стойкой эмульсии. Стабильная эмульсия не должна расплываться, если ее каплю поместить на поверхность воды.
4. Крыс иммунизируют внутрикожно в заднюю часть спины 50 мкл эмульсии, содержащей 25 мкг ОБМ и 100 мкг M. Butyricum.

Индукция ЭАЭ гомогенатом спинного или головного мозга.

Методика.

1. 1 г замороженного спинного мозга морской свинки или крысы гомогенизируют в 1 мл of 0,9% NaCl 3 минуты при комнатной температуре.
2. Смешивают гомогенат спинного мозга с модифицированным ПАФ (4 мг Mt t в 1 мл НАФ) в соотношении 1:2 (объем/объем).
3. Иммунизируют крыс 50 мкл эмульсии в подушечки задних лап.

Выделение ОБМ морской свинки из спинного или головного мозга и определение его концентрации *(Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease // Current Protocols in Immunology. 1996).*

ОБМ морской свинки можно выделить из спинного или головного мозга. Для этого из ткани удаляют липиды хлороформ/метанольной смесью, ОБМ экстрагируют раствором HCl. Преципитируют сульфатом аммония, и растворяют в HCl, диализуют для удаления остатков сульфата аммония и замораживают при −20 ^{0}C.

Концентрацию ОБМ можно определить, измеряя поглощение раствора ОБМ при 280 нм при длине пути 1 см. При концентрации раствора ОБМ 1 мг/мл поглощение при 280 нм должно быть 0,6. Выделение ОБМ морской свинки занимает 4 дня.

Методика.

1. ~175 г ткани замороженного спинного мозга или 25 г ткани головного мозга гомогенизируют в 200 мл охлажденной смеси хлороформ/метанол.

2. Для полной экстракции липидов жидкий гомогенат помещают в большую емкость и добавляют охлажденную хлороформ/метанольную смесь до 3 литров. Экстрагируют на холоде в течение ночи при перемешивании. Липиды переходят в раствор, белок остается в осадке.

3. Хлороформ/метанольную смесь выпаривают вакуумным насосом, не позволяя осадку полностью высохнуть.

4. Осадок экстрагируют на холоде в течение часа в 500 мл дистиллированной воды перемешиванием. Затем фильтруют, фильтрат отбрасывают.

5. Осадок ресуспендируют в 250 ml of 0,01 н HCl и перемешивают 1 час на магнитной мешалке при комнатной температуре. Контролируют pH и поддерживают раствор при pH 3.2, добавляя по капле 1 N HCl.

6. Центрифугируют экстракт 10 мин при 48,000 *g* (20,000 rpm in SS-34 rotor), 4^0C. Собирают супернатант фильтрую через фильтровальную бумагу Whatman № 4. Измеряют объем супернатанта.

7. На холоду добавляют равный объем насыщенного сульфата аммония (т.е. до 50% насыщения) при постоянном перемешивании. После того как весь сульфат аммония добавлен перемешивание останавливают. Позволяют преципитату осесть в течение ночи.

8. Декантируют супернатант и центрифугируют преципитат 10 мин при 48,000g при 4 ^{0}C.

9. Растворяют преципитата в 50 ml of 0,01 N HCl. Переносят растворенный преципитат в диализный мешок (диализная мембрана MWCO 6000 to 8000). Диализуют против 6 литров воды при 4 ^{0}C для удаления остатков сульфата аммония. После 5-6 часов меняют воду и продолжают диализ в течение ночи.

10. Центрифугируют диализат 10 мин при 48,000g при 4 ^{0}C, для удаления примесей.

11. Подводят pH супернатанта до 7,0 с помощью 0,25 N NaOH.

12. Центрифугируют 10 мин при 48,000*g*, при 4 ^{0}C. Хранят аликвоты супернатанта (1мл) с концентрацией 1 мг ОБМ/мл при 20^0C или в

лиофилизированном виде при 4^0С. Замороженный ОБМ хранится при 20 ^{0}С около 2 месяцев.

<u>Адоптивный перенос ЭАЭ</u> (Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease // Current Protocols in Immunology. 1996).

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит может легко индуцироваться при переносе Т клеток от крыс Lewis (LEW) сингенным (RT1l) крысам-реципиентам LEW. Для осуществления эффективного переноса лимфоциты доноров должны быть активированы ОБМ морской свинки in vitro в течение 48-72ч до переноса реципиентам. Если ОБМ не доступен, донорские лимфоциты могут быть активированы Т-клеточным митогеном конкавалином А. Таким же образом адоптивный перенос может быть осуществлен от крыс-доноров Dark Agouti (DA) сингенным (RT1a) крысам реципиентам DA.

Методика

1. Извлечь селезенку у крыс-доноров, иммунизированных 10 днями ранее ОБМ/ПАФ и поместить в маленькую стерильную чашку Петри с холодным сбалансировнным раствором Хенкса.
2. Приготовить суспензию клеток в холодном растворе Хенкса и лизировать эритроциты.
3. Дважды отмыть 50мл раствора Хенкса при 470g, 15 мин, используя 50 мл конические пробирки.
4. Если необходимо, профильтровать клеточную суспензию через 100-мкм нейлоновый фильтр.
5. Ресуспендировать клетки в RPMI-5/HEPES, из расчета 10мл среды на 1 селезенку. Определить жизнеспособность клеток с трипановым синим. Жизнеспособность должна быть больше 90%.
6. Довести концентрацию до 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в RPMI-5/HEPES (содержание HEPES 25 mM), перенести в 175-cm^2 культуральный флакон и добавить 2 мкг/мл ОБМ морской свинки. Инкубировать 72 часа. *Если* ОБМ недоступен, для стимуляции клеток может быть использован 1мкг/мл конкавалин А.

7. Осадить клетки при 470g, 15 мин, дважды отмыть раствором Хенкса. Определить жизнеспособность. Ресуспендировать клетки в растворе Хенкса до концентрации 5×10^7 жизнеспособных клеток в мл.

8. Ввести каждой крысе внутрибрюшинно 5×10^7 клеток.

9. Следить за появлением клинических признаков ЭАЭ, которые обычно появляются на 4-6 день после переноса.

Примечания:

1. Все растворы и оборудование, контактирующие с клетками, должны быть стерильными, также должны соблюдаться стерильные условия.

2. Все инкубации культуры клеток выполняются при 37°C, 5% CO_2, если не указано иное.

<u>Оценка пролиферативной активности Т-клеток</u> *(Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease // Current Protocols in Immunology. 1996).*

Анализ пролиферации Т клеток полезен для оценки иммуногенности эпитопов ОБМ морской свинки и кросс-реактивности Т клеток, примированных различными антигенами центральной нервной системы. В анализе, описанном здесь, Т клетки были выделены негативной селекцией из лимфоузлов крыс, примированных ОБМ и культивировались с облученными тимоцитами с разными концентрациями ОБМ. Пролиферацию Т клеток количественно определяли по включению [^{3}H]тимидина.

Методика.

1. Извлечь тимус сингенных крыс и приготовить суспензию клеток в RPMI-5/25mMHEPES. Облучить тимоциты при 2000 рад, довести до концентрации 1×10^7 клеток/мл в RPMI-5/HEPES (содержание HEPES 25 mM) и хранить на льду. Клетки тимуса используют как источник антиген-презентирующих клеток.

2. Выделить лимфоциты из подколенных лимфоузлов 2-4 крыс, ранее иммунизированных ОБМ/ПАФ и приготовить суспензию клеток в растворе Хенкса, лизировать эритроциты. Количество выделенных клеток должно составлять $1–2 \times 10^8$

3. Центрифугировать при 470g, 15 мин.

4. Слить надосадок и ресуспендировать клетки в RPMI-5/HEPES. Профильтровать через стерильный 100-мкм нейлоновый фильтр в 50 мл коническую центрифужную пробирку. Довести объем до 50 мл RPMI-5/HEPES, определить жизнеспособность клеток с трипановым синим.

5. Перелить суспензию клеток в 175-см^2 культуральный флакон, промыть пробирку 50 мл RPMI-5/HEPES и слить во флакон. Инкубировать 1ч для удаления клеточных агрегатов. Концентрация клеток во флаконе не должна превышать 5×10^6 клеток/мл.

6. Перелить суспензию из флакона в 50мл пробирки, пробыть флакон 50мл RPMI-5/HEPES и слить в пробирку. Все пробирки центрифугировать при 470g, 15 мин.

7. Слить надосадок, объединить содержимое трех пробирок и определить жизнеспособность клеток.

8. Выделить Т клетки, пропустив $1.0–1.5 \times 10^8$ клеток через колонку для обогащения Т клеток. Т клетки проходят через колонку, В клетки остаются на колонке. Используют колонку для обогащения Т клеток крысы, емкостью $1.0–1.5 \times 10^8$ клеток. Также могут быть использованы другие методы для выделения Т клеток (иммуномагнитное разделение).

9. Ресуспендировать Т клетки в 15мл стерильного ЗФР, определить жизнеспособность, центрифугировать при 470g, 15 мин.

10. Слить надосадок и ресуспендировать клетки в RPMI-5/HEPES до концентрации 1×10^7 жизнеспособных клеток/мл.

11. Приготовить стоковый раствор ОБМ морской свинки в растворе Хенкса (100мкг/мл) . Раствор антигена будет составлять половину объема каждой лунки, поэтому он готовиться в концентрации 2х.

12. Профильтровать раствор ОБМ через 0.2-мкм фильтры.

13. Приготовить серийные разведения раствора ОБМ в растворе Хенкса. Оптимальный пролиферативный ответ обычно наблюдается в диапазоне концентраций ОБМ 5-50мкгмл. Разведенный ОБМ может храниться до 1 месяца при −20°C.

14 . В каждую лунку 96-луночного планшета для культуры клеток добавить по 50мкл Т-клеточной суспензии (пункт 10). В контроле вместо суспензии клеток внести 50 мкл RPMI-5/HEPES. Каждый образец должен быть нанесен в трех экземплярах.

15. Добавить по 50 мкл суспензии тимоцитов в каждую лунку. В контроле вместо тимоцитов внести 50 мкл RPMI-5/HEPES.

16. Добавить по 100 мкл раствора ОБМ морской свинки в соответствующие лунки. В контроле внести 100мкл раствора Хенкса. Инкубировать 72 часа.

16. В каждую лунку добавить 0.5 мкCi [^{3}H] тимидина в 20мкл RPMI-5/HEPES. Инкубировать 18 часов. 25 мкCi/ml [^{3}H] тимидин (6.7 Ci/ммоль).

17. Собрать клетки и определить поглощение [^{3}H] тимидина на сцинтилляционном счетчике. Вместо этого метода может быть использован МТТ тест для определения синтеза ДНК.

Примечания:

1. Все растворы и оборудование, контактирующие с клетками, должны быть стерильными, также должны соблюдаться стерильные условия.

2. Все инкубации культуры клеток выполняются при 37°C, 5% CO_2, если не указано иное.

5.2. Экспериментальная аутоиммунная гемолитическая анемия у мышей.

