

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.Б.33 ИММУНОЛОГИЯ**

**Направление подготовки (специальность):** 06.03.01 Биология

**Профиль образовательной программы:** Биоэкология

**Форма обучения:** очная

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1.</b>	<b>Конспект лекций</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>Лекция № 1 «Вводная лекция»</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Лекция № 2 «Врожденный иммунитет»</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Лекция № 3 «Классификация инфекционного иммунитета. Антигены»</b>	<b>13</b>
<b>1.4</b>	<b>Лекция № 4 «Органы иммунной системы»</b>	<b>16</b>
<b>1.5</b>	<b>Лекция № 5 «Клетки иммунной системы»</b>	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>Лекция № 6 «Гуморальный иммунитет»</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Лекция № 7 «Клеточный иммунитет, иммунологическая память, иммунологическая толерантность»</b>	<b>27</b>
<b>1.8</b>	<b>Лекция № 8 «Иммунопатологии»</b>	<b>31</b>
<b>1.9</b>	<b>Лекция № 9 «Иммунобиологические препараты»</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>Методические указания по выполнению лабораторных работ</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-1 «Вводное занятие»</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-2 «Механические барьеры. Воспаление»</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-3 «Фагоцитоз. Морфология фагоцитов. Определение фагоцитарного числа и фагоцитарного показателя»</b>	<b>43</b>
<b>2.4</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-4 «Гуморальные факторы врожденного иммунитета. Определение лизоцима в сыворотке крови»</b>	<b>45</b>
<b>2.5</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-5 «Модельные системы в иммунологии. Правила работы с экспериментальными животными. Различные способы введения антигенов животным»</b>	<b>48</b>
<b>2.6</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-6 «Выделение органов иммунной системы из трупов лабораторных животных, подсчет количества Т- и В-лимфоцитов»</b>	<b>52</b>
<b>2.7</b>	<b>Лабораторная работа № 7 «Этапы получения моноклональных антител. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов и цитотоксической активности Т- киллеров и естественных киллеров»</b>	<b>53</b>
<b>2.8</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-8 «Серологические реакции, цели постановки, общая характеристика»</b>	<b>53</b>
<b>2.9</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-9 «Реакции агглютинации (РА)»</b>	<b>57</b>
<b>2.10</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-10 «Реакции преципитации (РП)»</b>	<b>61</b>
<b>2.11</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-11 «Реакция связывания комплемента»</b>	<b>63</b>
<b>2.12</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-12 «Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)»</b>	<b>66</b>
<b>2.13</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-13 «Реакция иммуноферментного анализа (ФА)»</b>	<b>68</b>
<b>2.14</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-14 «Реакция нейтрализации (РН)»</b>	<b>69</b>
<b>2.15-16</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-15-16 «Определение иммунного статуса человека и животных»</b>	<b>70</b>
<b>2.17</b>	<b>Лабораторная работа № ЛР-17 «Знакомство с биопрепаратами»</b>	<b>73</b>

**3. Методические материалы по проведению практических занятий (не предусмотрено РУП)**

**4. Методические материалы по проведению семинарских занятий (не предусмотрено РУП)**

# 1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

## 1. 1 Лекция №1 (2 часа).

**Тема: «Вводная лекция»**

### 1.1.1 Вопросы лекции:

1. Определение иммунологии, цели и задачи.
2. Направления в развитии иммунологии, ее связь с другими дисциплинами.
3. История развития иммунологии.

### 1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1

Латинское слово «immunitas» означает освобождение от чего-либо, неприкосновенность кого-либо. В медицинскую практику термин «иммунитет» вошел во второй половине XIX века и означает «освобождение от болезни».

Под иммунитетом в настоящее время понимают следующее: «Иммунитет – это способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки генетической чужеродности».

Основным предметом исследований в иммунологии является познание механизмов формирования специфического иммунного ответа на все чужеродные в антигенном отношении объекты.

Необходимость такой защиты вытекает из понимания того, что в основе существования любого организма (начиная от самой простой по строению клетки и заканчивая человеком) лежит упорядоченное физико-химическое взаимодействие составляющих этот объект молекул. Причем это взаимодействие определяется имеющейся в этом организме наследственной информацией и является высоко специфическим, поскольку складывался он в ходе длительной эволюции существующих видов. Исходя из этого, во внутреннюю среду организмов из окружающей среды допускаются только те молекулы, присутствие которых не сможет нарушить запрограммированный ход метаболических процессов.

У многоклеточных животных большинство клеток непосредственно с окружающей организм средой не контактируют и эволюционно приспособлены к существованию в относительно постоянных условиях тканевой жидкости, которая и является для них окружающей средой. В этом случае проблема сводится к предотвращению попадания ненужных организму молекул в тканевую жидкость или максимально быстрому их удалению, если проникновение все-таки произошло. Для решения этой проблемы и существует развившаяся в ходе эволюции животных специализированная система органов, клеток и продуцируемых этими клетками молекул, называемая иммунной системой.

Нужно отметить, что дестабилизацию нормального состояния внутренней среды могут вызвать и собственные клетки и молекулы организма, если они изменяются в течение жизни. Учитывая то, что организм млекопитающего, например, взрослого человека, состоит из  $10^{12}$ – $10^{13}$  клеток, причем многие клетки постоянно возобновляются, а частота мутаций конкретных генов колеблется в пределах  $10^{-6}$ – $10^{-12}$ , можно предполагать появление довольно значительного количества генетически измененных клеток. Распознавание и элиминация таких клеток, по всей вероятности, также является задачей иммунной системы (это подтверждает следующее, у больных, получавших иммунодепрессивную терапию, а также у детей, имеющих врожденные дефекты иммунной системы, частота встречаемости злокачественных (раковых) опухолей в десятки и сотни раз выше, чем у здоровых).

Возникновение иммунологии как науки связано с изучением болезней человека не случайно. На заре развития иммунологии главной задачей иммунитета понималась

защита от инфекционных агентов и только много позже, согласно теории Бернета, - поддержание генетического гомеостаза.

За небольшой промежуток времени иммунология достигла огромных успехов, были решены следующие задачи:

- Созданы вакцины против многих опасных болезней (сибирской язвы, чумы, холеры, тифа, бешенства и др.);
- Открыты группы крови, что сделало возможным переливание крови;
- Открыта иммунологическая толерантность, что сделало возможным пересадку органов;
- Разработана серотерапия;
- Разработаны методы диагностики многих инфекционных заболеваний;
- Решена проблема гемолитической болезни новорожденных.

Но впереди у иммунологии стоит решение не менее значимых проблем:

- Профилировать, своевременно диагностировать и лечить онкологические заболевания;
- Разработать вакцинные препараты против еще не побежденных заболеваний;
- Разработать методы эффективного лечения аллергических заболеваний;
- получить эффективные иммунодепрессанты, подавляющие только определенные звенья иммунной системы и др.

## 2. Наименование вопроса №2.

В процессе развития от иммунологии отделились и стали самостоятельными целый ряд наук: клиническая иммунология; трансплантационная иммунология; экологическая иммунология; иммуногенетика.

Иммунология связана теснейшим образом со многими дисциплинами: терапией; акушерством; эпидемиологией; микробиологией; вирусологией; биохимией; генетикой и др.

## 3 Наименование вопроса № 3.

Предпосылками развития иммунологии большинство исследователей считают накопленный человечеством опыт наблюдений за развитием инфекционных заболеваний. С незапамятных времен отмечалось, что в период распространения заразных болезней некоторые из ранее переболевших данной болезнью людей не заболевали вторично. Более того, имеются исторические сведения, что в Древнем Китае (около 590 года до нашей эры), а также в античные времена в Индии применялось заражение людей натуральной оспой с целью сделать их невосприимчивыми в период эпидемий.

Следующим этапом в этом направлении стали эксперименты Эдварда Дженнера (1749–1823). Опираясь на ранее сделанные фермером из окрестностей Дорчестера по имени Бенджамин Джестай наблюдения, согласно которым люди случайно или намеренно заражаемые коровьей оспой в дальнейшем не болели натуральной черной оспой, в 1776–1778 годах Дженнер провел заражение нескольких своих пациентов материалом из оспенных пустул на вымени коров и убедился, что пациенты действительно приобрели иммунитет против натуральной оспы. Результаты своих исследований по вакцинации (название было дано от латинского наименования коров □ vacca) он изложил в статье «Inquiry of 1798», которую представил в Королевское научное общество. Французский император Наполеон приказал провести прививки личному составу своей армии, а первый получивший прививку в России крестьянский мальчик получил в честь этого знаменательного события фамилию Вакцинов.

Но основоположником иммунологии стал французский ученый Луи Пастер (Pasteur, 1822–1895), создавший теорию вакцинопрофилактики. В 1881 году Пастером и его сотрудниками было установлено, что заражение животных длительно выращиваемыми на питательных средах бактериями, вызывающими куриную холеру, не приводит к развитию симптомов заболевания, а делает этих животных устойчивыми к куриной холере. Такого рода ослабление вирулентности болезнетворных микроорганизмов получило название

аттенуации и было применено для создания вакцинных препаратов. Пастер создал вакцины против сибирской язвы, рожи свиней, бешенства.

Эмиль фон Беринг (1854–1917) и Шибасабуро Китасато (1852–1931) продемонстрировали присутствие в крови иммунизируемых столбнячными или дифтерийными бактериями животных специфических белков, названных ими антитоксинами. Введение сывороток крови таких животных интактным, никогда не контактировавшим с возбудителями столбняка или дифтерии организмам, приводило к появлению у последних выраженной устойчивости к данным заболеваниям. Это было первым научным, экспериментально полученным доказательством выработки макроорганизмом специфических веществ в ответ на присутствие болезнетворных микроорганизмов.

В дальнейшем детальным изучением защитных веществ плазмы крови начал активно заниматься немецкий ученый Пауль Эрлих (1854–1915). Подробно исследуя лечебные свойства сывороток иммунных животных, он показал, что:

- 1) антитела (так стали называть открытые Берингом и Китасато антитоксины) относятся к глобулиновой фракции белков плазмы крови;
- 2) они способны передаваться через плаценту из организма матери в организм развивающегося плода;
- 3) выработка антител происходит не только при контакте с болезнетворными микроорганизмами или их токсинами, но и при введении в кровь других органических веществ.

Из исследований Эрлиха вытекало, что основу защиты организма от чужеродных агентов определяют растворенные в плазме крови вещества, и подобного рода воззрения к концу XIX века получили название гуморальной теории иммунитета.

Однако не все занимающиеся проблемой инфекционных заболеваний исследователи придерживались мнения, что защита макроорганизма от инфекции определяется только гуморальными факторами. Начатые в 1882 году исследования русского ученого Ильи Мечникова (1845–1916) указывали на то, что лейкоциты крови млекопитающих способны активно поглощать и уничтожать болезнетворные микроорганизмы в ходе процесса, названного фагоцитозом. Возглавив по предложению Луи Пастера специально созданную для изучения фагоцитоза лабораторию в Пастеровском институте в Париже, Мечников к началу XX века стал основоположником фагоцитарной теории, или теории клеточного иммунитета.

Дальнейшие исследования привели к слиянию формировавшихся направлений, что и нашло отражение в присуждении Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года совместно И.И.Мечникову и Паулю Эрлиху. С этих пор Нобелевские премии традиционно считающиеся показателем значимости для человечества той или иной области науки, стали своеобразным отражением развития иммунологии в XX столетии.

В конце XIX века были заложены основы двух новых направлений, относящихся к так называемой неинфекционной иммунологии. Французский исследователь Шарль Рише (Richet, 1850–1935), изучая влияние токсических веществ морских беспозвоночных на собак, установил, что организм последних способен отвечать на повторное введение небольших доз токсина чрезвычайно бурной, не наблюдавшейся при первоначальном введении препарата реакцией. Он назвал это явление анафилаксией (т. е. «обратной профилактикой»). В опубликованной в 1912 году монографии «Анафилаксия» Рише обобщил результаты своих исследований, из которых следовало, что иммунная система имеет отношение не только к защите от инфекционных болезней. Эта работа была удостоена Нобелевской премии 1913 года. Еще одна ветвь иммунологии зародилась в ходе исследований, имевших непосредственное отношение к защите от инфекционных заболеваний. Изучая в конце XIX века в лаборатории Мечникова в Пастеровском институте механизмы лизиса бактерий под влиянием белков плазмы крови, Жюль Борде

(1870–1961) не только открыл (совместно с Пфейффером) систему комплемента, но и обнаружил, что иммунная система способна реагировать на чужие клетки крови так же, как и на безвредные микроорганизмы. Борде получил Нобелевскую премию 1919 года за исследование комплемента.

Карл Ландштейнер (1868–1943) открыл группы крови человека, за что в 1930 году был также удостоен Нобелевской премии. Помимо огромного медицинского значения, заключавшегося в разработке безопасной системы переливания крови, эта ветвь иммунологии дала доказательства существования различий между конкретными индивидуумами на клеточном уровне и реагирования на эти различия иммунной системы. Это во многом определило развитие иммунологии в XX веке. Фактически проблема отторжения пересаженных тканей и органов становилась проблемой иммунологической и занимавшийся изначально пересадками кожи Питер Брайн Медавэр (1915–1987) получил широкую известность именно как иммунолог. Работы Медавара и сотрудников стали экспериментальным подтверждением опубликованной в 1949 году общей теории иммунитета Фрэнка Макфарлейна Бёрнета (Burnet, 1899–1985), согласно которой иммунная система формируется в процессе эмбрионального развития и именно в этот период организм приобретает иммунную нечувствительность (толерантность) к собственным молекулам и клеткам. За исследование приобретенной иммунологической толерантности оба эти исследователя получили Нобелевскую премию 1960 года.

Продолжением исследований в этом направлении стали работы Джорджа Девиса Снелла (1903–1996). В руководимых им исследованиях было установлено, что у мышей имеется 14 систем генов, определяющих реакции отторжения при пересадках тканей. Одна из таких групп генов, названная H2-система (от англ. *histocompatibility* – тканевая совместимость), оказалась причастной и к развитию других иммунных реакций. Жан Доссе (1916), исследуя антигенные свойства лейкоцитов, обнаружил существование подобных систем генов у человека и назвал их HLA (от англ. *Human Leucocytes Antigens* – человеческие лейкоцитарные антигены). Проведенные в различных лабораториях мира исследования показали аналогичность H2-системы мышей и HLA-системы человека, и утвердилось представление о существовании у всех высших животных подобных генетических систем, получивших общее название «главный комплекс гистосовместимости» или сокращенно МНС (от англ. *Major Histocompatibility Complex*). Исследуя роль входящих в комплекс генов, Барух Бенасерраф (1920) и его коллеги сумели установить причастность продуктов этих генов – специфических поверхностных молекул клеток высших организмов не только к отторжению пересаженных тканей, но и к развитию любых иммунных реакций, в том числе и приводящих к продукции антител. Так утвердилось новое направление в иммунологии, получившее название иммуногенетика, а его основатели Снелл, Доссе и Бенасерраф стали лауреатами Нобелевской премии 1980 года.

В 60-х годах XX века, в основном благодаря работам Родни Портера (1917–1985) и Джеральда Эдельмана (1929) удалось расшифровать молекулярную структуру антител и их антигенсвязывающих центров, за что эти исследователи получили Нобелевскую премию 1972 года.

Обладателями Нобелевской премии 1984 года стали Нильс Эрне (1911–1994), Георг Кёллер (1946–1995) и Цезарь Мильштейн (1927–2002). Премия была получена за создание метода, позволяющего получать суспензии абсолютно одинаковых по специфичности моноклональных антител, применение которых в биологических и медицинских исследованиях оказалось очень высокоэффективным. В то же время прогресс молекулярной биологии позволил Сусуму Tonegawa (1936) показать, как генетические перестройки в хромосомах лейкоцитов обеспечивают фантастически богатое многообразие антител и антигенраспознающих рецепторов, что также было удостоено в 1987 году Нобелевской премии.

Таким образом, формировавшаяся первоначально как чисто прикладная отрасль медицины иммунология за 100 лет превратилась в одну из ведущих современных биологических наук, достижения которой не только позволили найти эффективные способы борьбы с бактериальными и вирусными заболеваниями, но и объяснить в какой-то мере, чем и как определяется индивидуальность на клеточном уровне и как реализуется взаимодействие клеток млекопитающих между собой. Последняя Нобелевская премия XX века за исследования в области иммунологии является своеобразным отражением слияния инфекционной и неинфекционной иммунологии, поскольку присуждена за исследования, описывающие роль конкретных молекул во взаимодействиях клеток иммунной системы в период развития иммунных ответов на антиген. Ее обладателями стали Питер Догерти (1940) и Рольф Цинкернагель (1944), которые доказали участие белков главного комплекса гистосовместимости в представлении чужеродных антигенов иммунокомпетентным клеткам.

Во второй половине XX века произошел переход иммунологии на молекулярный уровень исследования. Основные усилия иммунологов начала XXI века направлены на выяснение механизмов регуляции деятельности иммунокомпетентных клеток и конкретной роли образуемых этими клетками молекул в ходе реализации такой защиты.

Выдающиеся иммунологи России: Л.С.Ценковский (1822—1887), профессор Харьковского университета, получил эффективную сибиреязвенную вакцину; организовал в Харькове пастеровскую станцию; А.М.Безредка (1870—1940; метод десенсибилизации при серотерапии); Л.А. Тарасевич (1868—1927; организовал службу контроля вакцин и сывороток); Н.Ф.Гамалея (1859—1949; открыл бактериолизины), Г.Н.Габричевский (1860—1907; бактериологическое производство); Л.А.Зильбер (1894—1966; вирусная теория генеза опухолей); М.П. Чумаков (1909-1990) и А.А. Смородинцев (1901-1989) - разработали полиомиелитную вакцину; Б.В.Первушин (1895-1961), А.А.Богомолец (1881—1946 - выяснили роль соединительной ткани в иммунитете), А.Д.Адо (советская аллергологическая школа) и многие другие.

## **1. 2 Лекция №2 ( 2 часа).**

### **Тема: «Врожденный иммунитет»**

#### **1.2.1 Вопросы лекции:**

1. Определение врожденного иммунитета, его отличие от специфического (приобретенного) иммунитета.
2. Тканевые факторы неспецифической защиты.
3. Гуморальные факторы неспецифической защиты

#### **1.2.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Наименование вопроса № 1**

Врожденный иммунитет - это самая ранняя форма иммунной защиты хозяина, которая возникла на начальных этапах эволюции многоклеточных организмов, поскольку многие гены врожденной защиты имеются не только у позвоночных, но и у беспозвоночных животных, а также у растений. Высшие позвоночные имеют также адаптивную иммунную систему, принципы функционирования которой отличаются от таковых врожденного иммунитета. Основные функции врожденного иммунитета и адаптивного иммунитета сходны и сводятся к поддержанию генетического гомеостаза организма, который включает следующее:

Контроль действия инфекционных и других потенциально-опасных факторов;

Иммунологический надзор за постоянством состава организма и резистентностью к опухолевому росту; контроль процессов формообразования и регенерации.

Но механизмы распознавания и реагирования у этих двух систем кардинально отличаются. Для врожденного иммунитета характерно неспецифическое распознавание чуждых для организма субстратов и реакция на них по единой программе. Врожденное иммунное распознавание осуществляется наследственно закодированными рецепторами, которые распознают несколько высоко консервативных структур в больших группах микроорганизмов. Эти структуры называются патоген-ассоциированными молекулярными образцами — PAMP (pathogen-associated molecular patterns), а распознающие их рецепторы врожденной иммунной системы — образраспознающими рецепторами — PRR (pattern-recognition receptors). Наиболее известные PAMP: бактериальный липополисахарид, пептидогликан, липотейхоевые кислоты, маннаны, бактериальная ДНК, двуспиральные РНК, глюканы. Все PAMP имеют ряд общих свойств: все PAMP образуются только микробами, а не их хозяином (например, липополисахарид синтезируется только бактериями) и PRR распознают его, сигнализируя хозяину о присутствии в организме инфекции; структуры, узнаваемые врожденной иммунной системой, обычно важны для выживания или патогенности микроорганизмов; PAMP — обычно инвариантные структуры, присущие всему классу патогенов (например, все грамотрицательные бактерии содержат ЛПС, следовательно, рецепторы хозяина, распознающие образ ЛПС, фактически выявляют любую грамотрицательную инфекцию). Образраспознающие рецепторы экспрессируются несколькими эффекторными клетками врожденного иммунитета: макрофагами; дендритными клетками; В-лимфоцитами (профессиональными АПК). Экспрессия PRR — не клональная, все клетки данного типа (например, макрофаги) демонстрируют рецепторы единой специфичности. После идентификации PRR PAMP, клетка запускает выполнение эффекторных функций без необходимости пролиферации. Этот факт объясняет высокую скорость врожденных иммунных реакций.

Активность системы врожденного иммунитета относительно постоянна и не зависит от специфичности чужеродного агента, при адаптивном иммунитете идет специфическое распознавание антигенов и специализированный иммунный ответ. При врожденном иммунитете отсутствует иммунологическая память, при адаптивном иммунитете на повторное попадание антигена специфическая реакция многократно усиливается. Клеточной основой врожденного иммунитета являются клетки покровов и внутренних барьеров, фагоцитирующие и NK-клетки. Клеточной основой адаптивного иммунитета являются лимфоциты, антигенпредставляющие клетки.

Гуморальные факторы врожденного иммунитета являются: лизоцим; комплемент; белки острой фазы и т.д. При адаптивном иммунитете — антитела (иммуноглобулины).

## 2. Наименование вопроса №2.

Главную роль в противомикробной защите играют разнообразные механизмы механического удаления микроорганизмов (клиренса). На коже это постоянное сдирание и обновление эпителия, чесание. В органах дыхания — это продукция сурфактанта и мокроты, перемещение слизи за счет движений ресничек цилиарного эпителия, кашля и чихания. В кишечнике — это перистальтика и выработка соков и слизи (понос при инфекции и т.п.). К неспецифическим факторам резистентности можно отнести такие физиологические функции, как чихание, рвота, понос, которые также способствуют элиминации патогенных агентов из организма. Сюда же следует отнести такие физиологические факторы, как температура тела, концентрация кислорода, гормональный баланс. Если инфект преодолевает все выше перечисленные барьеры и проникает вглубь тканей, то начинается развитие воспаления. Воспаление — это каскад реакций, возникающих как первый (неспецифический) этап защиты организма. Сводится к выходу клеток иммунной системы из кровяного русла и миграции их в очаг проникновения инфекта. Развиваются различные деструктивные эффекты, в результате чего чужеродные клетки погибают. Воспалительная реакция служит естественным



механизмом включения реакций специфического иммунитета. Воспаление характеризуется быстротой развития и низкой специфичностью происходящих событий. Этапы воспаления следующие: сосудистая реакция; миграция лейкоцитов в очаг воспаления; нейтрализация и элиминация возбудителя; включение механизмов адаптивного иммунитета; завершение или хронизация воспалительного процесса.

**Сосудистая реакция.** При проникновении патогена в ответ на воспалительные стимулы (антигены и токсины бактерий, субстрат разрушенных тканей и т.д.) близлежащие клетки лейкоцитов, эпителия, эндотелия сосудов и других образований секретируют целый спектр сосудорасширяющих медиаторов – вазодилаторов (гистамин, брадикинин, простагландин E<sub>2</sub>, простациклин и др.). Гистамин, брадикинин и некоторые другие медиаторы не только вызывают расширение сосудов и усиление их кровенаполнения, но изменяют и состояние клеток эндотелия. Клетки эндотелия становятся высокими и кубовидными, промежутки между ними увеличиваются, в результате развивается «протекание сосудов». «Протекающие сосуды» – это небольшие посткапиллярные вены. Сосудистая реакция обеспечивает проникновение в межклеточное пространство очага воспаления активных белков плазмы (антител, компонентов комплемента, белков острой фазы и др.)

Этапы миграции клеток в очаг воспаления: качение; адгезия лейкоцитов на эндотелии; трансэндотелиальная миграция; хемотаксис – направленная миграция в очаг воспаления.