Аутоиммунная гемолитическая анемия (АГА) у мышей является моделью АГА человека – патологической иммунной реакции против собственных эритроцитов. У человека ее провоцируют некоторые инфекции. При АГА человека различают внесосудистый и внутрисосудистый иммунный гемолиз. Эффекторами внесосудистого иммунного гемолиза являются макрофаги, внутрисосудистого – антитела. Макрофаги разрушают нагруженные антителами (IgG1, IgG3) эритроциты. Частичный фагоцитоз эритроцитов приводит к появлению микросфероцитов – отличительная особенность внесосудистого гемолиза. Антитела, вызывающие внесосудистый гемолиз называют тепловыми, поскольку они наиболее

эффективно связывают эритроциты (обычно Rh антигены) при 37 ^{0}C. Эффекторами внутрисосудистого гемолиза являются IgM. Фиксация комплемента приводит к разрушению эритроцитов. Эти антитела называют холодовыми, поскольку они наиболее эффективно связываются с эритроцитами при 4 ^{0}C.

У мышей АГА вызывают иммунизацией эритроцитами крыс (ЭК). Используют линию CBA. АГА у мышей носит транзиторный характер, проявляется продукцией аутоантител против ЭМ и снижением количества эритроцитов в крови почти в 2 раза (рис. 6).

Продукция аутоантител против эритроцитов в модели АГА у мышей происходит не по причине активации аутореактивных лимфоцитов эритроцитами крыс несущими похожие с эритроцитами мыши детерминанты. Аутоантитела к эритроцитам и антитела к ЭК являются продуктами разных клонов лимфоцитов. Антигенраспознающие рецепторы лимфоцитов против ЭМ и лимфоцитов, специфичных к ЭК, комплементарны, а лимфоциты к ЭМ и лимфоциты против ЭК связанны в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях (рис. 5). Лимфоциты против ЭК в норме контролируют активность антиэритроцитарных аутоклонов. Механизмом индукции аутореактивных лимфоцитов против эритроцитов является нарушение равновесия в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях между аутоклонами против эритроцитов и антиидиотипическими лимфоцитами специфичными к ЭК при активации последних антигеном.

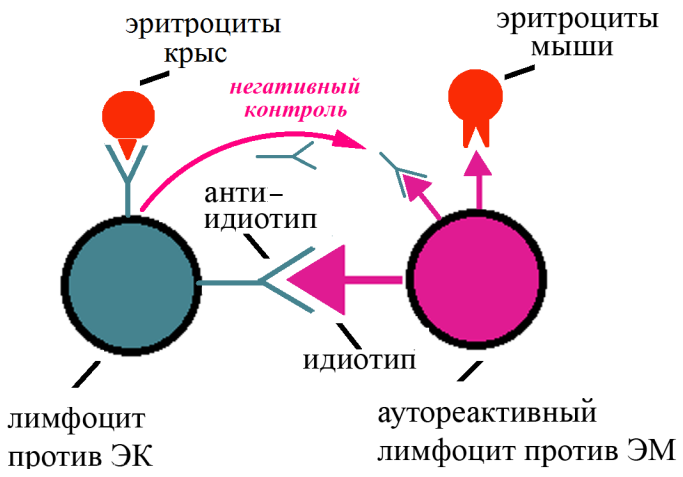


Рисунок 5. Схема регуляции аутореактивных лимфоцитов против эритроцитов антиидиотипическими лимфоцитами.

Выведены линии экспериментальных животных, у которых наблюдается спонтанная АГА. У New Zealand Black (NZB) мышей развивается спонтанная аутоиммунная гемолитическая анемия между 2-4 месяцем жизни. В этот период у них обнаруживаются антитела к различным аутоантигенам – эритроцитам, ДНК, ядерным антигенам, Т-лимфоцитам.

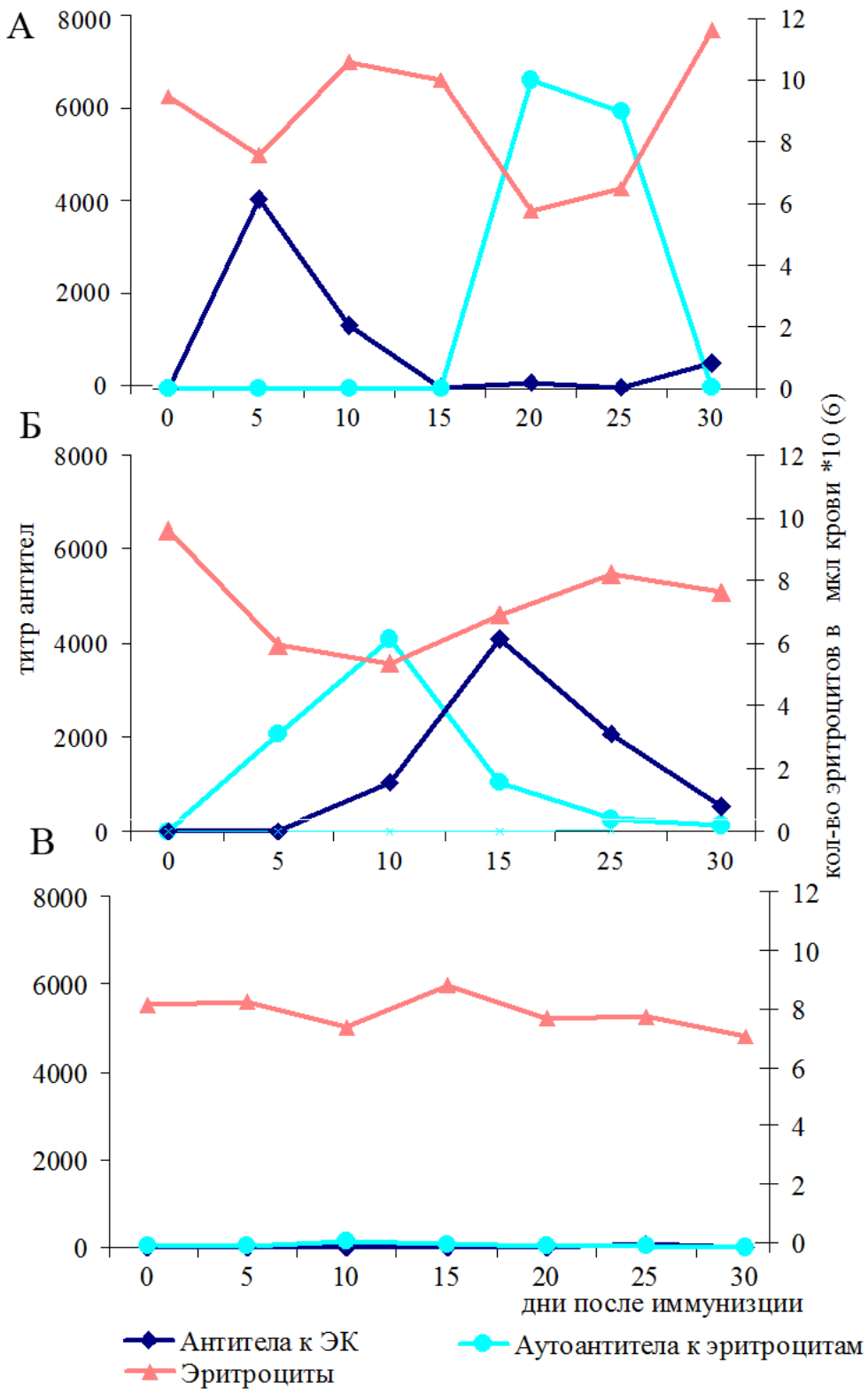


Рисунок 6. Кинетика продукции аутоантител к эритроцитам, антител против эритроцитов крыс и уровень эритроцитов в крови у мышей в модели АГА. А. АГА, вызванная иммунизацией ЭК в дозе 4,5 *108. Б. АГА, вызванная иммунизацией ЭК в дозе $2,9*10^8$. В. Иммунизация аутоэритроцитами.

Условия индукции АГА у мышей.

Для индукции АГА у мышей достаточно одной внутрибрюшинной инъекции ЭК в интервале доз от $2*10^8$ до $5*10^8$. Иногда используют трехкратное предъявление ЭК в той же дозе с интервалом в 1 день. Иммунизация аутоэритроцитами не вызывает АГА (рис. 6 В).

Наблюдение клинических признаков АГА у мышей.

В зависимости от дозы ЭК, использованных для иммунизации, максимальное снижение количества эритроцитов в крови может наблюдаться на 10 день после иммунизации (при использовании относительно невысокой дозы ЭК – $2,9*10^8$), рис. 6Б или на 20-25 день (в ответ на иммунизацию относительно высокой дозой $4,5 *10^8$), рис. 6А.

Методика.

1. Мышей лини СВА иммунизируют свежими ЭК внутрибрюшинно в физиологическом растворе, в дозе $2,8 *10^8$ клеток, в объеме 0,5 мл.
2. Кровь для анализа у мышей забирают через каждые 5 дней с ЭДТА. Количество эритроцитов в крови мыши подсчитывают по стандартной методике. Для этого кровь разводят в 2000 раз.
3. Антитела к ЭК определяют методом прямой гемагглютинации. Для этого сыворотку мыши прогревают при 56 ^{0}С для инактивации комплемента. Сыворотку титруют. Вносят в лунки по 50 мкл. Затем добавляют равный объем 0,5 % суспензию эритроцитов крысы. Инкубируют при комнатной температуре. Результат реакции учитывают через 24 часа.
4. Свободные аутоантитела к эритроцитам мышей (ЭМ) определяют в реакции непрямой гемагглютинации (тест Кумбса). Исследуемую сыворотку прогревают при 56 ^{0}С 30 мин для инактивации комплемента. Сыворотку титруют. Эритроциты интактных мышей (2% суспензия, 50 мкл на лунку) инкубируют с исследуемой сывороткой в разведениях 60 мин при 37 ^{0}С. Отмывают при 180 g. Осторожно ресуспендируют эритроциты в 50 мкл физ. раствора. Добавляют к каждой пробе 100 мкл антисыворотки кролика, содержащей антитела против IgG мыши (ЗАО “Биосан” Новосибирск).

Инкубируют при 4 ^{0}С 24 часа. Следует учитывать, что антисыворотка против IgG мыши может спонтанно взаимодействовать с интактными эритроцитами мыши. В этом случае нужно определить титр антисыворотки против IgG при котором не наблюдается спонтанной агглютинации, но сыворотка сохраняет способность агглютинировать эритроциты, содержащие неполные антитела.

5. Определение идиотип-антиидиотипических взаимосвязей между аутоантителами и антителами к ЭК проводят в реакции торможения гемагглютинации. В качестве тест-системы используют эритроциты крысы и антисыворотку к ним, полученную у мышей на максимуме образования антител к крысиным эритроцитам. Для этого 60 мкл сыворотки против ЭК в разведениях инкубируют с 60 мкл цельной плазмы, полученной на максимуме образования аутоантител к эритроцитам в течение 30 минут. Далее к смеси антисывороток добавляют 120 мкл 0,5 % суспензии ЭК. Реакцию учитывают через 24 часа. Наблюдают торможение гемагглютинации (снижение титра антител к эритроцитам крыс).