**Адгезия:** первая фаза – движение лейкоцитов в очаге воспаления замедляется, отмечается их «качение», что связано с взаимодействием молекул адгезии (селектинов, углеводных лигандов и др.); вторая фаза – активация, при которой лейкоциты подвергаются действию цитокинов, хемокинов и других агентов; третья фаза – прикрепление, которая характеризуется полной остановкой движения, прикреплением к клеткам эндотелия и подготовкой к проникновению в межэндотелиальное пространство, этот эффект возникает благодаря взаимодействию многочисленных молекул адгезии.

**Трансэндотелиальная миграция.** Этот этап характеризуется проникновением лейкоцитов через стенку сосуда и выходом во внесосудистое пространство. В процессе проникновения у лейкоцитов экспрессируется новый набор адгезинов, позволяющий им взаимодействовать с клетками базальной мембраны сосудов, которую они расплавляют, секретируя коллагеназу и другие ферменты.

**Хемотаксис.** После выхода из кровеносного русла, лейкоциты освобождаются от ненужных рецепторов, а на их поверхности появляются новые рецепторы для хемотоксических факторов. Направленность движения лейкоцитов определяется возрастанием концентрации различных хемотоксических веществ. Основные группы хемоаттрактантов: а) продукты жизнедеятельности микроорганизмов; б) цитокины, вырабатываемые в очаге воспаления (ИЛ-1, С-реактивный белок (СРБ), гистамин, лейкотриен В<sub>4</sub>); в) компоненты комплемента (С3а, С5а); г) поврежденные и денатурированные белки; д) тромбин, фибрин и др.

**Нейтрализация и элиминация инфекта.** Включает несколько механизмов: 1) внеклеточный цитолиз (внеклеточный киллинг); 2) фагоцитоз (внутриклеточный киллинг); 3) контактный киллинг; 4) нейтрализация и опсонизация возбудителя гуморальными факторами неспецифической защиты.

**Внеклеточный цитолиз (внеклеточный киллинг)** – это процесс убийства клетки-мишени под действием токсических факторов, секретируемых во внеклеточную среду клеткой-киллером. Он включает: окислительный (дыхательный) взрыв; выделение окиси азота; дегрануляцию (высвобождение содержимого гранул за пределы клетки).

**Респираторный взрыв** – это каскад реакций, в результате которых образуются активные формы кислорода (супероксидный анион, гидроксильные радикалы, перекись водорода). Эти продукты воздействуют на биологический субстрат микроорганизмов, вызывая его окисление и гибель.

Окись азота. В результате каскада реакций в макрофагах, нейтрофилах и некоторых других клетках происходят реакции метаболизма аргинина. В итоге образуется окись азота, обладающая очень сильным бактерицидным эффектом.

Под экзоцитозом понимают процесс высвобождения содержимого гранул клеток во внеклеточное пространство. Этот процесс реализуется клеткой после получения активирующего сигнала (через рецепторы) и протекает очень быстро, в течение нескольких часов. Функции дегрануляции присущи нейтрофилам, эозинофилам, базофилам, макрофагам, моноцитам. На сегодняшний день известно более 60 активных белков и ферментов (миелопероксидаза, катионные белки, катепсин, лизоцим, лактоферрин и др.).

Фагоцитоз. Под фагоцитозом понимают процесс поглощения объекта клеткой фагоцита с дальнейшим ферментативным разрушением его структуры. Фагоцитоз в отдельных своих проявлениях напоминает некоторые механизмы внеклеточного цитолиза (здесь также огромную роль играют продукты респираторного взрыва, метаболиты окиси азота и содержимое гранул). Отличие от внеклеточного киллинга – процессы происходят внутри клетки, в замкнутом пространстве фагосомы, куда объект попадает в результате его захвата псевдоподиями фагоцита. «Профессиональными фагоцитами» являются нейтрофилы, макрофаги, моноциты. Этапы фагоцитоза: адгезия (или прилипание к объекту); формирование фагоцитарной чаши (или погружение); слияние фагосом с лизосомами (или образование фаголизосом); гидролиз (переработка) фагоцитированного материала; удаление остатков.

Защитные механизмы бактерий от фагоцитоза. Некоторые бактерии могут выделять репелленты, подавляющие хемотаксис. Другие виды обладают капсулами или оболочками, препятствующими связыванию бактерий фагоцитами. Третьи не препятствуют поглощению, но затем выделяют факторы, блокирующие запуск бактерицидных механизмов (например, *M. tuberculosis* ингибирует слияние фагосомы с лизосомами). Многие бактерии выделяют каталазу, разрушающую перекись водорода. Некоторые бактерии, например, *M. leprae*, покрыты снаружи оболочкой высокоустойчивой к повреждению. Ряд микроорганизмов, например, *M. tuberculosis*, *M. leprae* могут выходить из фагосомы и размножаться в цитоплазме фагоцита.

Неспецифическим контактным киллингом называют процесс убийства клетки-мишени путем ее прямого контакта с клеткой-киллером, в результате внутрь клетки-мишени передается токсический материал, вызывающий ее гибель (перфорины и гранзимы). Осуществляется он натуральными киллерами (НК-клетками).

Воспалительная реакция является фактором, включающим реакции специфического иммунитета. Основные события разворачиваются в лимфатических узлах и селезенке, куда антиген доставляется макрофагами или другими антигенпредставляющими клетками. Огромную роль в запуске реакций специфического иммунитета играют воспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, ИФН и др.).

Завершение или хронизация воспалительного процесса. Острый воспалительный процесс может благополучно завершиться, если индуктор воспаления полностью уничтожен (в этом случае в очаге начинают преобладать цитокины, которые ингибируют миграцию новых клеток и препятствуют распространению воспаления). Если организм не способен ликвидировать индуктора, то развивается хронизация воспалительного процесса, в очаге почти отсутствуют нейтрофилы, но много макрофагов и лимфоцитов. В условиях постоянного антигенного раздражения происходит дифференциация макрофагов в эпителиоидные клетки, которые секретируют большое количество ФНО- $\alpha$ , иногда они сливаются, образуя гигантские клетки. Хронизация воспаления часто завершается образованием гранулем.

Управление воспалительным процессом. Подавление воспалительной реакции можно осуществить при помощи кортикостероидных препаратов (гидрокортизон) и нестероидных препаратов (ацетилсалициловой кислоты, ибупрофена, парацетамола,

диклофенака, индометацина, пироксикама и др.). Стимуляцию воспалительного процесса можно провести при помощи вакцин, неспецифических иммуностимуляторов, воспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИНФ, ФНО).

Основные фагоцитирующие клетки: нейтрофилы; моноциты; макрофаги. Основными фагоцитами организма являются нейтрофилы благодаря их большому количеству и быстрой выработке в костном мозге. На поверхности фагоцитов имеются рецепторы к С3 компоненту комплемента и Fc-фрагменту IgG. Если бактерии покрыты IgG антителами и комплементом, то фагоцитоз резко ускоряется. Самая многочисленная популяция, составляет 40 – 60 % от всех лейкоцитов. Происходят из стволовых клеток, проходят стадии миелобласта, промиелоцита, миелоцита, палочкоядерного (юного) нейтрофила и становятся зрелыми на стадии сегментоядерного нейтрофила. На стадии палочкоядерного нейтрофила поступают в кровеносное русло (циркулируют 6-12 часов), а потом оседают в периферических органах и тканях, общая продолжительность их жизни -3-4 дня. Функции нейтрофилов: фагоцитоз (внутриклеточный киллинг); внеклеточный цитолиз (внеклеточный киллинг); секреторно-регуляторная функция (образование продуктов респираторного взрыва, компонентов комплемента, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО, простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов, интерферонов и др.); инициация воспалительных реакций; участие в процессах свертывания.

Моноциты/макрофаги. Происходят из стволовых клеток, на стадии моноцита поступают в кровь, где циркулируют 1-5 дней, после чего мигрируют в ткани и органы и превращаются в макрофаги. К макрофагам относят: моноциты крови; гистиоциты соединительной ткани; эндотелиальные клетки капилляров кровеносных органов; купферовские клетки печени; клетки стенки альвеол лёгкого (лёгочные макрофаги); стенки брюшины (перитонеальные макрофаги). Продолжительность их жизни колеблется от 20 суток до 6-7 месяцев. Выстилают и контролируют те места, которые наиболее вероятны для проникновения инфекта в организм. Их функции: внеклеточный и внутриклеточный цитолиз; антигенпредставляющая функция; секреторно-регуляторная функция (синтез компонентов комплемента, пропердина, продуктов окислительного взрыва, NO, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, продуктов метаболизма арахидоновой кислоты, лизоцима и др.); участие в репаративных процессах.

### 3. Наименование вопроса №3

К гуморальным факторам врожденного иммунитета относят: систему комплемента; лизоцим; пропердин; интерфероны; лактоферрин; белки острой фазы; катионные белки; нормальные антитела и др.

Система комплемента. Включает 9 основных компонентов (C1, C2, C3, C4.....C9). Компоненты комплемента синтезируются гепатоцитами и моноцитами/макрофагами. Представляет собой систему действующих пептид-гидролаз. Конечным этапом активации комплемента является МАК (мембрано-атакующий комплекс). Функции комплемента: 1) опсонизация (связывание компонентов комплемента с микробными клетками или иммунными комплексами с целью усиления фагоцитоза); 2) лизис микробных клеток; 3) лизис иммунных комплексов; 4) активация воспаления (привлечение в очаг воспаления нейтрофилов, моноцитов/макрофагов); 5) усиление процессинга антигена антигенпредставляющими клетками.

Активация комплемента может проходить 3 основными путями: классическим; альтернативным и лектиновым.

Лизоцим. Протеолитический фермент. Открыт А.Флемингом в 1922 г. Разрушает клеточную стенку бактерий, действуя на пептидогликан. Активирует фагоцитоз. Активирует антителообразование. Синтезируется фагоцитами (моноцитами, макрофагами, нейтрофилами). Содержится во всех жидкостях организма, кроме спинномозговой жидкости и передней камеры глаза. Является показателем резистентности организма

Интерфероны. Белки со сходными свойствами, выделяемые клетками организма в ответ на внедрение вируса. Благодаря интерферонам клетки становятся невосприимчивыми по отношению к вирусу. Открыты в 1957 г. Сотрудниками Лондонского национального института вирусологи англичанином А. Айзек и швейцарцем Дж. Линдеман. Интерфероны человека подразделяют на группы в зависимости от типа клеток, в которых они образуются:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ .  $\alpha$ -Интерфероны включают несколько видов белков с молекулярной массой около 20 кДа. Особое значение имеют интерфероны альфа-2b (для лечения вирусных заболеваний) и бета-1a (применяются для лечения рассеянного склероза). Наиболее изученным свойством интерферона является его способность препятствовать размножению вирусов. Второе направление действия интерферонов - стимуляция иммунной системы для борьбы с вирусами. Интерферон повышает синтез молекул МНС I и II классов. Высокий уровень молекул МНС I класса обеспечивает эффективную презентацию вирусных пептидов цитотоксическим Т-лимфоцитам и натуральным киллерам.

Лактоферрин. По химической природе - гликопротеид. Синтезируется гранулоцитами и гроздевидными клетками железистого эпителия. Способен связывать 2 атома  $Fe^{3+}$ , конкурируя в этом с микроорганизмами. Является компонентом секретов желудочно-кишечного, дыхательного, мочеполового трактов, слюнных, слезных, молочных желез, отсутствует в сыворотке крови.

$\beta$ -лизины (катионные белки). Белки сыворотки крови, синтезируются тромбоцитами, повреждают ЦПМ бактерий (преимущественно грамположительных, спорообразующих).

Белки острой фазы. Содержатся в сыворотке крови (в норме – мало, увеличиваются при тяжелых системных воспалительных процессах, синтезируются в печени под влиянием цитокинов). С-реактивный белок (С-реактивный протеин, CRP) - наиболее важный из белков острой фазы, связывается с КС ряда бактерий, одноклеточных грибов, опсонизирует, активирует комплемент по классическому пути, его количество может увеличиваться в 10-100 и даже в 1000 раз. Появляется уже через несколько часов после инфицирования или травмы. По уровню СРБ можно судить об эффективности проводимого лечения.

### 1. 3 Лекция №3 ( 2 часа).

#### Тема: «Классификация инфекционного иммунитета. Антигены»

##### 1.3.1 Вопросы лекции:

1. Классификация инфекционного иммунитета.
2. Антигены, определение, свойства, классификации.
3. Животные антигены.
4. Микробные антигены.

##### 1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1.

В современном понимании иммунитет к заразным болезням подразделяется на **врожденный** (он же наследственный или видовой) и **приобретенный** (или индивидуальный). Врожденный, наследуется как любой другой биологический признак, потомством от родителей. В основе врожденного иммунитета лежит отсутствие на поверхности клеток рецепторов для адгезии патогенных микроорганизмов.

Приобретенный иммунитет касается защиты от тех вирулентных паразитов, которые способны преодолевать конститутивные защитные барьеры (непроницаемость покровов, фагоцитоз, комплемент, воспаление) организмов конкретного вида. Такого рода защита возникает только в результате контакта с инфекционным началом и у каждой

особи данного вида независимо от других, поэтому его и называют индивидуальным. В формировании такого иммунитета основную роль играют иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты). Опираясь на достижения медицины, микробиологии и иммунологии, люди получили возможность направленно вызывать приобретенный иммунитет к инфекционным заболеваниям, поэтому в настоящее время его принято делить на естественный и искусственный.

*Искусственный иммунитет* можно вызвать двумя основными путями. Первый предполагает введение в организм вакцинных препаратов. При введении живых вакцин формируется достаточно длительный иммунитет сроком до года и более. Вероятно, это объясняется сохранением живой клеткой или вирусной частицей большинства антигенов, на которые способна реагировать иммунная система, что и делает иммунный ответ наиболее широким по набору антител и клеток иммунологической памяти, следовательно, более полноценным. Второй путь предполагает введение препаратов, содержащих не разрушенные, но лишенные жизнеспособности клетки или вирусные частицы возбудителя, так называемых *убитых вакцин*. При их введении формируется иммунитет длительностью до 6 месяцев.

Создаваемый с помощью вакцин искусственный иммунитет, называют активным, поскольку в организме вакцинируемых в результате развившегося иммунного ответа вырабатываются антитела или появляются активированные ЦТЛ.

Вторая форма искусственного иммунитета, так называемый *пассивный (сывороточный) иммунитет*, создается путем введения в организм уже готовых, выработанных в другом организме антител против конкретного возбудителя. Он формируется в течение нескольких часов и длится до 15 дней, поскольку введенные антитела постепенно разрушаются в плазме крови, а собственных антител, способных защитить от данного возбудителя, организм не вырабатывает.

Для профилактики инфекционных болезней применяют обе формы искусственного иммунитета, но активный искусственный иммунитет имеет гораздо более широкое распространение.

*Естественный иммунитет* возникает без вмешательства человека и также представлен двумя формами. Возникающая после перенесенного заболевания невосприимчивость к некоторым болезням, называется *постинфекционным иммунитетом* или *естественным активным иммунитетом*, имеет в своей основе развитие у болеющего иммунного ответа, приводящего к формированию и длительному (иногда на всю оставшуюся жизнь) сохранению в организме соответствующих клеток иммунной памяти.

*Естественный пассивный иммунитет* возникает при попадании в организм антител, продуцируемых другим организмом. Это происходит в период внутриутробного развития у млекопитающих. Установлено, что IgG способны преодолевать плацентарный барьер и поступать в кровоток плода – в результате чего идет формирование *плацентарного* иммунитета (особенно интенсивно это происходит в последние месяцы беременности). Другой путь попадания антител – с молозивом, что ведет к формированию *колострального* иммунитета. Для основных видов сельскохозяйственных животных наиболее актуален последний. Обе эти разновидности естественного пассивного иммунитета длятся всего несколько месяцев, т. к. материнские антитела постепенно выводятся из организма.

## 2. Наименование вопроса №2.

Слово «антиген» происходит от широко используемых в современных языках древнегреческих *анти* – противоположный, и *генез* – рождающий. В начальный период развития иммунологии под антигеном всегда однозначно понимали организмы или вещества, имеющие отношение к инфекционным заболеваниям. Однако, последующие открытия в области иммунологии, изменили этот взгляд. В настоящее время определение звучит следующим образом: «Антиген (АГ) – это чужеродное вещество, которое при

попадании в организм вызывает развитие иммунных реакций и специфически взаимодействует (связывается) с продуктами этих реакций».

Благодаря открытию механизмов развития иммунных реакций, стало понятно, что антигенами могут являться практически любые вещества, имеющие достаточную молекулярную массу в сочетании с определенной пространственной структурой. Для АГ характерно наличие следующих основных свойств: *иммуногенности; антигенности; специфичности; чужеродности*. Под иммуногенностью понимают способность АГ вызвать иммунный ответ при введении во внутреннюю среду другого организма, не имеющего дефектов иммунной системы. *Антигенность* – это способность вызывать иммунный ответ в большей или меньшей степени. *Специфичность* – это свойство, характерное для каждого конкретного АГ, обусловлена *антигенными детерминантами или эпитопами*. Это пространственные структуры на поверхности антигена, которые распознаются АТ и с которыми они взаимодействуют. *Неполные антигены или гаптены* вызывают синтез антител не могут, но с готовыми вступают в реакцию.

### 3. Наименование вопроса № 3.

Животные антигены классифицируются по их отношению к организму, в котором они вызывают иммунный ответ. При таком подходе принято выделять: *аутоантигены* – собственные антигены организма, на которые по тем или иным причинам отреагировала иммунная система; *изоантигены* – антигены генетически идентичных организмов; *гомо- (алло-) антигены* – антигены разных особей одного и того же вида; *гетеро- (ксено-) антигены* – антигены особей любого другого вида.

При необходимости подчеркнуть характер развивающегося в организме ответа на антиген используют термины *тимусзависимые и тимуснезависимые* антигены, указывая на участие или неучастие в иммунном ответе Т-лимфоцитов.

Применительно к используемым в медицинской практике пересадкам органов и тканей появился термин *трансплантационные антигены*. В настоящее время, когда причины и механизмы отторжения пересаженных тканей частично выяснены, под этим термином фактически понимают располагающиеся на поверхности клеток белки главного комплекса гистосовместимости (МНС). Наличие таких антигенов позволяет отличать один организм от другого (за исключением однояйцевых близнецов), т. е. они определяют *индивидуальную антигенную специфичность*. АГ МНС относятся к 3 классам. АГ МНС I класса располагаются на всех ядродержащих клетках организма и участвуют в представлении чужеродного АГ цитотоксическим лимфоцитам (Т-киллерам). АГ МНС II класса располагаются на поверхности профессиональных АПК (макрофагах, дендритных клетках, В-лимфоцитах) и участвуют в представлении чужеродного АГ Т-хелперам.

В современной иммунологии, биологии и медицине широкое применяется понятие антигенной специфичности. Различают следующие виды антигенной специфичности: *видовая специфичность* – имеется в виду наличие антигенов, характерных для всех особей вида и нехарактерных для организмов других видов; *гетероспецифичность (гетерогенная или ксеногенная специфичность)* – наличие у организмов разных видов одинаковых или сходных антигенных детерминант (например, у стафилококков и стрептококков есть антигены, частично совпадающие с антигенами сарколеммы сердечной мышцы человека; у некоторых вариантов вируса гриппа сходные АГ с АГ эритроцитов людей, что называют «антигенной мимикрией»).

### 4. Наименование вопроса №4.

Каждый микроорганизм, как бы примитивно он не был устроен, содержит несколько антигенов. Чем сложнее он устроен, тем больше антигенов можно обнаружить. У различных микробов, принадлежащих к одним и тем же систематическим категориям различают: группоспецифические антигены – встречаются у разных видов одного и того же рода или семейства; видоспецифические антигены – встречаются у представителей одного вида; типоспецифические (вариантные) антигены – встречаются у разных ариантов в пределах одного и того же вида.

Среди бактериальных антигенов различают: Н-АГ; О-АГ; К-АГ; S-АГ и другие.

*Жгутиковые Н-антигены.* Эти антигены входят в состав бактериальных жгутиков. По химической природе – белки (белок флагеллин), термолабильны, после обработки фенолом сохраняют свои антигенные свойства.

*Соматический О-антиген.* Этот антиген связан с клеточной стенкой (раньше полагали, что связан с внутренним содержимым – сомой). О-антиген грамотрицательных бактерий связан с ЛПС клеточной стенки. О-антиген термостабилен (при кипячении сохраняется в течение 1-2 часов), не разрушается после воздействия формалином и этиловым спиртом.

*Капсульные К-антигены.* Тесно связаны с клеточной стенкой и капсулой. Представлены кислыми полисахаридами. По чувствительности к температуре К-антигены подразделяются на А-, В- и L-антигены.

Экзотоксины большинства микроорганизмов обладают свойством полноценных антигенов.

Антигенными свойствами обладают также споры.

Среди бактериальных антигенов выделяют *защитные или протективные антигены*, на которые синтезируются защитные от данной инфекции антитела.

#### **1. 4 Лекция №4 ( 2 часа).**

##### **Тема: «Органы иммунной системы»**

##### **1.4.1 Вопросы лекции:**

1. Уровни организации иммунной системы
2. Центральные органы иммунной системы
3. Периферические органы иммунной системы

##### **1.4.2 Краткое содержание вопросов:**

###### **1. Наименование вопроса № 1.**

Иммунная система представлена лимфоидной тканью. Это специализированная, анатомически обособленная ткань, разбросанная по всему организму в виде различных лимфоидных образований и функционирующая как единое целое. Она составляет 1-2 % от массы тела (от 1 до 2,5 килограмм).

При изучении иммунной системы необходимо знать ее морфологические границы и установить те факторы, которые определяют функции этой системы.

А. Иoeffи и К. Куртис (1970) объединили лимфоидную и кровеносную системы в единый комплекс. Этот комплекс представляет собой систему органов и тканей, паренхима которых содержит клетки мезенхимального происхождения. Функциональное назначение комплекса – обеспечение кроветворения и формирование клеток иммунной системы. Среди органов и тканей комплекса имеются истинные лимфоидные образования, в которых происходит только лимфопоэз (тимус, лимфатические узлы, лимфоидная ткань кишечника), и «смешанные» образования, где представлен, как лимфопоэз, так и миелопоэз (костный мозг, селезенка).

Главными клетками иммунной системы являются Т- и В-лимфоциты. Они происходят из стволовых клеток костного мозга. Дифференцировка происходит в центральных лимфатических органах: В-лимфоциты в костном мозге или бурсе Фабрициуса, Т-лимфоциты – в тимусе. Далее из этих органов они мигрируют по кровеносному руслу в периферические лимфатические органы: лимфатические узлы; селезенку; лимфоидную ткань, ассоциированную со слизистыми оболочками.

Движение от центральных органов на периферию – является главным миграционным путем лимфоцитов. Кроме того, имеется путь рециркуляции лимфоцитов. Лимфатические сосуды, пронизывающие все тело, собирают лимфоциты из внеклеточной жидкости в лимфатические узлы. Из лимфатических узлов клетки по эфферентным сосудам

поступают в основной лимфатический сосуд – грудной проток, из которого они вновь проникают в кровь через левую подключичную вену (каждый момент в крови находится только 0,2- 2 % лимфоцитов).

Различные типы организации лимфоидной ткани

Лимфоциты относятся к той категории клеток, которые широко распространены в организме. В теле позвоночных животных и человека они сгруппированы в три объединения. Первый тип – диффузная инфильтрация подкожной соединительной ткани и слизистых оболочек. Этот тип не имеет строгой локализации и образуется в ответ на повреждение кожи или слизистых оболочек и местное повреждение патогена. Второй тип представляет собой скопление лимфоцитов в виде отдельных узелков в подслизистом слое пищеварительного, дыхательного, мочеполового трактов. Они представляют собой неинкапсулированную лимфоидную ткань. Третий тип – это форма организации лимфоидной ткани в органы, покрытые соединительнотканной капсулой. Эти различные типы организации обеспечивают наиболее эффективную работу иммунной системы.

## 2. Наименование вопроса №2.

Центральные органы иммунной системы.