5.3. Экспериментально вызванный артрит крыс.

Артриты человека отличаются разнообразием этиологии, аутоантигенов-мишеней, эффекторных механизмов. Известно несколько нозологических форм артрита человека. Это находит отражение в разнообразии экспериментальных моделей артрита. Наиболее распространенными моделями артрита являются коллаген-индуцированный артрит (КИА) и адъювантный артрит (АА) крыс.

Коллаген-индуцированный артрит крыс является моделью ревматоидного артрита человека. КИА у крыс вызывают введением нативного гетерологичного коллагена II типа (бычьего, цыплячьего, человеческого) в составе неполного адъюванта Фрейнда. Мишенью для аутоиммунной атаки при КИА является коллаген II типа. При КИА ведущая роль в реализации эффекторных реакций принадлежит аутоантителам к коллагену.

Модель адъювантного артрита крыс первоначально рассматривалась как модель ревматоидного артрита. В настоящее время модель АА считается более адекватной реактивному артриту. Адъювантный артрит вызывают у

чувствительных линий крыс подкожной инъекцией полного адъюванта Фрейнда (ПАФ). У некоторых линий крыс (DA крыс) артритогенной является внутрикожная инъекция неполного адъюванта Фрейнда (НАФ) – минерального масла (Kleinau S., 1991). Также для индукции АА используют пристан – один из компонентов масляных адъювантов. При АА агрессивная аутоиммунная реакция развивается против протеогликанов хрящей. Эффекторные реакции при АА опосредованы Т-лимфоцитами.

Условия индукции коллаген-индуцированного артрита у крыс.

Для индукции КИА важна конформация коллагена II типа. Коллаген II типа, используемый для иммунизации, должен быть нативным. Денатурированный коллаген II типа, так же как CB пептид коллагена II типа, вызывают иммунный ответ, но артрит не возникает. Обязательным является внутрикожное введение БК, подкожно введенный БК не вызывает артрит. Для индукции КИА не требуется ПАФ, коллаген вводят в составе НАФ. Для моделирования КИА используют только молодых животных, возрастом 7-8 недель. Самки и самцы в равной степени чувствительны к индукции КИА.

Для моделирования КИА используют крыс линии Lewis. Лучшей считаются BB крысы (линия крыс, спонтанно развивающих аутоиммунный диабет I типа). КИА можно вызвать у крыс стока Wistar. Однако чувствительность крыс Wistar к развитию артрита сильно варьирует. Чувствительность к развитию артрита зависит не только от генетических особенностей. Внутри линии или стока на чувствительность влияет патогенная и непатогенная кишечная микрофлора, диета. Повысить процент артритных животных при иммунизации коллагеном можно, добавляя при иммунизации адъювант мурамил дипептид (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate (MDP)) (Koga T, 1980).

Важную роль в обеспечении устойчивости к КИА выполняет ревматоидный фактор (РФ). Его продукция в течение первых двух недель после иммунизации БК предотвращает развитие артрита у крыс. Низкий уровень РФ на 7-14 день после иммунизации служит предиктором манифестации

экспериментального артрита. Ревматоидный фактор реализует регуляторную функцию в отношении клонов специфичных к БК и аутоклонов к собственному коллагену через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с данными лимфоцитами (Beduleva L., 2010). Можно предполагать, что причиной развития экспериментального артрита является дисфункция РФ-продуцирующих лимфоцитов.

Условия индукции адъювантного артрита *(Chondrex.com).*

Для индукции АА используют 5-10 мг Mycobacterium tuberculosis в 1 мл минерального масла и вводят животному в объеме 0,05-0,1 мл в основание хвоста или подушечку задней лапы. Нет необходимости эмульгировать адъювант с физиологическим раствором. Фирма Chondrex предоставляет различные типы адъювантов для индукции АА. Факторы окружающей среды оказывают существенное влияние на чувствительность к развитию АА. Например, безмикробные и SPF F344 крысы высокочувствительны к АА и развивают тяжелый артрит, тогда как артрит у конвенциональных F344 крыс менее тяжелый и частота возникновения около 20%. Доза, вид Mycobacterium, тип масла, используемых для приготовления адъюванта, условия содержания животных влияют на чувствительность животных к развитию артрита. К ПАФ вызванному артриту чувствительны Wistar-Lewis, Sprague-Dawley (SD), Wistar, Buffalo (BUF), Dark Agouti, F344 крысы. Мыши в основном не чувствительны к АА.

Наблюдение клинических признаков КИА и АА.

Клинические проявления КИА и АА у крыс, возникают с 14-28 день после премирования и выражаются в виде острого воспаления одной или нескольких конечностей (покраснение, гиперемия, увеличение в размерах) (рис. 7), ограничения подвижности животного. Проявления усиливаются в течение 2-3 недель - вовлекаются ранее не поврежденные суставы и лапы, далее проявления ослабевают. Возможно спонтанное усиление. Для количественной оценки повреждений используют измерение объема лап по объему

вытесняемой жидкости. Также для количественной оценки тяжести воспаления лап используют шкалу:

0 - Слабая, но заметная припухлость лодыжки или запястья

1 - Умеренное покраснение и припухлость запястья или лодыжки

2 - Сильное покраснение и припухлость всей лапы

3 - Максимальное воспаление конечности с вовлечение множества суставов.

Воспалительный процесс ослабевает спонтанно, однако у большинства животных суставы остаются поврежденными. Артрит может сопровождаться увеитом, уретритом.

Рисунок 7. Артрит у крысы.

<u>Индукция КИА у крыс.</u>

Методика.

1. Для индукции КИА крыс иммунизируют под легкой анестезией (эфирный наркоз) бычьим коллагеном II типа (Elastin) в 0,1 М уксусной кислоте с НАФ (Difco). Коллаген смешивают с охлажденным НАФ в равных объемах, эмульгируют на льду и быстро вводят животным однократно, в/к в заднюю часть спины и основание хвоста в 4-6 точек по 400 мкг белка на крысу.
2. Чтобы повысить процент артритных крыс можно использовать адъювант синтетический мурамил дипетид (MDP). Для этого 4-8 мг/мл MDP растворяют

в дистиллированной воде и смешивают с равным объемом раствора коллагена. Раствор коллаген-MDP смешивают с равным объемом НАФ. Одной крысе необходимо ввести 0,1-0,2 мг MDP (Chondrex.com). Более высокие дозы ~0,8 мг могут самостоятельно вызвать артрит.

3. Кровь забирают 1 раз в неделю, из сердца в объеме 1 мл с цитратом (100 мкл на 1 мл) под анестезией. Плазма немедленно собирается и анализируется.

<u>Выделение коллагена из хрящей крыс.</u>

Методика.

1. Хрящ из крупных суставов крыс отделяют от других тканей, гомогенизируют.

2. Порошок хряща отмывают от протеогликанов 20 объемами 0,05 М Tris/2M $MgC1_2$, pH 7,4, при 4°С. Затем отмывают дважды дистиллированной водой.

3. К осадку добавляют 0,5 М уксусную кислоту с pH 2,5, (pH доводят муравьиной кислотой). Предварительно в уксусную кислоту добавляют пепсин (1г/50 г веса ткани). Коллаген экстрагируют 72 часа при 4 ^{0}С при непрерывном перемешивании.

<u>Определение антител к БК и КК методом ИФА.</u>

Методика.

1. Бычий или крысиный коллаген II типа в ЗФР (pH 7,2) в концентрации 50 мкг/мл сорбируют в лунки планшета по 50 мкл в течение ночи при 4 ^{0}С. Планшет промывают ЗФР с твином-20 (0,5 мл твина-20 на 1 л ЗФР) 3 раза.

2. Для блокирования неспецифического связывания вторых антител добавляют 150 мкл на лунку 0,1-0,05 % раствора БСА в ЗФР с твином-20 (предварительно раствор белка профильтровать), инкубируют 1 час при комнатной температуре (23-25 ^{0}С). Промывают 3 раза ЗФР с твином-20.

3. В лунки вносят исследуемую антисыворотку по 100 мкл на лунку в разведении 1:10, 1:100 и далее с шагом 2. Сыворотку разводят ЗФР с твином-20. Инкубируют 1 час при комнатной температуре (23-25 ^{0}С). Отмывают 3 раза ЗФР с твином-20.

4. Добавляют антивидовые антитела по 100 мкл на лунку, разведенные в соответствии с инструкцией ЗФР с твином-20. Инкубируют при комнатной температуре 1 час. Отмывают ЗФР с твином-20 трижды.

5. Добавляют субстратную смесь (на 5 мл цитратного буферного раствора, (pH 5,0), 3 мг ОФД, 15 мкл 3% перекиси водорода) по 100 мкл на лунку. Цитратный буфер готовят следующим образом. 5,5 мл раствора Na_2HPO_4*12 H_2O (0,2 моль/л) смешивают с 5 мл раствора лимонной кислоты (0,1 моль/л) и 10 мл воды. Все компоненты субстратной смеси смешивают непосредственно перед добавлением в лунки. Инкубируют 10-15 мин в фольге в темноте. Реакцию останавливают серной кислотой. Фотометрируют при 492 нм.

Контроль. 1. Антиген, ЗФР вместо первых антител, антивидовые антитела.

Контроль 2. Субстратная смесь в пустой лунке.

<u>Определение РФ в реакции агглютинации эритроцитов, нагруженных IgG крысы.</u>

Методика.

1. Эритроциты фиксируют глутаровым альдегидом. Для этого трижды отмытый физ.раствором осадок эритроцитов человека группы О, охлаждают до 0 ^{0}С на водяной бане. 25% глутаровый альдегид разводят до 1% раствором следующего состава: 1 часть 0,15 М Na_2HPO_4 с pH 8,2, 9 частей 0,15 М NaCl и 5 частей дистиллированной воды, охлаждают на ледяной бане. Разводят осадок эритроцитов 1% глутаровым альдегидом до 1-2 % суспензии, инкубируют 30 мин при 0 ^{0}С при периодическом перемешивании (фиксация). Фиксированные эритроциты отмывают 4 раза физ. раствором и 1 раз водой при 1000 об/мин по 5 мин.

2. Отмытые фиксированные эритроциты (10% в ЗФР с pH 7,2) смешивают с равным объемом раствора танина (3 мг на 10 мл ЗФР). Инкубируют 10 мин при комнатной температуре, трижды отмывают ЗФР. Для сенсибилизации смешивают 4 мл фосфатного буфера (pH 6,4), 1,5 мл раствора IgG крысы (Sigma) в 0,15 М ЗФР (pH 7,2) с концентрацией 0,5 мг/мл и 70 мкл плотного

осадка танизированных эритроцитов. Инкубируют 20 мин при комнатной температуре, трижды отмывают ЗФР с 0,2 % БСА.