*Костный мозг.* Представляет собой тканевое объединение ретикулярной стромы, плотно упакованных гемопоэтических и лимфоидных клеток, а также разветвленной сети капилляров. Локализован во внутренней полости трубчатых костей. Основное назначение – продукция клеток крови и лимфоцитов. Развитие клеточных элементов костного мозга начинается от полипотентных стволовых клеток. Они составляют 0,01 % от всех клеток костного мозга. 80-90 % этих клеток находится в состоянии покоя, а 10-20 % делятся. Одна дочерняя клетка остается недифференцированной, другая дает начало шести росткам дифференцировки:

1. мегакариоцитарному, заканчивающемуся образованием тромбоцитов;
2. эритроидному, заканчивающемуся формированием безъядерных эритроцитов;
3. гранулоцитарному, заканчивающемуся образованием нейтрофилов, базофилов, эозинофилов;
4. моноцитарно-макрофагальном, заканчивающемуся образованием моноцитов, превращающихся впоследствии в тканевые макрофаги;
5. Т-клеточному – данный росток дифференцировки на территории костного мозга проходит самый начальный этап развития, дальнейшая дифференцировка продолжается в тимусе;
6. В-клеточному – В-клеточная дифференцировка практически полностью заканчивается в костном мозге, чему способствуют цитокины, выделяемые клетками стромы (ИЛ-3, ИЛ-7, В-активин и др.).

Костный мозг функционирует также и как вторичный орган иммунной системы. Здесь после антигенной стимуляции В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют антитела.

*Тимус или вилочковая железа.* У большинства млекопитающих он расположен в верхней части грудной полости над сердцем и состоит из двух основных долей, которые делятся на более мелкие дольки. Орган в целом и отдельные дольки заключены в соединительнотканную капсулу. В каждой дольке четко выявляются два слоя: кора с плотной упаковкой малых тимоцитов; мозговое вещество со сниженным количеством тимоцитов. Основной структурной единицей коры являются фолликулы Кларка, в которых находятся плотно упакованные тимоциты и среди них макрофаги, дендритные клетки, эпителиальные клетки, клетки-няни. В мозговой зоне наблюдаются округлые скопления эпителиальных клеток без лимфоцитов, получивших название телец Гассала. Их функция пока неизвестна. Существенными особенностями клеток тимуса является их ярко выраженная пролиферативная активность. Клетки, окружающие тимоциты и их гуморальные продукты (цитокины, гормоны), стимулируют деление тимоцитов. В



процессе деления идет созревание. На поверхности тимоцитов появляются новые структуры, определяющие их свойства. Эти структуры называются «кластеры дифференцировки» (CD). В тимусе идет также жесткий отбор тимоцитов. За сутки в нем образуется  $36 \times 10^7$  -  $47 \times 10^7$  клеток, а покидает  $8,6 \times 10^6$  клеток. Это происходит из-за позитивной и негативной селекции.

При позитивной селекции идет отбор клеток с рецепторами для молекул МНС I и II класса, что обеспечивает им последующий контакт с антигенпредставляющими клетками (АПК).

При негативной селекции погибают клетки, имеющие рецепторы к собственным антигенам.

Созревание клеток в тимусе идет 4-6 суток, после чего они поступают в кровь, лимфу и разносятся по периферическим органам иммунной системы. Созревание происходит под действием тимулина,  $\alpha$ - и  $\beta$ -тимозина, тимопоэтина и других цитокинов.

Тимус начинает функционировать у 6-недельного эмбриона. К рождению его масса (у человека) достигает 10-15 граммов, к началу полового созревания – 30-40 граммов, а далее происходит его инволюция с утратой до 3 % активной ткани ежегодно и заменой ее жировой тканью. У животных тимус развит только в раннем возрасте.

*Фабрициева сумка (бурса Фабрициуса)* встречается только у птиц. Располагается на дорсальной стороне клоаки. Развивается к 13 суткам эмбрионального развития. Инволюция начинается после семи недель жизни. Её роль была выяснена в 1956 году Глюком. В этой сумке стволовые клетки дифференцируются в В-лимфоциты.

Все центральные органы иммунной системы надежно защищены от повреждений.

### 3. Наименование вопроса №3.

К периферическим органам иммунной системы относятся: лимфатические узлы; селезенка; скопления лимфоидной ткани под слизистыми оболочками желудочно-кишечного, дыхательного, пищеварительного трактов (пейеровы бляшки, миндалины, аппендикс и др.).

*Лимфатические узлы.* Отвечают на антигены, циркулирующие в лимфе. Располагаются в виде зерен по ходу лимфатических сосудов. Размеры у человека колеблются от 3 до 30 миллиметров. В эмбриогенезе возникают в конце второго начале третьего месяца развития. Их количество у человека может быть от 500 до 1000.

*Лимфатические узлы* покрыты соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходят трабекулы. Под капсулой находится краевой синус, куда поступает лимфа по приносящим сосудам, далее через промежуточные синусы, пронизывающие всю толщу узла, лимфа собирается в выносящем (эфферентом) сосуде. В лимфатическом узле различают корковый слой (располагается по периферии и организованный в первичные и вторичные фолликулы), мозговое вещество (в центре) и паракортикальный слой, находящийся между ними. Корковый слой является местом концентрации В-лимфоцитов, паракортикальный слой – место концентрации Т-лимфоцитов, в мозговом веществе представлены лимфоциты, ретикулярные клетки стромы, макрофаги, плазмочиты, дендритные клетки. Подобная близость создает условия для их усиленного взаимодействия.

При развитии иммунитета по гуморальному типу увеличивается число центров в корковом слое. При развитии клеточного иммунитета увеличивается паракортикальная зона. Лимфатический узел при иммунном ответе может увеличиваться в 15 раз.

*Селезенка.* Отвечает на антигены, которые циркулируют в крови. Она расположена в верхней левой части брюшной полости. У человека размеры ее составляют  $3 \times 18$  см, вес – 180-250 г, ежеминутно через нее проходит 800 мл крови. Снаружи орган покрыт соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходят трабекулы. Селезенка содержит красную и белую пульпу. Красная пульпа – место локализации большого количества эритроцитов, макрофагов, гранулоцитов, здесь происходит также разрушение отживших свое эритроцитов и тромбоцитов. Белая пульпа представляет собой скопления

лимфоцитов вокруг артериального канала. Т-лимфоциты располагаются вокруг артериол, В-лимфоциты расположены в пограничной зоне. Между красной и белой пульпой четких границ нет и поэтому происходит частичный обмен клетками. В селезенке происходит в основном формирование гуморального иммунного ответа в виде продукции антител. Удаление селезенки снижает способность организма к продукции антител, но это не смертельно, так как ее функцию берут на себя лимфатические узлы. На Т-зависимые формы иммунного ответа это никак не влияет.

*Неинкапсулированная лимфоидная ткань.* К ней относятся: глоточное лимфоидное кольцо; пейеровы бляшки; лимфоидные фолликулы аппендикса; лимфоидная ткань слизистых оболочек бронхов; мочеполового тракта и других слизистых оболочек. В пейеровых бляшках (узелки в тонком отделе кишечника) представлены Т- и В-лимфоциты. 50 % В-лимфоцитов имеет поверхностные Ig A, остальные – IgM и IgG. Плазмциты и Т-клетки способны проникать в слизистую оболочку. В слизистой оболочке находятся также фагоцитирующие клетки, которые поглощают патогены, оказавшиеся на эпителии слизистой поверхности.

*Небные миндалины* – парный лимфоидный орган, расположен на границе дыхательного и желудочно-кишечного трактов. Это положение придает ему роль важнейшего информационного центра об антигенах, которые поступают и с воздухом и с пищей. Этому способствует огромная суммарная площадь всех крипт – 300 см<sup>2</sup> (у человека). Межузелковая ткань небных миндалин – место локализации Т-лимфоцитов, а центры размножения узелков – место локализации В-лимфоцитов. Миндалины находятся в тесной связи с тимусом. Их удаление приводит к более ранней инволюции тимуса. В этом органе синтезируются IgG, IgM, sIgA, интерфероны.

*Аппендикулярный отросток* – состоит из купола с короной, фолликулов, расположенных под куполом, тимусзависимой зоны. В куполе размещается смесь бластов и лимфоцитов, в короне и тимусзависимой зоне – малые лимфоциты, в фолликулах размножаются В-лимфоциты, сенсibilизированные антигеном.

*Кровь* условно относится к периферическим органам. В ней циркулирует до 1010 лимфоцитов.

*Печень* имеет особые функции в иммунитете (хотя не упоминается как орган иммунной системы). В эмбриональный период в печени созревают В-лимфоциты. В печени локализована большая часть лимфоидных клеток – нормальных киллеров (NK). В ней есть особые популяции Т-лимфоцитов, которые постоянно поддерживают иммунологическую толерантность к пищевым веществам и иммунная система, таким образом, не тратит себя на ежедневные иммунные ответы на «котлеты». В печени находится около 50 % всех тканевых макрофагов, они фагоцитируют и расщепляют ИК, которые приносят на себе стареющие эритроциты.

## **1.5 Лекция №5 (2 часа).**

### **Тема: «Клетки иммунной системы»**

#### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Классификация клеток иммунной системы
2. Имунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты)
3. Антигенпредставляющие клетки
4. Клетки антигеннеспецифической защиты

#### **1.5.2 Краткое содержание вопросов:**

1. Наименование вопроса № 1.

Клетки иммунной системы могут быть разделены на три группы: 1) имунокомпетентные клетки – Т- и В-лимфоциты; 2) антигенпредставляющие клетки

(АПК) – макрофаги, В-лимфоциты, дендритные клетки; 3) клетки антигеннеспецифической защиты.

Все клетки иммунной системы происходят из стволовых клеток красного костного мозга. Стволовая клетка дает начало 6 росткам дифференцировки: мегакариоцитарному; гранулоцитарному, эритроидному; моноцитарно-макрофагальному; Т-лимфоцитарному; В-лимфоцитарному.

## 2. Содержание вопроса №2.

*Характеристика иммунокомпетентных клеток.* К этим клеткам, как было уже отмечено выше, относятся Т- и В-лимфоциты. Т-лимфоциты созревают в тимусе, В-лимфоциты – в костном мозге у человека и животных (у жвачных – в пейеровых бляшках), у птиц - в бурсе Фабрициуса, а потом расселяются по периферическим органам. Лимфоциты постоянно рециркулируют между скоплениями лимфоидной ткани. Распределение лимфоцитов в лимфатических органах и их миграция по кровеносным и лимфатическим путям упорядоченно. Всего лимфоцитов 1500 г, в крови и лимфе – по 100 г, а циркулирует по организму около 1300 г. Основными функциями лимфоцитов при антигенной стимуляции являются осуществление гуморального, клеточного иммунных ответов, а также регуляторная функция. Но при отсутствии антигенного раздражителя зрелые лимфоциты представляют собой инертные клетки (они не делятся и не секретируют активные вещества).

Морфологически лимфоцит - это клетка шаровидной формы с большим ядром и узким слоем базофильной цитоплазмы и диаметром 6-10 мкм. В процессе дифференцировки последовательно формируются большие, средние и малые лимфоциты. Последние наиболее зрелые и обладают амебовидной подвижностью (в лимфе и крови преобладают малые лимфоциты). За свою жизнь лимфоцит проходит расстояние около 100 км. Лимфоциты покидают лимфоидные органы с эфферентной лимфой (из селезенки с кровью). Через грудной проток проникают в кровь, затем через капиллярные венулы клетки вновь попадают в лимфоидный орган (тот же или другой), внутри которого перемещаются в специфические для них места. Затем вновь покидают лимфоидный орган и выходят в циркуляционное русло. В нелимфоидных органах неиммунные лимфоциты практически не циркулируют. В крови лимфоциты находятся около 30 минут, но в течение суток многократно (4-5 раз). Способность клеток находить свое место в организме называется хомингом.

У человека за сутки через лимфатический узел проходит  $0,3 \times 10^{11}$ , через селезенку –  $2,5 \times 10^{11}$ , а через кровь –  $5 \times 10^{11}$  лимфоцитов. Наивные лимфоциты не покидают лимфоидные ткани, а клетки памяти часто выходят за ее пределы. Срок жизни у лимфоцитов разный: у NK-клеток – 7-10 суток; у В-лимфоцитов – несколько недель; у разных популяций Т-лимфоцитов от 1000 до 10000 суток (2,5 до 30 лет, у клеток памяти сопоставим со сроком жизни человека или животного). Численность лимфоцитов соответствует объему ниш, которые они занимают.

В ходе созревания на поверхности лимфоцитов появляется много молекул, которые могут служить маркерами популяций и субпопуляций. Значительная часть этих маркеров в настоящее время легко идентифицируется при помощи моноклональных антител. Они получили название «кластеры дифференцировки» или CD с определенным порядковым номером. К настоящему времени их известно более 150. Большая часть «кластеров дифференцировки» относится к суперсемейству иммуноглобулинов.

*Характеристика Т-лимфоцитов.* Т-лимфоциты составляют до 80 % всех лимфоцитов крови и лимфатических узлов, содержатся во всех тканях организма. Природой Т-лимфоциты предназначены для распознавания поверхностных структурсобственных клеток, таким образом, большинство Т-лимфоцитов не распознают нативные антигены. Другие клетки должны пропустить антиген через себя и выставить его на своей мембране вместе молекулами МНС I или II классов, чтобы Т-лимфоцит «обратил на антиген свое

внимание». Маркером, характеризующим всю популяцию Т-лимфоцитов, является Т-клеточный рецептор (ТкР). Имеется два типа ТкР, оба они гетеромеры, состоящие из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями. ТкР первого типа образован  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, ТкР второго типа –  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепями. Димеры имеют V- и C-домены, как у иммуноглобулинов (Ig). Примерно 90-95 % Т-лимфоцитов имеют ТкР первого типа, а 5-10 % – рецептор второго типа (последние располагаются в подслизистом слое и не имеют CD4). Оба рецептора ассоциированы с CD3 (несет сигнальную функцию), образуя рецепторный комплекс Т-лимфоцитов (ТкР-CD3-комплекс). В норме Т-лимфоциты содержат от 30 до 40 тысяч молекул ТкР (в 4-5 раз меньше, чем у В-лимфоцитов).

*Т-лимфоциты* осуществляют две основные функции – регуляторную и эффекторную. Регуляторную функцию осуществляют Т-лимфоциты, имеющие на поверхности корецепторную молекулу CD4. Они называются Т-хелперами (Тх) или CD 4+ лимфоцитами, эффекторную функцию выполняют Т-киллеры, имеющие корецепторную молекулу CD8. Корецепторы CD4 и CD8 – повышают сродство рецепторного комплекса к лиганду (антигенному пептиду) за счет связывания этих молекул с молекулами МНС-1 и МНС-2 (это связывание повышает сродство ТкР к антигенному пептиду более чем в 100 раз). По структуре CD4 и CD8 – относятся к суперсемейству иммуноглобулинов. Оба корецептора состоят из трансмембранных полипептидных цепей, CD4 – мономер, CD8 – димер. На незрелых Т-лимфоцитах появляются оба корецептора, а потом один из генов подвергается супрессии.

*Т-хелперы.* Составляют около 50 % всех лимфоцитов крови. Через продуцируемые ими цитокины, стимулируют другие клетки, без них не может быть реализованы функции большинства В-лимфоцитов. Иммунологические функции Тх начинаются с представления им антигена антигенпредставляющими клетками (АПК). Представление состоит в том, что антигенпредставляющая клетка (АПК), распознавшая антиген как чужеродный, входит в контакт с Т-хелпером. Рецепты последнего воспринимают антиген только в том случае, если молекула CD4 взаимодействует с собственным антигеном этой клетки, которым является антиген МНС II класса. Такое «двойное распознавание» служит гарантией того, что Т-хелпер не будет активирован собственным антигеном, что может привести к развитию аутоиммунных реакций. «Двойное распознавание» было открыто Питером Дохерти и Рольфом Цинкернагелем, за что они получили Нобелевскую премию в 1996 году. Т-хелперы после воздействия антигена пролиферируют и разделяются на две субпопуляции: Тх1 и Тх2. Тх1 стимулируют преимущественно клеточный иммунитет (их образованию способствует воздействие ИЛ-12, CD 80, гликопротеин, образуемый макрофагами). Они образуют ИЛ-2, ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ . Тх2 стимулируют гуморальный и противопаразитарный иммунитет, аллергические реакции немедленного типа. Их образованию способствуют ИЛ-1 и CD 86 (гликопротеин, образуемый В-лимфоцитами). Тх2 выделяют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13. Тх1 и Тх2 являются антагонистами. Тх1 подавляют Тх2 за счет ИФН- $\gamma$ , Тх2 подавляют Тх1 за счет ИЛ-10. В ходе пролиферации из части Тх1 и Тх2 формируются клетки памяти.

Эффекторную функцию выполняют Т-лимфоциты, имеющие на поверхности CD8. Их называют цитотоксическими лимфоцитами или Т-киллерами или CD8+-лимфоцитами. Они составляют 22-24 % от всех лимфоцитов крови, их соотношение с Т-хелперами должно быть 1:1,9-1: 2,4. Основной функцией ЦТЛ является цитотоксичность. Поэтому они играют ведущую роль в противовирусном, противоопухолевом, трансплантационном иммунитете. Цитотоксические лимфоциты распознают антиген ТкР только после взаимодействия молекулы CD8 с молекулой МНС I класса на АПК, а поскольку эти молекулы имеются на поверхности практически всех ядросодержащих клеток, то ЦТЛ вступают во взаимодействие с большинством клеток содержимого гранул в щель между организма. Цитотоксические свойства эти лимфоциты приобретают после контакта с антигеном и действия ИЛ-2, выделяемого Тх1.

При контакте с клеткой-мишенью у ТЦЛ гранулы с ферментами перемещаются к тому участку мембраны, где произошел контакт с мишенью. Затем осуществляется зависимое от ионов кальция освобождение содержимого гранул в щель между ЦТЛ и мишенью. На первом этапе выделяются перфорины, вызывающие образование пор в цитоплазматической мембране клетки-мишени. Их диаметр составляет 5-16 нм. В большинстве случаев этого оказывается достаточно для гибели мишени. На втором этапе через перфориновые каналы ЦТЛ вводит гранзимы, которые запускают процесс апоптоза. Лимфоцит при этом сохраняет способность индуцировать гибель других клеток.

*Характеристика В-лимфоцитов.* В-лимфоциты составляют вторую основную популяцию лимфоцитов. Эти клетки составляют 10-15 % от лимфоцитов крови и 20-25 % от клеток лимфатических узлов. Их диаметр доходит до 8 мкм, они покрыты ворсинками и складками. В-лимфоциты выполняют в организме две функции: обеспечивают продукцию антител; участвуют в представлении антигена Т-хелперам. При созревании на поверхности В-лимфоцитов появляются разнообразные молекулы, которые обеспечивают взаимодействие с другими клетками. Особое значение имеют мембранные Ig D и IgM, связанные с CD19 и CD21, образующие рецепторный комплекс – ВкР. На поверхности В-лимфоцита может находиться 200-500 тысяч молекул иммуноглобулинов одинаковой специфичности (у незрелых В-лимфоцитов - IgM, у зрелых - Ig D, могут встречаться и другие классы иммуноглобулинов, но в незначительном проценте случаев). Предположительно в организме циркулирует около 10<sup>8</sup> клонов В-лимфоцитов с различными рецепторами. В отличие от Т-лимфоцитов В-лимфоциты вступают в контакт с антигеном напрямую. Этот контакт может служить стимулом для пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов с образованием клона однородных клеток-потомков, конечной стадией развития которых являются плазматические клетки. Эволюция В-лимфоцитов после встречи с антигеном может идти Т-зависимым и Т-независимым путем. Т-зависимый путь характерен для ответа на большинство антигенов. Одновременно с В-лимфоцитом активируются Тх2, вырабатывающие ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13, которые стимулируют пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов. При Т-независимом пути Т-хелперы не участвуют, а плазматические клетки, образующиеся в конце дифференцировки синтезируют только один класс иммуноглобулинов – Ig M.

Плазматические клетки крупнее В-лимфоцитов, их диаметр составляет от 10 до 20 мкм. У плазматических клеток хорошо выражена цитоплазма и развита эндоплазматическая сеть. Плазматические клетки не имеют рецепторов для антигена. Они короткоживущие, живут несколько дней, а потом у них запускается процесс апоптоза. Наряду с плазматическими клетками, образуются В-клетки памяти (составляют 1 % от всех В-лимфоцитов), отличаются долголетием и способностью быстро отвечать на повторное поступление антигена.

### 3. Содержание вопроса №3.

*Антигенпредставляющие клетки (АПК).* К профессиональным антигенпредставляющим клеткам относятся макрофаги, дендритные клетки и В-лимфоциты.

Макрофаги формируются из моноцитов, их количество в 25 раз больше, чем моноцитов. Маркером макрофагов служит CD14. Макрофаг распознает антиген, процессирует его и выставляет на поверхности в комплексе с молекулой МНС II класса для Т-хелперов. Важную роль при этом играет CD80.

Дендритные клетки – отростчатые, ветвистые клетки. Они более активны, чем макрофаги. Антиген поглощается ими путем пиноцитоза. Дендритные клетки распознав, захватив и переработав антиген, перемещаются в регионарные лимфатические образования в тимусзависимые зоны и представляют антиген Т-хелперам вместе с молекулой МНС II класса. К разновидностям дендритных клеток относят: клетки Лангерганса в коже; вуалевые клетки в лимфе; интердигитальные клетки лимфатических узлов и тимуса.

В-лимфоциты вступают в контакт с антигеном через свои специфические рецепторы. Процесс присоединения антигена к В-лимфоциту длится несколько минут, после чего антиген подвергается эндоцитозу и через несколько часов (2-3) представляется на мембране лимфоцита вместе с молекулой МНС II класса для Т-хелпера.

#### 4. Содержание вопроса №4.

К клеткам антигеннеспецифической защиты относятся: нейтрофилы; базофилы; эозинофилы; тучные клетки; естественные киллеры (ЕК). Характеристика первых четырех видов клеток была дана ранее.

Естественные киллеры (натуральные киллеры) по происхождению и функциям очень близки к ЦТЛ. ЕК в тимус не попадают и не подвергаются дифференцировке. Эти лимфоциты не имеют рецепторов для антигенов и не участвуют в специфической защите. ЕК разрушают в организме клетки, зараженные вирусом клетки, опухолевые клетки. В отличие от цитотоксических лимфоцитов, естественные киллеры всегда готовы к контакту с мишенями цитотоксическому действию. Механизм сходен с механизмом ЦТЛ. Маркерами ЕК служат CD16, CD56. Эти клетки могут выделять цитокины, активирующие другие клетки иммунной системы (ИЛ-1, ИФН- $\gamma$ , ГМ-КСФ).

### 1.6 Лекция № 6 (2 часа).

#### Тема: «Гуморальный иммунитет»

##### 1.6.1 Вопросы лекции:

1. Строение и функции иммуноглобулинов
2. Характеристика классов иммуноглобулинов.
3. Фазы синтеза иммуноглобулинов.
4. Характеристика моноклональных антител

##### 1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса № 1.

Гуморальный иммунитет – одна из форм приобретенного иммунитета, которая играет важнейшую роль в противомикробной защите организма. Гуморальный иммунитет обеспечивается специфическими антителами, вырабатываемыми плазматическими клетками, которые возникают в результате пролиферации и созревания стимулированных антигеном В-лимфоцитов. Он определяется по наличию в крови специфических антител (иммуноглобулинов). Считается, что патогенные микроорганизмы, размножающиеся в организме вне клеток, микробные токсины, обуславливают, чаще всего, гуморальный иммунитет.

Антитела – это особый класс белков, называемых иммуноглобулинами (Ig), которые вырабатываются под влиянием антигенов и обладают способностью специфически с ними реагировать. Первое специфическое антитело было обнаружено в 1890 году Берингом и Китагато. Молекулярная структура стала изучаться с 1937 года, благодаря исследованиям Тизелиуса и Кабата. Антитела могут нейтрализовывать токсины бактерий или вирусы (нейтрализующие антитела), осаждают растворимые антигены (преципитины), склеивать корпускулярные антигены (агглютинины), лизировать бактерии (лизины), повышать фагоцитарную активность лейкоцитов (опсонины).