3. Для постановки реакции исследуемую сыворотку титруют ЗФР с шагом 2 и вносят по 50 мкл в лунки. Добавляют равный объемом 1,5 % суспензии эритроцитов, нагруженных IgG крысы в ЗФР. В контроле вместо исследуемой сыворотки вносят ЗФР. Инкубируют при 37 ^{0}С. Реакцию агглютинации учитывают через 3 часа.

5.4. Экспериментально вызванный атеросклероз.

Согласно определению ВОЗ атеросклероз - вариабельная комбинация изменений внутренней оболочки артерий (интимы), включающей накопление липидов, сложных углеводов, фиброзной ткани, компонентов крови, кальцификацию и сопутствующие изменения средней оболочки (медии). Американская кардиологическая ассоциации (American Heart Association) рекомендует следующую классификацию атеросклеротических поражений.

Таблица 4.

Термины, используемые для обозначения различных типов атеросклеротических поражений (Stary et al., 1994; Stary et al., 1995)

Термины для атеросклеротических повреждений в гистологической классификации		**Другие термины для тех же поражений, основанные на проявлениях, видимых не вооруженным глазом**	
I тип пора жений	начальные поражения (небольшие изолированные группы макрофагов, содержащих липидные капли (пенистые клетки))		ранние повреждения
IIa тип	поражения, склонные к прогрессии (слои пенистых клеток, расположенные в местах с адаптивным утолщением интимы; небольшое количество внеклеточных липидов)	жировые точки или полоски	
IIb тип	поражения, устойчивые к прогрессии (пенистые клетки, расположенные в местах без адаптивного утолщения интимы)		
III тип пора жений	промежуточные поражения (преатерома) (характеризуются значительными скоплениями липидов во внеклеточном пространстве, которые локализуются в местах, склонных к прогрессии)		
IV тип пора жений	атерома (обширные скопления внеклеточных липидов, образующих липидное ядро)	атероматоз ные (атеросклер отические) бляшки	
Va тип пора жений	фиброатерома (V тип поражения). (характеризуется формированием новой фиброзной соединительной ткани, фиброзная ткань является частью липидного ядра)	фиброли пидная бляшка	
Vb	кальцифицированные поражения (VII тип поражений) (липидное ядро и другие части поражений кальцифицированы)	кальцифи цированная бляшка	продвинутые поражения
Vc	фиброзное поражение (VIII тип поражений) (отсутствие липидного ядра, либо небольшое количество липидов)	фиброзная бляшка	рельефные поражения
VI тип пора жений	поражения с: поверхностными дефектами VIa гематомами-кровоизлияниями VIb тромботическими массами VIc	осложнен ное поражение, осложнен ная бляшка	

Несмотря на то, что патоморфологические аспекты формирования атеросклеротической бляшки хорошо известны, инициирующий фактор патогенетических событий и механизм, приводящие к ее развитию, до конца неизвестны. Традиционно возникновение атеросклеротических поражений

объясняют развитием гиперхолестеринемии. Однако почему возникает гиперхолестеринемия и является ли она причиной атеросклеротических изменений стенки сосудов остается ключевым нерешенным вопросом.

Анализ традиционных экспериментальных моделей атеросклероза показал, что не существует универсальной адекватной модели, которая бы адекватно воспроизводила признаки атеросклероза человека. Возможная причина - недостаточное понимание этиологии и механизма развития атеросклероза у человека и как следствие отсутствие адекватного (воспроизводящего истинную причину болезни) подхода при моделировании атеросклероза. Способ моделирования атеросклероза у экспериментальных животных, с помощью которого удастся воспроизвести признаки атеросклероза человека, позволит получить представления о механизмах индукции и развитии данного заболевания.

В настоящее время используют несколько способов индукции у экспериментальных животных изменений, имитирующих атеросклеротические поражения, наблюдаемые у человека:

1) **предъявление гиперхолестериновой диеты;**

2) **модификация генов рецепторов липопротеинов или генов аполипопротеинов**;

3) **комбинация 1 и 2 подхода;**

4) **иммунизация, ведущая к развитию аутоиммунной реакции против нативных ЛПНП.**

Для оценки атеросклеротических поражений у экспериментальных животных проводят:

- анализ поперечных срезов аорты на уровне синусов. Срезы аорты, приготовленные на криостате и окрашенные суданом IV или масляным красным О позволяют выявить скопления клеток, нагруженных липидами.

- метод «en face», который позволяет количественно оценить область атеросклеротических поражений и представить ее как процент от общей площади аорты. Для этого делают продольный разрез аорты от корня до

подвздошных артерий (до бифуркации аорты), окрашивают суданом (IV или III) и оценивают область повреждения (Meir, 2004; Ma et al., 2012).

Диет-индуцированный атеросклероз.

Атеросклероз, вызванный предъявлением холестериновой диеты, - распространенный способ моделирования атеросклероза, основанный на представлениях о том, что причиной атеросклероза может служить избыточное потребление холестерина, приводящее к увеличению его уровня в крови. В 1908 году А. И. Игнатовский получил у кроликов сходные с атеросклерозом человека поражения аорты путем кормления их животной пищей (яйцами, мясом, молоком). В 1912 Н.Н. Аничков и С.С. Халатов сообщили о создании экспериментальной холестериновой модели атеросклероза. При кормлении кроликов кристаллическим холестерином им удалось получить изменения в интиме артерий, которые были похожи на атеросклероз человека.

Моделью диет-индуцированного атеросклероза чаще всего служат новозеландские белые кролики (NZW). Кролики, не развивают спонтанного атеросклероза, но чрезвычайно чувствительны к диете, богатой липидами (Hadjiisky et al.,1991). Кролики могут развивать гиперхолестеринемию в течение нескольких дней нахождения на диете с высоким содержанием холестерина (Yanni, 2004). Известны различные схемы индукции атеросклеротических повреждений с помощью диеты (таблица 5), но, как правило, кроликов кормят в течение 4-16 недель диетой, содержащей 0,5-2% холестерина. Более высокий уровень холестерина в диете способствует высокой смертности животных. Нормальный уровень плазменного холестерина у белых новозеландских кроликов составляет 1,3 ммоль/л. В течение первых 20 дней содержания кроликов на диете обогащенной холестерином, уровень плазменного холестерина увеличивается от 2 до 8 раз (Hadjiisky et al.,1991). Поражения в виде пенистых клеток встречаются преимущественно в дуге аорты и восходящей аорте, но в конечном итоге распространяется на всю аорту (Drew, 2001). Некоторые исследователи полагают, что индуцированные поражения больше напоминают ксантоматоз чем атеросклероз (Hadjiisky et al.,1991).

Замечена связь между возрастом кроликов и характером вызываемых диетой атеросклеротических изменений. Например, у 3-4,5 летних кроликов удается выявить фиброзные бляшки, у молодых животных (4 мес) бляшки, как правило, не обнаруживаются (Dornas et al., 2010).

Таблица 5.

Примеры диет, используемых в мышиных моделях атеросклероза (Getz, Reardon, 2006)

Диета	**Состав**	**Модель**
Диета Пайген (Paigen diet)	1,25% холестерин, 0,5% холевая кислота, 15% какао-масло, 1% кукурузное масло	C57BL/6 и C3H
Диета Пайген (без холата)	15,8% жир, 1,25% холестерин	LDLR-/ -
Полусинтетическая диета с высоким содержанием жира (AIN-76a)	17,4% какао-масло, 2,8% соевое масло, 0–1,25% холестерин, 0–0,5% холат.	LDLR(-/-)
Полусинтетическая диета с низким содержанием жира	1,9% какао-масло, 2,4% соевое масло, 0%–0,5% холестерин	LDLR(-/-)
Диета западного типа (Western type diet)	21% молочный жир, 0,2% холестерин (0.15% добавлено, 0.05% из молочного жира)	LDLR(-/-), ApoE (-/-), также другие модели
Модифицированная диета западного типа	18% молочный жира, 0,25% холестерин	LDLR(-/-)
Модифицированная диета западного типа без холестерина	16% молочный жир, 5% сало, 0% добавленный холестерина	LDLR(-/-)
Полусинтетическая диета с альтернативными источниками жира	18,5% жир из различных растительных источников, 0,2% холестерин	LDLR(-/-), ApoE (-/-)
Полусинтетическая диета с низким содержанием жира/холестерина и альтернативными источниками жира	4% жир из различных источников, 0,005% холестерин	LDLR (-/-), apoB100 tg
Полусинтетическая диета с альтернативными источниками белка	10% оливковое масло, 0%–1% холестерин, 20% казеин или соевый протеин, 0%–0.25% холат	apoE (-/-) and LDLR (-/-)
Диета с пальмовым маслом	10 % пальмовое масло, 0,1 % холестерин	LDLR (-/-), apoA-I(-/-)

Адекватность атеросклероза, вызванного высокохолестериновой диетой.

Модель диет-индуцированного атеросклероза у кроликов обнаруживает ряд существенных недостатков. Во-первых, холестериновая диета – экстремальное воздействие для кроликов, как травоядных животных, имеющих в обмене липопротеинов существенные отличия от такового у человека (Drew, 2001). Во-вторых, нагрузка липидами, уровень гиперлипидемии, требуемые для возникновения поражений у кролика, чрезмерны. Диет-индуцированный атеросклероз у всеядных крыс или мышей мог бы быть более адекватной моделью атеросклероза человека. Однако крысы и мыши устойчивы к развитию атеросклероза с помощью атерогенной диеты, что наводит на мысль о неадекватности использования такого подхода для индукции атеросклероза и ставит под сомнение представление об избыточном потреблении холестерина как причине развития атеросклероза у человека. Роль избыточного потребления холестерина в развитии атеросклероза в последнее время не поддерживается и результатами клинических исследований, показавших, что пищевой холестерин не влияет на уровень плазменного холестерина, на соотношение ЛПНП/ЛПВП и не вносит существенного вклада в развитие атеросклероза и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (Ravnskov, 2002, McNamara, 2000).

Мыши, несущие модифицированные гены рецепторов липопротеинов или аполипопротеинов.

Генетические модели атеросклероза (таблица 6) являются наиболее широко используемыми. Модификация генов в первом случае вызывает дефицит рецепторов липопротеинов низкой плотности, во втором - дефицит аполипопротеина Е. Как дефицит рецепторов ЛПНП на клетках, так и дефицит аполипопротеина Е - белка ЛПНП, который в норме служит высокоаффинным лигандом для рецепторов ЛПНП, нарушает поступление холестерина из ЛПНП плазмы в клетки. В результате, в плазме возникает избыток холестерина, а в тканях его недостаток. Особенно сильно страдают от дефицита холестерина клетки и ткани, которые сами почти не синтезируют холестерин и используют

преимущественно холестерин липопротеинов плазмы, такие как ткани надпочечников, лимфоциты. Возникающий в плазме избыток холестерина – гиперхолестеринемия традиционно рассматривается как причина атеросклеротических изменений. На основании современных данных можно предполагать, что ключевую роль в развитии атеросклеротических изменений играет не избыток холестерина в плазме, а его недостаток в коре надпочечников.

Одной из базовых генетических моделей атеросклероза являются ApoE (-/-) мыши (Apo-E-KO) - линия нокаутных мышей, разработанная в 1992 году. ApoE (-/-) мыши были получены путем инактивации гена аполипопротеина Е, которая была достигнута введением в мышиные эмбриональные стволовые клетки вектора (плазмиды), содержащего ген устойчивости к неомицину, который заменил часть гена ApoE и нарушил его структуру. Клетки, имеющие нарушение в гене ApoE, вводили в бластоцисты мышей линий C57BL/6J или BALB/C. Химерные мыши передавали нарушение гена ApoE своему потомству. При скрещивании гетерозиготных мышей были получены гомозиготные по нарушенному гену мыши.

Таблица 6.

Фенотип генетических мышиных моделей атеросклероза (Getz, Reardon, 2006)

Модель	**Диета**	**Общий холестерин (мг/дл)**	**Преобладающий тип липопротеинов**	**Фенотип поражений**
ApoE(-/-)	chow	600	ЛПОНП, ЛППП	широко распространен
LDLR(-/-) Apobec-1(-/-)	chow	400-650	ЛПНП	широко распространен, комплексный
ApoB tg LDLR(-/-)	chow	800	ЛПНП (умерено ЛПОНП)	широко распространен, продвинутый
LDLR(-/-)	chow	200-300	ЛПНП	очень умеренный
ApoE(-/-)	диета западного типа	1300-2000	ЛПОНП, ЛППП	широко распространен, комплексный
LDLR(-/-) Apobec-1(-/-)	диета западного типа	1600-1750	ЛПОНП, ЛПНП	широко распространен, комплексный
LDLR(-/-)	диета западного типа	1500-2000	ЛПОНП, ЛПНП	широко распространен
LDLR(-/-)	Высокож	1880	ЛПОНП, ЛПНП	широко распространен

	ировая, холат			
ApoB tg	диета Пайген (холат)	310	ЛПНП	широко распространен, жировые прожилки
Дикий тип	диета Пайген (холат)	140-190	ЛПОНП, ЛПВП	незначительный, проксимальная аорта (жировые бляшки)

Аполипопротеин Е (впервые обозначенный как белок богатый аргинином) входит в состав различных классов ЛП плазмы крови человека и животных: ЛПОНП, ЛППП, ЛПВП и остаточных компонентов хиломикронов и обеспечивает связывание всех этих липопротеинов с апопротеин-В,Е-рецепторами, а также с рецепторами апопротеина Е, участвует в транспорте холестерина. В, Е-рецепторы липопротеинов с высокой специфичностью связывают содержащие апоВ ЛП (константа диссоциации 10^{-8} - 10^{-9} М), но в 100 раз активнее - апоЕ ЛП (Brown, 1986). Сродство апопротеин-В,Е-рецепторов к апопротеин-Е-содержащим липопротеидам в 20-25 раз выше, чем к апопротеин-В-содержащим ЛПНП. Поэтому отсутствие гена ApoE приводит к сильному сдвигу плазменных липопротеинов и повышению уровня холестерина в плазме в 5 раз по сравнению с нормальными мышами (Jawien J. et al.,2004).

ApoE (-/-) мыши в короткое время могут развивать спонтанный атеросклероз на стандартной диете с низким содержанием жиров и отсутствием холестерина. Поражения, которые формируются у ApoE (-/-) мышей очень похожи на те, что обнаруживаются у человека. У мышей 5-6 недельного возраста выявляется адгезия моноцитов на поверхности эндотелия, у 6-10 недельных - наблюдается развитие жировых полосок, быстро прогрессирующих в более развитые поражения, которые не однородны, но, как правило, состоят из некротического ядра, окруженного пролиферирующими ГМК (Jawien J). Эти поражения имеют хорошо сформированную фиброзную крышку. Часто поражения локализуются в дуге аорты и в точках ветвления сосудов. Поражения, содержащие пенистые клетки и ГМК, были замечены в возрасте 15

недель, фиброзные бляшки появляются в возрасте 20 недель. У старых мышей обнаруживаются очаги кальцификации. В отличие от человека у ApoE дефицитных мышей не наблюдается разрыва бляшки.

В связи с быстрым развитием атеросклероза модель ApoE дефицитных мышей широко используется при изучении атеросклероза, несмотря на значительные ограничения. Основной недостаток модели – очень высокие уровни холестерина в плазме, неадекватные таковым при атеросклерозе человека. Например, на стандартной диете концентрации холестерина в плазме составляет около 8 ммоль/л, по сравнению с 2 ммоль/л у C57BL/6 мышей и может достигать > 70 ммоль/л на диете с высоким содержанием жиров.

Другая базовая модель генетически обусловленного атеросклероза - LDLR(-/-) мыши (LDLR-KO) - мыши с дефицитом рецепторов для ЛПНП - линия нокаутных мышей – модель семейной гиперхолестеринемии. Рецептор для ЛПНП - это мембранный белок, который обеспечивает поступление ЛПНП в клетку, и тем самым участвует в регуляции уровня холестерина в плазме. Его лигандами являются аполипопротеины B100 и E. Дефицит рецепторов для ЛПНП приводит к повышению в крови уровня холестерина ЛПНП и ЛПОНП и дефициту холестерина в зависимых тканях. Линия была создана в 1993 году Ishibashi et al.((Jawien J, 2004). Эти мыши имеют более умеренные липидные аномалии, чем ApoE - дефицитные мыши. На стандартной диете (chow diet) (жир 4-6%, холестерин<0.02%) уровень общего холестерина достигает 5 ммоль/л, при этом атеросклеротические изменения развиваются очень медленно или не развиваются вообще. LDLR (-/-) мыши очень чувствительны к диете с высоким содержанием жира и холестерина, на которой у них развивается гиперхолестеринемия (более 25 ммоль/л) и атеросклероз. Например, в исследовании Ma et al. LDLR (-/-) мыши содержались на высокохолестериновой диете (21% жира, 0,15% холестерина, 7% казеина, 7% сахарозы, 3% мальтодекстрина) от 0,5 до 12 месяцев, при этом удалось проследить распределение атеросклеротических поражений в зависимости от времени нахождения на данной диете. Было показано, что через

3 месяца содержания на высокожировой диете повреждения выявляются в синусе аорты, дуге аорты и в безымянной артерии, через 6 месяцев поражения обнаруживаются в грудном отделе аорты, а через 9 – в брюшном. Изменения варьировали от жировых полосок до сложных поражений с некротическим ядром и кристаллами холестерина. При этом у контрольных мышей, находящихся на стандартном рационе, наблюдались значительные индивидуальные различия. Например, у некоторых мышей поражения в дуге аорты обнаруживались через 3 месяца, а у некоторых и через 12 месяцев не наблюдалось развития атеросклеротических изменений. В целом, LDLR (-/-) мыши представляют собой более умеренную модель атеросклероза, чем ApoE (-/ -) мыши, в основном из-за более мягкой степени гиперлипидемии.

Адекватность генетических моделей атеросклероза.

Генетические модели атеросклероза адекватно воспроизводят генетически обусловленный атеросклероз человека, вызванный нарушениями обмена липопротеинов, имеющими генетическую природу, например, семейную гиперхолестеринемию, а также являются хорошим инструментом для изучения метаболизма липидов. Однако генетически обусловленный атеросклероз, как любое генетическое заболевание, редко встречается. Распространенность гомозиготной формы семейной гиперхолестеринемии в человеческой популяции составляет $1:10^6$ и приводит к тяжелым заболеваниям сердца в возрасте до 20 лет, тогда как атеросклероз у большей части больных развивается в пожилом возрасте. Частота встречаемости гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии, вызванной отсутствием или дефектом рецептора для ЛПНП, выше и составляет 1:500 человек. Однако только 5% всех больных с острым инфарктом миокарда в возрасте до 60 лет имеют генетическую причину - гетерозиготную форму семейной гиперхолестеринемии (Crowther, 2005). Поэтому генетически обусловленная гиперлипидемия у мышей не может рассматриваться как адекватная модель атеросклероза человека.

Атеросклероз у крыс, вызванный иммунизацией нативными липопротеинами низкой плотности человека.

Иммунизация нативными ЛПНП человека в неполном адъюванте Фрейнда вызывает у крыс Wistar атеросклероз. Данная модель была разработана недавно и основана на представлении, что атеросклероз – аутоиммунное заболевание, при котором мишенью для аутоиммунной атаки являются нативные ЛПНП (нЛПНП). Предполагается, что вызванная иммунизацией, продукция аутоантитела против нЛПНП инициирует каскад событий, ведущих к атеросклеротическим изменениям стенки сосудов (рисунок 8).

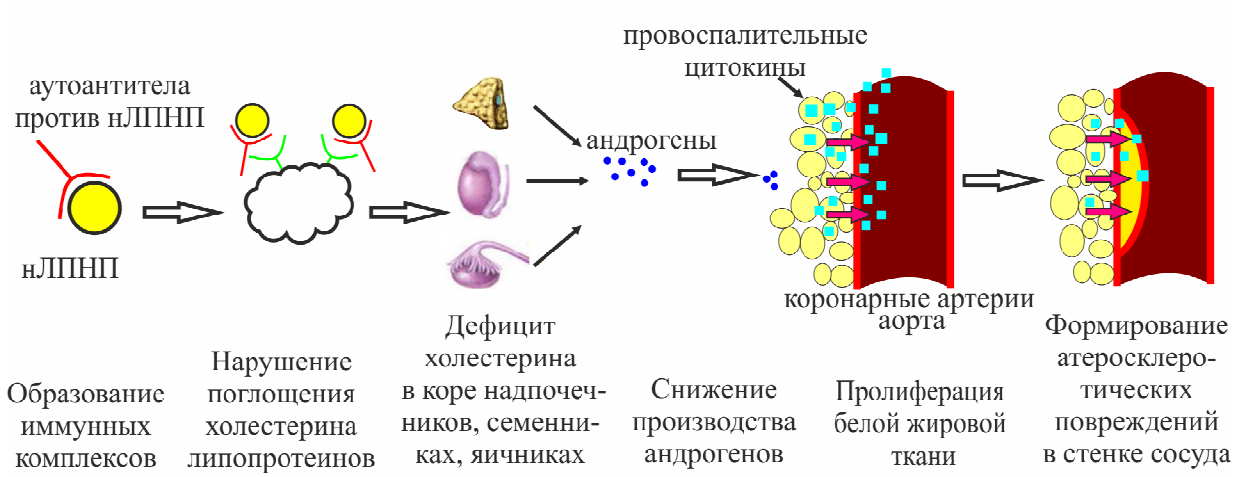


Рисунок 8. Каскад, запускаемый аутоантителами против нЛПНП, ведущий к развитию атеросклеротических изменений в стенке сосудов. Гипотетическая схема.