Имуноглобулины содержатся в плазме крови (составляют треть белков плазмы) и в тканевой жидкости у всех млекопитающих. Некоторые молекулы иммуноглобулинов структурно связаны с цитоплазматической мембраной В-лимфоцитов и функционируют как антигенспецифические рецепторы. Другие присутствуют в плазме или лимфе как свободные молекулы. Синтез антител осуществляется плазматическими клетками (антителообразующими клетками, АОК), которые возникают при созревании В-лимфоцитов. Мембраносвязанные Ig незрелых В-лимфоцитов имеют ту же самую антигенсвязывающую специфичность, что и Ig, образуемые АОК. У большинства высших

млекопитающих обнаружено пять классов Ig: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. Иммуноглобулины – это бифункциональные молекулы. Одна их область предназначена для связывания с антигеном, другая осуществляет эффекторные функции (связывание с фагоцитарными клетками, с C1q, NK-клетками, с другими тканями организма).

Структура Ig. Белки иммуноглобулинов по химическому составу относятся к гликопротеинам. До 80 % Ig имеют константу седиментации 7S, небольшой процент – 19S. При электрофореze антитела с константой седиментации 7S обнаруживаются в гамма-глобулиновой области, отсюда название – иммуноглобулины.

Р.Портер и Д. Эдельман установили строение молекулы Ig. Молекулы Ig всех пяти классов состоят из полипептидных цепей: двух одинаковых тяжелых H-цепей (состоят из 440 аминокислот); двух одинаковых легких L-цепей (состоят из 220 аминокислот). Цепи соединены дисульфидными связями. Легкие L-цепи являются общими для всех классов и подклассов и бывают  $\kappa$  или  $\lambda$ . Тяжелые цепи имеют характерные особенности строения у каждого класса:  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ;  $\delta$ ;  $\epsilon$ . Каждая полипептидная цепь состоит из вариабельной (V) и стабильной или константной (C) частей, в которых имеются повторяющиеся сходным образом свернутые сегменты – домены. У L-цепи – 2 домена (1 домен в V-части, 1 – в C-части), у H-цепи – 4 домена (1 домен в V-части, 3 домена в C-части).

При обработке молекул Ig папаином они расщепляются на два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Fab-фрагмент может связываться с антигеном (без агглютинации и преципитации). Fc-фрагмент связывает комплемент, а также обеспечивает прикрепление IgG к Fc-рецептору клеточных мембран. При обработке пепсином образуется два Fab-фрагмента, которые действуют как полное антитело. Предполагается, что существует около 100000 антигенов и к каждому из них синтезируется свое антитело. Основой такой специфичности Ig является уникальность их активных центров. Активный центр (паратоп) представляет собой полость или щель, соответствующую пространственной конфигурации антигенной детерминанты. Активный центр формируется вариабельными участками H- и L-цепей. Изменчивость в аминокислотной последовательности в вариабельных областях H- и L-цепей ограничена в основном несколькими небольшими (3-4) гипервариабельными областями, которые пространственно сближены друг с другом и образуют антигенсвязывающий участок. Он по своим размерам должен быть достаточным, чтобы контактировать с антигенной детерминантой. Молекулы различных классов различаются по количеству активных центров. Так, IgG, IgE, IgD – бивалентны, IgA, IgM – поливалентны. Антигены и антитела связываются за счет: водородных связей, кулоновых сил между группами с разными зарядами, вандерваальсовых сил, только на очень близком расстоянии.

Активность связывания антител с антигеном характеризуется аффинитетом и авидностью. Аффинитет – это уровень сродства антитела к антигену, степень совпадения конфигурации активного центра и антигенной детерминанты. Авидность – это количество (валентность) и расположение активных центров, характеризующих «жадность» связывания. Чем выше авидность, тем слабее склонность иммунных комплексов к распаду. При равной аффинности, авидность у IgM выше, чем у IgG, т.к. у первых 10 активных центров.

В природе есть ряд антигенов, называемых суперантигенами (А-протеин стафилококка, кишечный сиалопротеин, ВИЧ-1 и др.), которые связываются не по активному центру антител, а по другим местам V-домена. Эти суперантигены могут связывать до 80 % всех Ig, лишая их возможности связывать свой специфический антиген.

У IgG, IgD, IgA между CH<sub>1</sub> и CH<sub>2</sub> расположен слабо спирализированный, не обладающий жесткой структурой подвижный домен – «шарнирный» участок. Он позволяет изменять расстояние между двумя антигенсвязывающими участками. Угол может быть от 0 до 100° и более.

Fc-фрагмент не участвуют в распознавании и связывании АГ, но он выполняет ряд других функций: активирует комплемент (IgM, IgG); встраивается в мембрану В-лимфоцитов (IgM, IgD), макрофагов (IgG); тучных клеток и базофилов (IgE) прикрепляется к плаценте (IgG); осуществляет контроль катаболизма иммуноглобулинов.

Понятие о изотипах, аллотипах, идиотипах. Изотипами иммуноглобулинов называют варианты классов и подклассов (вместе взятых). У человека насчитывается 9 изотипов (IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgD). Отдельные особи одного вида продуцируют несколько отличающиеся варианты иммуноглобулинов в пределах одноименного изотипа, которые называются аллотипами.

Идиотип антитела – это вариант уникального антигенсвязывающего участка молекулы иммуноглобулина.

## 2. Наименование опроса №2. Характеристика классов иммуноглобулинов

IgM – молекулярная масса 900000 D, 19S, пентамер (мономеры соединены J-цепью, десятивалентен), составляет 6% от всех Ig, средняя концентрация в сыворотке составляет 0,5-4 г/л, период полужизни составляет 5 дней. Способен агглютинировать, преципитировать, лизировать АГ, а также связывать комплемент. Первым появляется после заражения или вакцинации (первичной) и доминирует при первичном иммунном ответе.

IgG – молекулярная масса составляет 150000 D, 7S, мономер (двухвалентен), составляет до 80% от всех Ig, в сыворотке содержится в самой высокой концентрации – от 5 до 15 г/л, период полужизни составляет 23 дня. Способен агглютинировать, лизировать (с участием комплемента), нейтрализовывать токсины и вирусы, проходить через плаценту. Доминирует при вторичном иммунном ответе. У человека имеется 4 подкласса: IgG1 - 66 %, IgG2 – 23%, IgG3 – 7%, IgG4 – 4%. Концентрация IgG у детей достигает уровня взрослых только к 8 годам.

IgA – молекулярная масса мономера – 160000D, димера – 400000D, в сыворотке крови содержится в концентрации 0,5-3,5 г/л, на его долю приходится до 13% от всех Ig, период полужизни – 6 дней. Это основной класс антител в секретах (молоке, слюне, слезах, секретах дыхательных путей, пищеварительного и урогенитального трактов). У человека существует 2 подкласса - IgA1 и IgA2. Они различаются по H-цепям. В составе секретов IgA представлен димером (A1 или A2, мономеры соединены J-цепью). Этот димер имеет еще и секреторный компонент, вырабатываемый эпителиальными клетками действующий как рецептор в транспорте IgA через эпителиальные клетки, кроме того, он защищает IgA от протеолиза. Основная функция IgA – препятствовать проникновению в организм через слизистые оболочки различных антигенов и ингибировать колонизацию эпителия бактериями и вирусами, т.е. препятствует адгезии и адсорбции микроорганизмов. Особенно велика роль секреторного иммуноглобулина, содержащегося в молоке, для новорожденных. Поэтому не случайно из всех секретов молоко наиболее богато ими. В молоке IgA в 5 раз больше, чем в слюне и в 58 раз больше, чем в бронхоальвеолярной жидкости.

Ig D – молекулярная масса составляет 180000D, коэффициент седиментации - 7S, мономер, на его долю приходится 0,2 % от всех Ig, концентрация в сыворотке крови составляет от 0,00..... до 0,04 г/л, период полужизни – 3 дня. Этот класс не агглютинирует, не преципитирует, не лизирует. Выполняет роль рецептора на поверхности В-лимфоцитов. Но до конца его роль еще не выяснена.

IgE – молекулярная масса 200000 D, мономер, составляет 0,002 % от всех Ig, концентрация в сыворотке крови составляет от 0,00.... до 0,00002 г/л, период полужизни – 3 дня. После секреции плазматическими клетками он связывается с тучными клетками и базофилами. Участвует в аллергических реакциях (при этих состояниях концентрация его может увеличиваться до 1,6 г/л), а также в противопаразитарном иммунитете.

*Классы иммуноглобулинов у животных.* Крупный рогатый скот. До сих пор у крупного рогатого скота обнаружено три основных класса иммуноглобулинов (IgG, IgA,



IgM), которые по многим свойствам близки соответствующим классам иммуноглобулинов человека, однако, так же как и у глобулинов человека, легкие цепи не у всех из них одинаковы. Иммуноглобулин IgG представлен двумя подклассами — IgG1 и IgG2. Подкласс IgG2 электрофоретически менее подвижен, чем IgG1. Тяжелые цепи практически идентичны. В молозиве обнаружен только IgG1, который связывает комплемент, а IgG2 не обладает таким свойством. Легкие цепи иммуноглобулина IgA отличаются от таковых у IgG и IgM.

Мелкий рогатый скот. Имеется класс IgG. Описаны два антигенно родственных класса — IgG1 и IgG2 и подкласс IgG1a. Последний может быть гомологичным классу IgE. Имеются глобулины классов IgA и IgM.

Свиньи. Возможны два подкласса иммуноглобулина IgG: 19 S-иммуноглобулины с подвижностью, соответствующей и 7 S-иммуноглобулины. Полагают, что некоторые из последних глобулинов проходят через плаценту. Присутствует и хорошо определяется IgA. Имеется также IgM.

Собаки. Описано 6 антигенно-различных классов. Имеется, по-видимому, два подкласса иммуноглобулина IgG. Третий класс IgG с более высокой электрофоретической подвижностью не имеет очевидной аналогии ни с одним классом иммуноглобулинов человека. В молозиве обнаружен электрофоретически быстрый 7S, γ-класс IgG, который, возможно, аналогичен IgG(T) лошади, однако он отсутствует в слюне и слизистой оболочке бронхов. Иммуноглобулин IgA с константой седиментации между 7S и 19S обнаружен у собак в молозиве, слюне и слизистой бронхов. Он, по-видимому, является истинным аналогом Ig A. Присутствует также класс Ig M.

Домашняя птица. Имеются иммуноглобулины IgG, частично разрушающиеся 2-меркаптоэтанолом. Обнаружены два макроглобулина IgM с электрофоретической подвижностью, соответствующей фракции β<sub>2</sub>. Пока они не охарактеризованы.

### 3. Наименование вопроса №3.

Фазы развития гуморального иммунитета. Различают две фазы гуморального иммунитета – индуктивную и продуктивную. Под индуктивной фазой гуморального иммунитета понимают процессы, в течение которых В-лимфоциты получают ряд сигналов для своей пролиферации и дифференцировки. Различают два механизма включения В-лимфоцитов – Т-зависимый и Т-независимый. Первый требует участия активированных Т-хелперов (в качестве антигенпредставляющих клеток выступают активированные антигеном В-лимфоциты), которые дифференцируются в Тх-2 и секретируют цитокины, необходимые для дальнейшего развития и дифференцировки В-лимфоцитов (ИЛ-4, 5, 6, 10, 13).

При Т-независимом пути Т-хелперы не участвуют. Тимуснезависимые антигены связываются на поверхности лимфоцита одной своей частью с ВкР, а другой – с рецепторами для митогенов. При накоплении достаточного их уровня на поверхности клетки, включается митогенный сигнал, который инициирует пролиферацию и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки. Другие антигены имеют строение цепей с периодически повторяющимися фрагментами. Это способствует многоточечному связыванию рецепторов на поверхности В-лимфоцитов, которые и обуславливают включение митогенного сигнала. В дальнейшем, после нескольких стадий деления, наступает продуктивная фаза. Под продуктивной фазой гуморального иммунного ответа понимают процессы, в результате которых образуются эффекторные клетки – плазматические клетки, продуцирующие антитела, а также В-клетки памяти. Эти процессы происходят во вторичных фолликулах лимфатических узлов и в белой пульпе селезенки.