Предполагается, что аутоантитела против нЛПНП, связываясь с нЛПНП плазмы крови, нарушают взаимодействие плазменных ЛПНП с клетками, имеющими рецепторы к ЛПНП. Вследствие этого возникает дефицит холестерина в клетках, которые получают его в основном из ЛПНП плазмы, таких как клетки коры надпочечников, мононуклеары крови. У крыс, развивших атеросклероз в ответ на иммунизацию нЛПНП, в надпочечниках достоверно ниже уровень общего холестерина, главным образом за счет этерифицированного холестерина, что свидетельствует о недоступности холестерина ЛПНП для обмена с тканями надпочечников.

Известно, что надпочечники у большинства видов животных и человека используют холестерин липопротеинов плазмы для стероидогенеза (Grummer R.R., 1988). Поэтому нарушение нормального поглощения холестерина из липопротеинов плазмы может привести к снижению производства андрогенов в коре надпочечников. Клинические и эпидемиологические исследования показали, что низкий уровень дегидроэпиандростерона – одного из основных андрогенов, выделяемых надпочечниками как у мужчин, так и женщин, ассоциирован с ишемической болезнью сердца, эндотелиальной дисфункцией, атеросклерозом (Traish A.M., 2011). Недавно показано, что андрогенная недостаточность индуцирует пролиферацию белой жировой ткани (Mammi C., 2011). Вызванная дефицитом андрогенов пролиферация белой жировой ткани усиливается под действием выделяемого ею лептина, который подавляет производство андрогенов и замыкает патологический круг, приводя к еще более интенсивному росту белой жировой ткани. Согласно недавно проведенным исследованиям Verhagen S.N., Visseren F.L., белая жировая ткань, непосредственно окружающая артерии, имеет провоспалительные свойства и стимулирует атерогенез в сосудистой стенке «снаружи внутрь». Ключевым аргументом в пользу причинной связи между жировой периваскулярной тканью и атеросклерозом является то, что сегменты коронарных артерий, свободные от эпикардиального жира или отделенные от него тканью миокарда, защищены от развития атеросклероза.

Условия индукции атеросклероза у крыс иммунизацией нативными ЛПНП.

Для иммунизации используют крыс Wistar возрастом 8-10 недель. Самцы и самки в равной степени чувствительны к атеросклерозу. Для развития признаков атеросклероза требуется длительное время, поэтому гистологические и морфологические исследования проводят через 16-20 недель после иммунизации. Степень выраженности атеросклеротических повреждений варьирует.

Необходимым условием индукции атеросклероза у крыс является использование нативных ЛПНП, т.е. ЛПНП, имеющих физико-химические, антигенные и биологические свойства, которыми они обладают в организме. Нативные ЛПНП в настоящее время производят фирмы Sigma и Kalen Biomedical. Технология выделения и хранения ЛПНП, производимых данными фирмами, включает использование в качестве источника ЛПНП свежей плазмы, добавление ЭДТА для предотвращения их окисления, хранение в ампуле под азотом и поэтому предполагают сохранение нативности ЛПНП. По данным указанных производителей нативные свойства ЛПНП сохраняются в закрытой ампуле в течение 10 недель. Через 2-3 недели после вскрытия ампулы образец ЛПНП становится гетерогенен по составу – содержит ЛПНП разной степени окисленности. Поэтому для иммунизации и определения аутоантител к ЛПНП лучше использовать липопротеины из только что вскрытой ампулы. Но даже в этом случае необходимо проверить нативность используемых ЛПНП. Общепринятым критерием нативности ЛПНП является низкая электрофоретическая подвижность в агарозном геле (рис. 9).

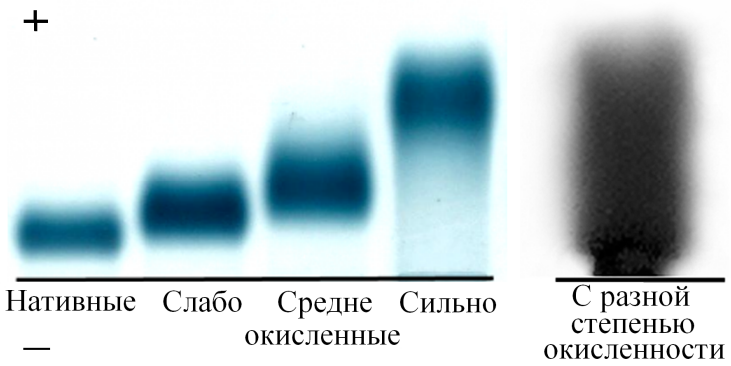


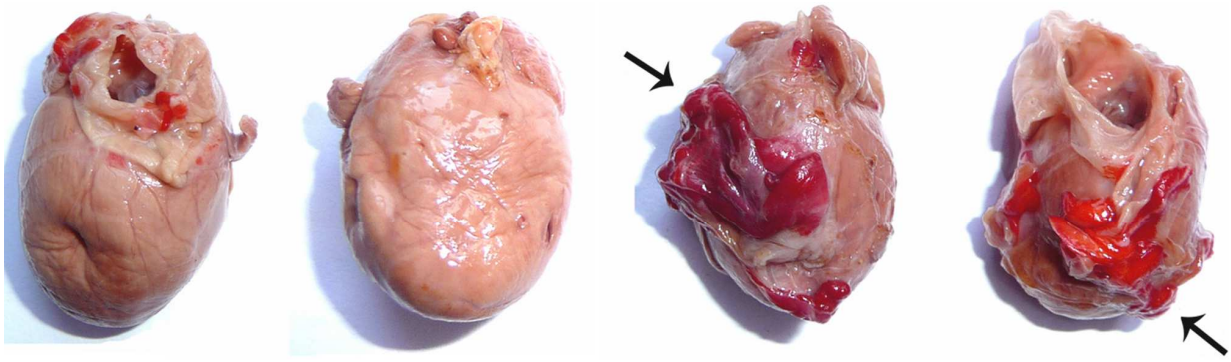
Рисунок 9. Электрофореграмма нативных ЛПНП и ЛПНП с разной степенью окисленности. Данные с сайта фирмы Kalen Biomedical: http://www.kalenbiomed.com).

Модифицированные (окисленные) ЛПНП, вследствие приобретения избыточного отрицательного заряда обладают более высокой подвижностью в агарозе, которая прямо коррелирует со степенью окисленности ЛПНП (рис. 9).

Наблюдение признаков атеросклероза

У крыс, иммунизированных нативными ЛПНП человека, обнаруживаются следующие признаки атеросклероза:

1. высокий уровень аутоантител к нативным ЛПНП;
2. дислипопротеинемия;
3. увеличение объема эпикардиального (рис. 10) и периваскулярного жира (рис. 11);
4. гистологические изменения в стенке сосудов: отложения липидов в гладкомышечных клетках (рис. 12), скопления лейкоцитов в интиме и между медиа и адвентицией (рис. 14 А, Б, В), структурные нарушения интима-медиа комплекса (рис. 14 Г, Д, Е).



сердце крыс, получивших инъекцию НАФ

сердце крыс, иммунизированных нЛПНП человека

Рисунок 10. Эпикардиальный жир у крыс, иммунизированных нЛПНП человека. Примечание: эпикардиальный жир у человека окружает крупные коронарные ртерии, а также располагается на поверхности желудочков и верхушке сердца. Сегменты коронарных артерий, отделенные от эпикардиального жира тканью миокарда защищены, от развития атеросклероза.

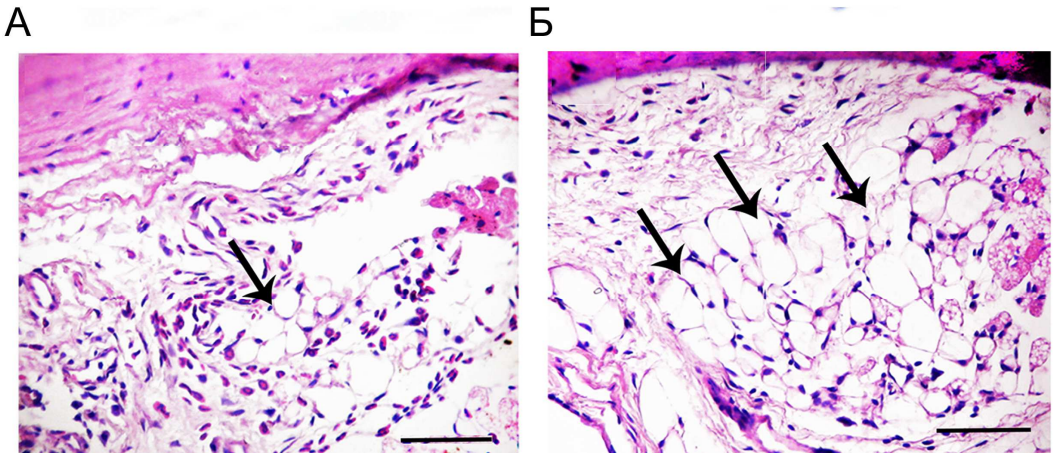


Рисунок 11. Периваскулярная жировая ткань. А. Крысы, получившие инъекцию НАФ. Б. Крысы, иммунизированные нЛПНП человека.

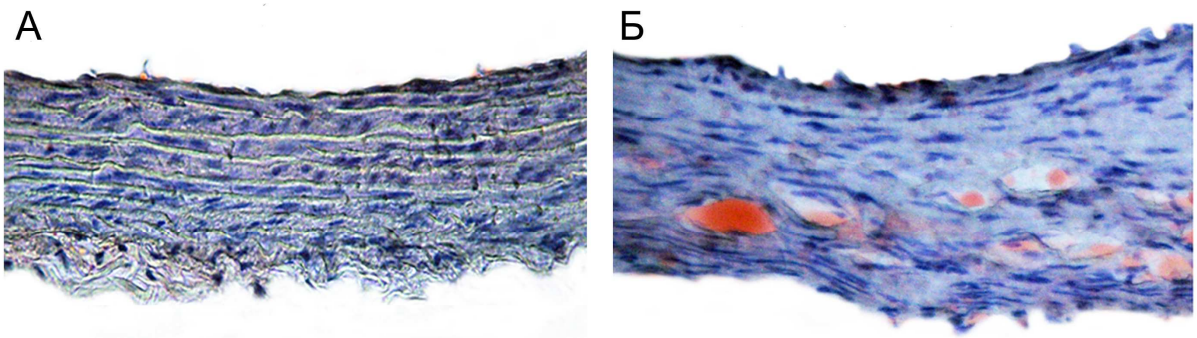


Рисунок 12. Липиды в стенке аорты. А. Крысы, получившие инъекцию НАФ. Б. Крысы, иммунизированные нЛПНП человека. Срезы окрашены суданом.

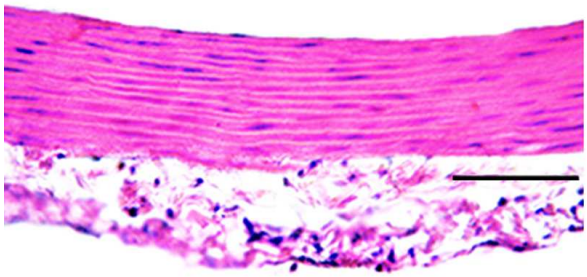


Рисунок 13. Стенка аорты крыс, получивших 20 недель назад инъекцию НАФ. Соответствует норме. Окрашена гематоксилином-эозином. Интима аорты крыс представлена в виде единственного эндотелиального слоя, который плотно прилегает к внутренней эластической мембране; медиа аорты состоит из нескольких слоев мышечных клеток и экстрацеллюлярного коллагенового матрикса, разделенного эластиновыми пластинками; адвентиция аорты представлена соединительной и жировой тканью.

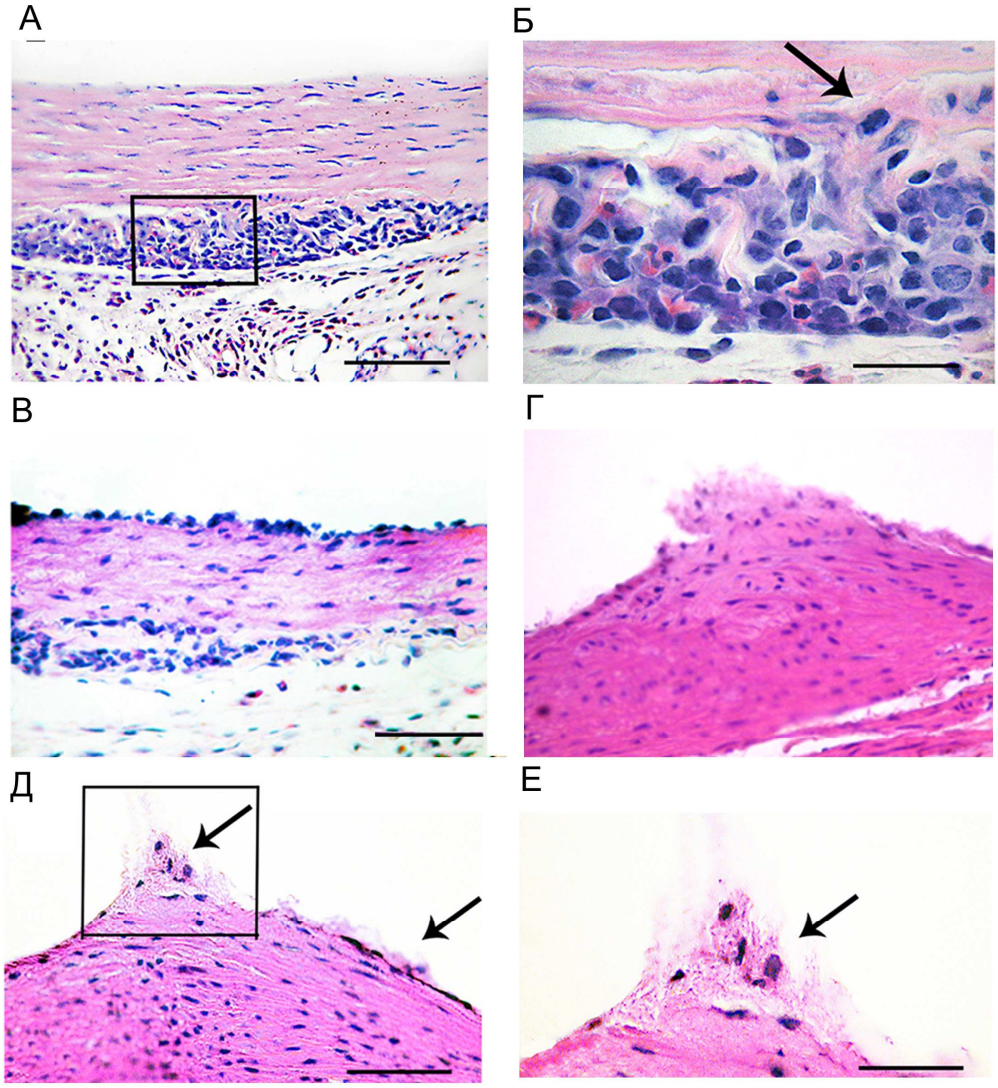


Рисунок 14. Изменение в стенке аорты крыс, иммунизированных нЛПНП человека. А, Б: Аккумуляция лейкоцитов между медиа и адвентицией. В: Лейкоциты в интиме и между медиа и адвентицией. Г, Д, Е: Участки полной деградации интимы, утолщении, вспучивание и обнажение медиа. Elastic lamina не определяется. Окраска гематоксилином-эозином.

Адекватность модели атеросклероза крыс, вызванного иммунизацией нативными ЛПНП.

Сравнительный анализ морфофункциональных изменений, выявленных у больных атеросклерозом людей и крыс, иммунизированных нЛПНП человека, представлен в таблице 7.

Таблица 7

Изменения, наблюдаемые у больных атеросклерозом людей, и крыс, иммунизированных нЛПНП человека

Изменения, характерные для атеросклероза человека	**Наличие изменений у крыс, иммунизированных нЛПНП человека**	**Предполагаемая роль в патогенезе атеросклероза**
Высокий уровень аутоантител против нативных ЛПНП (Меньшиков, 2010)	+++	Вызывает недостаток холестерина в тканях, зависящих от холестерина липопротеинов плазмы, (надпочечники, лимфоциты)
Сравнимый со здоровыми уровень аутоантител против окисленных ЛПНП (Меньшиков, 2010)	+++	Не известна. Возможно, не участвуют в патогенезе атеросклероза
Дислипопротеинемия	+++	Традиционно рассматривается как причина развития атеросклеротических изменений в стенке сосуда. Однако может быть не более маркером развивающегося аутоиммунного процесса против нЛПНП
Эпикардиальный жир	+++	Источник провоспалительных цитокинов, инициирующих атеросклеротические изменения в стенке сосудов «снаружи внутрь»
Увеличенный объем периваскулярного жира	+++	
Скопление лейкоцитов в стенке аорты	+++	Формирование очага воспаления в стенке сосуда
Липидные отложения в стенке аорты	+++	
Бляшка	В ходе 20 недель наблюдения, прошедших после иммунизации нЛПНП человека, не выявлена.	

<u>Индукции атеросклероза у крыс иммунизацией нативными ЛПНП человека.</u>

Методика.

1. К коммерческому препарату нЛПНП человека (Sigma или Kalen Biomedical) концентрацией 5 мг/мл добавляют равный объем стерильного физиологического раствора.

2. Полученный раствор ЛПНП смешивают в равных соотношениях с неполным адъювантом Фрейнда, эмульгируют.

3. Крыс иммунизируют внутрикожно в заднюю часть спины 160 мкл эмульсии, содержащей 200 мкг нЛПНП человека.

4. Контрольным животным вводят 160 мкл эмульсии, состоящей из НАФ и физиологического раствора (1:1).

<u>Определение нативности ЛПНП человека, используемых для иммунизации и определения антител</u>

Нативность липопротеинов определяют по электрофоретической подвижности в агарозном геле. Электрофоретическая подвижность ЛПНП прямо пропорционально зависит от степени их окисленности (рис. 9). Нативные ЛПНП имеют низкую подвижность, располагаются компактно на старте.

Методика.

1. Обезжиренное стекло помещают на горизонтальную плоскость. На поверхность стекла наносят 1% агарозный гель, который должен равномерно распределиться по поверхности стекла и после затвердения образовать однородный слой. Чтобы приготовить 1%-ный агарозный гель в химический стакан наливают 200 мл рабочего раствора трис-барбиталового буферного раствора (pH 8,6) и при постоянном перемешивании добавляют 2 г агарозы. Стакан с содержимым помещают в кипящую водяную баню и выдерживают до полного расплавления агарозы. Расплавленная агароза должна быть прозрачной. Для получения концентрированного трис-барбиталового буферного раствора (pH 8,6) 11,2 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты (веронал, барбитал), 22,15 г трис(гидроксиметил)аминометана (трис) растворяют в 0,5 л дистиллированной воды, контролируют pH (при необходимости доводят до 8,6). Концентрированный буферный раствор разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:4.

2. Формируют лунки в слое геля, в которые помещают несколько мкл исследуемого образца.

3. Электрофорез проводят при силе тока I=120mA, напряжении U=100V, в течение 1 -1,5 ч.

4. ЛПНП окрашивали суданом черным.

<u>Определение уровня антител против нЛПНП методом ИФА.</u>

Методика.

1. нЛПНП человека 10 мкг/мл в объеме 50 мкл сорбируют в течение 12 часов при 4 ^{0}С в ЗФР pH 8,5. Планшет промывают ЗФР (pH 7,4) с твином-20 (0,5 мл на 1 л) 3 раза.

2. В лунки вносят по 100 мкл исследуемой сыворотки в последовательном разведении. Инкубируют 3 часа при температуре 52^{0}С. Отмывают 3 раза ЗФР с твином-20.

3. Комплекс ЛПНП-антитело регистрируют с помощью конъюгата поликлональных антител кролика против IgG, IgM, IgA крысы, меченных пероксидазой хрена («ИМТЕК»). Для этого инкубируют 1 час при комнатной температуре. Отмывают 3 раза ЗФР с твином-20.

4. Для проявления ферментативной активности конъюгата добавляют свежеприготовленную субстратную смесь в объеме 100 мкл на лунку. Состав субстратной смеси: 5 мл цитратного буферного раствора, (pH 5,0), 3 мг ОФД, 3% перекись 15 мкл. Инкубируют 10-15 минут в темноте. Реакцию останавливают 2 М раствором серной кислоты, добавляя кислоту в объеме 50 мкл на лунку. Оптическую плотность измеряют при λ=492 нм. Титр определяют как максимальное разведение сыворотки, при котором оптическая плотность больше чем в контроле.

<u>Гистологическое исследование материала (Саркисов, 1996).</u>

Гистологическое исследование включает взятие материала, его фиксацию, обезвоживание, заливку в парафин или другие среды, приготовление и окраску срезов.

<u>Взятия материала с предварительной перфузионной фиксацией.</u>

Структура ткани хорошо сохраняется, если ее фиксация начинается еще до взятия материала. Сохранность структуры клеток обеспечивает

перфузионная фиксация.

Методика.

1. Для проведения перфузионной фиксации (перфузии) крысу подвергают глубокой анестезии, например диэтиловым эфиров. Не следует допускать смерть животного от передозировки эфиром, желательно начинать проводить процедуру прижизненно, чтобы уменьшить время после смерти животного и взятием материала.

2. Наркотизированную крысу кладут спиной на предметный столик, фиксируют конечности. Смоченным водой ватным тампоном увлажняют шерсть в области живота. Левой рукой приподнимают кожу и срезают ножницами лоскут шириной 1-1,5 см и длиной 5-7 см. Далее делают надрез под мечевидным хрящом грудины, вскрывая одновременно грудную и брюшную полости. Проводят разрезы (слева и справа) по бокам грудной клетки косо вверх, перерезая ребра. Накладывают зажим на мечевидный хрящ, отгибают грудину в сторону головы и фиксируют, иссекают диафрагму, перикард, обнажая органы грудной полости.

3. Инсулиновым шприцом вводят раствор гепарина (0,15-0,2 мкл) в полость левого желудочка. Для оттока крови и жидкости ножницами надрезают ушко правого предсердия.

4. Иглой, соединенной с перфузионной системой прокалывают стенку левого желудочка. Сначала кровеносную систему промывают теплым (37С°) физиологическим раствором (30 мл), далее начинают перфузионную фиксацию раствором иммунофикс (или другим фиксатором) (30 мл). Все растворы вводят медленно, следя за тем, чтобы в системе не было пузырьков воздуха. О том, что перфузия проходит правильно свидетельствует подергивание мышц животного при введении фиксатора.

5. После проведения перфузии у животного извлекают сердце и сосуды (аорту). Аорту легко отличить от трубчатых органов, расположенных рядом - пищевода и трахеи, по ее дуге, от которой отходят три артерии –

плечеголовной ствол, левая общая сонная артерия и левая подключичная артерия (рис. 15).

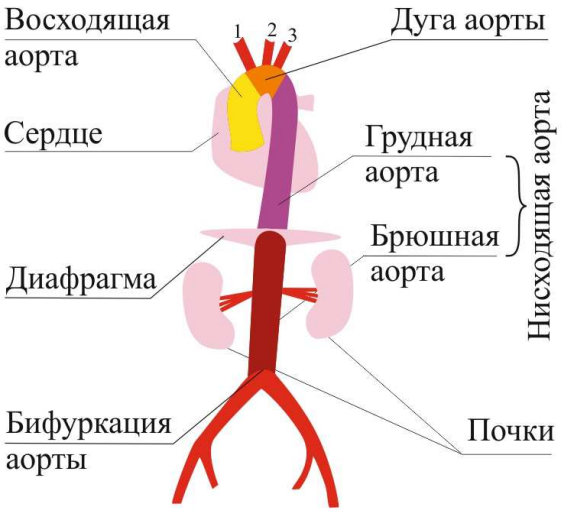


Рисунок 15. Отделы аорты. 1. плечеголовной ствол, 2. левая общая сонная артерия, 3. левая подключичная артерия.

<u>Окраска сердца на липиды суданом III (модифицированная методика Holman) (Godfried et al., 1989).</u>

Для выявления эпикардиального жира сердце окрашивают на липиды суданом III.

Методика.

Порядок окраски:

1. 70 % этиловый спирт 15 мин.
2. Красящий раствор 20 мин.

(0,5 % раствор судана III в 35% спирт – 50% ацетоновой смеси)

3. 85% этиловый спирт 20 мин.
4. Проточная вода 1 час.

Окрашенное сердце можно хранить в фиксирующем растворе (иммунофикс).

Судан III окрашивает липиды в интенсивно оранжево-красный цвет.

Данную методику можно применять для окраски аорты «en face» (Ma et al., 2012).

<u>Заливка образца в парафин и приготовление срезов.</u>

Методика.

1. После перфузии извлеченный материал (сосуд, фрагменты сердца) подвергают дофиксации в растворе иммунофикс при 4 °С в течение ночи. Объем раствора должен примерно в 20 раз превышать объем образца, это правило справедливо для всех последующих процедур – отмывки и обезвоживания.

2. Образец отмывают от фиксатора в нескольких сменах забуференного физиологического раствора.

3. Обезвоживание в спиртах восходящей концентрации:

70 % *	1 час
90 %	1 час
100 %.	1 час

**Примечание: Если нет возможности провести обезвоживание и заливку в парафин в один день, то можно оставить образец на ночь в 70% спирте при 4 °С, а на следующий день продолжить обезвоживание образца.*

4. Заливка в парафин:

этиловый спирт 100%+ хлороформ (1:1)	1 час
хлороформ	1 час
хлороформ+ парафин (1:1-"каша")	1 час (55 °С)*
парафин 1 порция	1-2 часа (55°С)
парафин 2 порция	1-2 часа (55°С)
парафин 3 порция	1-2 часа (55°С)

**Примечание: После этого этапа частично пропитанный парафином образец можно либо оставить на ночь при комнатной температуре, либо закончить заливку в парафин.*

5. На заключительном этапе образец подогретым в термостате пинцетом вносят в форму (коробочку из фольги или бумаги), правильно его ориентируют, заливают 3 порцией парафина до самых краев формы, следя за тем, чтобы не образовывалось пузырьков воздуха, и оставляют при комнатной температуре до полного остывания парафина. При остывании парафина, на поверхности формирующегося блока образуется углубление, это может привести к обнажению образца, поэтому размер формы должен быть достаточным, чтобы образец со всех сторон был окружен достаточным слоем парафина. Чтобы

предотвратить неравномерное застывание парафина, все манипуляции с образцом на данном этапе лучше проводить в термостате.

6. После окончательного остывания парафина, блок с образцом извлекают из формы, срезают лишний парафин, таким образом, чтобы образец ткани со всех сторон, был окружен слоем парафина, толщиной 3-5 мм, закрепляют готовый парафиновый блок с тканью в держателе микротома. Для этого над спиртовкой слегка нагревают шляпку держателя и наклеивают на нее парафиновый блок.

7. С помощью микротома готовят срезы, толщиной 3-7 мкм. Срезы снимают с блока тонкой кистью, собирают в коробку или сразу монтируют на предметные стекла, предварительно обработанные желатином и хромо-калиевыми квасцами. Для этого срез аккуратно переносят с помощью кисти в каплю воды на предметном стекле, оставляя с правого края стекла место для надписи. На одно предметное стекло можно поместить 8-10 срезов.

8. Срезы, помещенные на предметное стекло высушивают на приборе для сушки и расправления срезов в течение 12 часов.

Приготовление абсолютного (100%) спирта (Саркисов, 1996)

Методика.

Абсолютный спирт готовят из 96 % спирта. Для этого используют сульфат меди, который помещают в ступку и прокаливают в термостате, периодически растирая и помешивая до консистенции пыли и бледно-голубого цвета. Сульфат меди (1 часть) засыпают в банку с 96% спиртом (4-6 частей), плотно закрывают, взбалтывают и оставляют на несколько дней, периодически встряхивая. Сульфат меди адсорбирует воду из спирта и вновь приобретает синюю окраску. Проверить качество абсолютного спирта можно прилив каплю приготовленного спирта к 4-5 мл ксилола (раствор мутнеет, если спирт недостаточно обезвожен).

Приготовление клея для стекол.

Методика.

Потребуется:

400 мл дистиллированной воды

2 грамма желатина (измельчить в ступке)

0,2 грамма хромо-калиевых квасцов

Воду нагревают до температуры 50-55°С, добавляют желатин, размешивают до полного растворения желатина, добавляют квасцы.

Приготовленный раствор фильтруют, остужают.

Стекла помещают в держатель и погружают в емкость с клеем. После этого стекла вынимают из держателя и высушивают 2 часа на воздухе в наклонном положении, предохраняя от пыли. После высыхания клея процедуру повторяют еще раз.

<u>Окраска парафиновых срезов гематоксилином-эозином.</u>

Методика.

Данный способ окраски дает хорошее представление о морфологии ткани. Перед окраской необходимо провести депарафинирование среза. Для этого предметное стекло помещают в ксилол (или другой растворитель парафина – толуол, бензол) Для освобождения от ксилола препарат проводят через этиловый спирт понижающейся крепости.

ксилол	2 мин
спирт 100%	2 мин
спирт 90%	2 мин
спирт 70%	2 мин
вода	2 мин

Порядок окраски гематоксилином-эозином:

Гематоксилин, например, гематоксилин Гарриса*	1-2 мин**
Вода	5 мин
Эозин (0,1% водный раствор)	1-1,5 мин**
Вода	5 мин
спирт этиловый 70%	1 мин
спирт этиловый 90%	1 мин
спирт этиловый100%	1 мин
ксилол	1 мин

**Примечание: точное время нахождения препарата в красителях подбирают опытным путем, проводя контроль среза под микроскопом.

Результат окраски: ядра синие, цитоплазма – розовая.

Подготовленные таким образом срезы можно заключать в специальные смолы, например канадский бальзам. Для этого на срез стеклянной палочкой наносят 1-2 капли бальзама, ребром покровного стекла касаются бальзама и осторожно опускают покровное стекло на срез ткани, избегая образования пузырей воздуха, аккуратно прижимают покровное стекло пальцем. Препарат в течение ночи высушивают на гистологической печке.

∗ Можно использовать готовый коммерческий краситель либо приготовить гематоксилин Гарриса самостоятельно.

Приготовление гематоксилина Гарриса (Саркисов,1996).

раствор 1	
Гематоксилин кристаллический	5 г
Спирт этиловый 96%	50 мл
раствор 2	
Алюмокалиевые квасцы	100 г
Дистиллированная вода	1000 мл

Смешивают растворы 1 и 2, затем добавляют 60 мл глицерина и 2,5 г оксида ртути (желтой или красной). Раствор нагревают до 100°С, остужают, фильтруют. Перед использованием к 100 мл раствора добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты.

<u>Приготовление замороженных срезов и окраска на липиды.</u>

Для выявления отложений липидов в стенке сосуда готовят срезы на криостате и окрашивают их суданом.

Методика.

1. После проведения перфузии образцы сосудов дофиксируют в растворе иммунофикс при 4°С в течение ночи.
2. Образец отмывают от фиксатора в нескольких сменах забуференного физиологического раствора.
3. Образец помещают в раствор 10% сахарозы и оставляют на сутки при 4°С, это предотвратить образование кристаллов льда в ткани при ее замораживании. Затем образцы помещают в специальные формы, правильно ориентируют (при исследовании сосуда необходимо получить его поперечные

срезы), заливают в Tissue-Tek, замораживают в криостате и готовят срезы, толщиной 12-14 мкм. Срезы монтируют на предметные стекла и хранят в морозильной камере.

4. Срезы окрашивают суданом III (Волкова, Елецкий, 1982). Для этого готовят спиртовой раствор судана III. В 100 мл горячего 70% спирта засыпают 0,2-0,3 г порошка судана III, несколько раз взбалтывают и ставят в термостат (58°С) на несколько часов, затем охлаждают и фильтруют.

Порядок окраски:

Вода	10-15 сек
50% спирт	30-60 сек
3% спиртовой раствор судана III	15-30 минут
50 % спирт	10 сек
Вода	промыть
Гематоксилин Эрлиха или (Гарриса)	1-2 мин
Вода	промыть

После этого срезы заключают в глицерин. Для этого пипеткой аккуратно наносят на срез каплю глицерина и накрывают его чистым покровным стеклом.

Результат окраски: липиды – красно-оранжевые, ядра клеток – синие, цитоплазма – бледно-голубая.

Окраску срезов раствором судана III следует проводить в бюксе с закрытой крышкой, в противном случае спирт испаряется, и из насыщенного раствора судан III выпадает в виде осадка, который остается в препарате.