Основной же механизм дифференцировки В-лимфоцитов – это переключение синтеза мембранных иммуноглобулинов (ВкР) на растворимые молекулы, секретируемые во

внеклеточное пространство. Секретируемые антитела имеют ту же специфичность, что и ВкР. Синтез различных цепей иммуноглобулинов происходит на полирибосомах Плазматической клетки, сборка идет на мембранах комплекса Гольджи. Зрелая плазматическая клетка не делится и продуцирует антитела одной специфичности. Продолжительность жизни составляет 4-7 суток, после чего подвергается апоптозу.

Важную роль в процессе антителиобразования отводят переключению классов антител. Обычно на начальных этапах первичного иммунного ответа синтезируются в основном Ig M. Они появляются на 2-3 день после введения антигена. На более поздних этапах появляются IgG, IgA, IgE. Переключение на выработку этих более специфичных антител, обладающих более выраженным аффинитетом, осуществляется на уровне клеток-предшественников антителипродуцентов. При этом вначале изменяется класс мембранных рецепторов (ВкР). И при переключении на синтез секретируемых иммуноглобулинов класс антител больше не меняется. Для реализации переключения необходимо присутствие цитокинов: ИЛ-4,5,6 - для переключения на синтез IgG; ИЛ – 4, 13 – для переключения на синтез IgE; ИЛ – 5, 10 – для переключения на синтез IgA.

#### 4. Наименование вопроса №4.

Моноклональные антитела (монАТ), в отличие от поликлональных, являются продуктом секреции одной антителипродуцирующей клетки, либо ее потомков (клона), образовавшихся в процессе деления этой клетки. Все монАТ, являющиеся продуктом одного клона, представлены идентичными молекулами, отсюда вытекают основные свойства моноклональных антител:

### 1.7 Лекция №7 (2 часа).

**Тема: «Клеточный иммунитет. Иммунологическая память. Иммунологическая толерантность»**

#### 1.7.1 Вопросы лекции:

1. Клеточный иммунитет, его разновидности.  
Условия развития гуморального и клеточного иммунитета.
2. Иммунологическая память, клетки, отвечающие за иммунологическую память.
3. Иммунологическая толерантность, механизмы развития .

#### 1.7.2 Краткое содержание вопросов:

##### 1. Наименование вопроса № 1.

Клеточный иммунитет принципиально отличается от гуморального, и в первую очередь тем, что опосредуется Т-лимфоцитами. Он имеет особое значение при инфекциях, вызванных вирусами, многими бактериями и грибами (размножающимися внутри клеток), при отторжении трансплантата, в противоопухолевом иммунитете, при аутоиммунных заболеваниях

В зависимости от локализации патогена – в цитозоле или в гранулах, различают два типа клеточного иммунного ответа: цитотоксический и воспалительный.

Цитотоксический тип иммунного ответа. Осуществляется CD8+-лимфоцитами. Антигенный пептид презентуется в составе молекулы МНС 1 класса. Фактически Т-лимфоциты дублируют функции НК-клеток, но реализуют контактный киллинг на основе специфического распознавания антигена и формируя иммунологическую память. Цитотоксический иммунный ответ проходит в 4 этапа: 1) презентация дендритными клетками АГ CD8+-лимфоцитам; 2) ИЛ-2-зависимая пролиферация CD8+-лимфоцитов аутокринная или индуцированная CD4+-лимфоцитам; 3) дифференцировка CD8+-лимфоцитов в цитотоксические Т-лимфоциты; 4) реализация цитолиза клеток-мишеней.

Неиммунные ЦТЛ после выхода из тимуса имеют только программу для биосинтеза эффекторных молекул (цитотоксинов). После вовлечения их в иммунный ответ эта

программа начинает действовать. Происходит синтез цитотоксинов, они накапливаются в виде функционально неактивных молекул-предшественниц в гранулах. Гранулы сориентированы с ТкР, чтобы обеспечить возможность строго направленного киллерного удара. Сами цитотоксины неспецифичны по отношению к антигену. При работе ни сами ЦТЛ, ни здоровые клетки не повреждаются.

В гранулах ЦТЛ имеются перфорины и гранзимы. Перфорины, высвободившись из гранул в присутствии ионов  $\text{Ca}^{++}$ , в течение секунд полимеризуются в мембране клетки-мишени, липофильные участки ориентированы наружу, гидрофобные – внутрь клетки. Образуется пора (канал) диаметром до 16 нм. Через эту пору ЦТЛ инъецирует гранзимы. Существуют три типа гранзимов: А, В, С. Все они сериновые протеазы, внутриклеточными субстратами которых являются специальные ферменты, предназначенные для инициации программы апоптоза. На организацию сигнала на апоптоз ЦТЛ требуется не более 5 минут, после чего он переходит к другой клетке-мишени. После отделения отобранной клетки-мишени ЦТЛ может совершить еще несколько цитолитических актов. После реализации цитолиза на поверхности ЦТЛ остается метка в виде молекулы CD 107 (благодаря ей удастся определить численность выполнивших свою миссию ЦТЛ).

Существует еще один путь реализации апоптотического сигнала – с участием Fas-лиганда, экспрессируемого ЦТЛ и Fas-рецептора клетки-мишени. Наличие этого рецептора на поверхности клетки-мишени служит условием реализации данного механизма. Fas-рецептор относится к активационным молекулам, присутствующим на поверхности многих клеток человека и млекопитающих. Его экспрессии способствует инфицирование вирусом и опухолевая трансформация. Реже апоптоз клеток-мишеней вызывается ФНО- $\alpha$ .

Цитотоксический клеточный иммунитет участвует преимущественно в защите от вирусных инфекций, а также от некоторых одноклеточных паразитов (лямблий, например). Кроме того ему принадлежит важная роль в противоопухолевом иммунитете.

Из органов поражения дендритные клетки доставляют антигенные пептиды в лимфоидные органы ( в типичном случае – в регионарные лимфатические узлы), в Т-зонах антигены презентуются одновременно CD8+-и CD4+-лимфоцитам. Здесь же происходит пролиферация и дифференцировка цитотоксических лимфоцитов. Далее, благодаря смене мембранных молекул цитотоксические лимфоциты мигрируют в нелимфоидные ткани. В очагах инфекции они реализуют свою цитотоксическую функцию. После успешного завершения иммунного ответа в течение нескольких дней 90-95 % ЦТЛ подвергаются апоптозу и завершается формирование клеток памяти.

Воспалительный Т-клеточный иммунитет. Иммунного ответа предназначена для защиты от внутриклеточных паразитов, локализующихся в цитоплазматических гранулах, они фагоцитируются, но не разрушаются из-за недостатка адекватных эффекторных механизмов или их блокады патогенами. Типичные представители таких патогенов – различные виды микобактерий, риккетсии, хламидии, плазмодии и др.

Клеточный иммунитет воспалительного типа осуществляется в 4 этапа: 1) презентация дендритными клетками АГ CD4+-лимфоцитам, приводящая их к активации; 2) развитие ТХ-1; 3) презентация АГ макрофагами ранее сформировавшимся Тх-1, их взаимная активация и выделение цитокинов; 4) активация цитолиза в фагосомах макрофагов.

В «решении» вопроса (дилеммы) – пойдет ли ответ по клеточному или гуморальному типу – принимают участие многие факторы.

В дифференциации Тх-1 и развитию клеточного иммунитета способствуют:

- высокие или очень низкие дозы антигена;
- наличие в составе антигена гидрофобных групп;
- представление антигена макрофагами и дендритными клетками лимфатических узлов;
- высокие концентрации ИЛ-12 в микроокружении лимфоцитов;

- проникновение антигена через кожные барьеры.

Дифференцировке Тх-2 и развитию гуморального иммунитета способствуют:

- средние дозы антигена;
- презентация антигена В-лимфоцитами;
- высокие концентрации ИЛ-4 в микроокружении в селезенке, лимфатических узлах, в лимфоидной ткани слизистых оболочек;
- пероральное или интраназальное проникновение антигена.

Если образуется «перевес» той или иной популяции, то впоследствии это положение только укрепляется из-за антагонизма между Тх-1 и Тх-2. Организм как бы «нащупывает», какой механизм наиболее эффективен для нейтрализации возбудителя и затем концентрируется именно на нем, чтобы не растрачивать силы на неэффективные механизмы. Тем не менее, в естественных условиях недоминантные формы иммунного ответа могут сохраняться, особенно на ранних стадиях развития инфекционного процесса.

## 2. Наименование вопроса № 2.

Иммунологическая память. Доиммунные механизмы резистентности «не запоминают» свою реакцию на антиген. Он попадает в организм первый или десятый – реакция будет одинаковой. Лимфоцитарный иммунитет «запоминает». Феномен иммунологической памяти проявляется в том, что в случае успешного иммунного ответа при первичном попадании патогена в организм, при его повторных попаданиях санация организма наступает существенно быстрее и эффективнее, патоген не успевает вызвать патологический инфекционный процесс. Клетками памяти являются Т- и В-лимфоциты.

Вторичный иммунный ответ характеризуется следующим:

- 1) «стартовая» численность специфических к антигену клонов лимфоцитов при вторичном ответе многократно выше;
- 2) активация клеток происходит по «сокращенной» программе;
- 3) при вторичном ответе не требуется условий для реализации многих конкурирующих реакций (например, выбора между Тх-1 и Тх-2-дифференцировкой, переключения классов);
- 4) рециркуляция клеток памяти способствует готовности организма к быстрому и повсеместному контакту с антигеном в случае его проникновения.

Для В-клеток памяти характерно наличие на мембране IgG и IgA (а не IgM у нестимулированных лимфоцитов). У них на мембране экспрессированы молекулы Bcl-2<sup>++</sup>, обеспечивающие им длительную защиту от апоптоза. Изотип продуцируемых антител при вторичном иммунном ответе - это IgG, IgA, IgE, их аффинность высокая.

Для Т-клеток памяти характерно следующее: 1) Т-клетками памяти могут быть как CD4<sup>+</sup>-лимфоциты, так и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты; 2) на их мембране синтезируются молекулы Bcl-2<sup>++</sup> и CD45.

## 3. Наименование вопроса №3.

Иммунологическая толерантность. Помимо специфического иммунного ответа организм способен развивать специфическую ареактивность к тому или иному антигену. Это состояние приобретенной ареактивности получило название иммунологической толерантности; ее индуцирует предшествующий контакт с антигеном. Феномен приобретенной толерантности (терпимости), как и феномен иммунологической реактивности, строго специфичен, и индуцируемая ареактивность к одному антигену не отменяет полноценного ответа к другому. Активно функционирующие механизмы толерантности необходимы для предупреждения воспалительных реакций в ответ на многие безвредные антигены, попадающие в организм с воздухом и пищей и действующие на слизистую оболочку дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Однако наиболее важна толерантность к собственным антигенам организма; она предотвращает иммунный ответ против собственных тканей. Между тем такая

возможность существует, поскольку иммунная система продуцирует самые разнообразные антигенспецифические рецепторы, в том числе способные реагировать с аутоантигенами.

Центральная (происходящая в тимусе) толерантность к "своим" антигенам (аутоантигенам) обеспечивается делецией тех дифференцирующихся Т-клеток, ТкР которых обладают высоким сродством к собственным антигенам, локализованным в тимусе. Низкоаффинные аутореактивные Т-клетки, а также Т-клетки с рецепторами к тем антигенам, которые не представлены в тимусе, созревают и пополняют пул периферических Т-лимфоцитов. Таким образом в крови здоровых индивидов могут появиться аутореактивные Т-клетки, способные реагировать с пептидами собственных тканеспецифичных антигенов, в частности, белка миелина.

Для посттимической толерантности к собственным антигенам (то есть для предотвращения аутоагрессивного действия избежавших делеции Т-лимфоцитов) существует четыре механизма. "Игнорирование" Т-клетками антигенов собственных тканей организма. Циркулирующие в крови аутореактивные Т-клетки могут просто "не замечать" собственные антигены, например, если антигены локализованы в не связанных с циркуляцией тканях, например, если аутореактивные Т-лимфоциты не могут проникнуть через эндотелиальный барьер, отделяющий клетки с соответствующими аутоантигенами или если активация аутореактивных Т-клеток, проникших через этот барьер, не может произойти по одной из следующих причин: 1) недостаточное для распознавания количество аутоантигена; 2) недостаточность или отсутствие экспрессии молекул МНС на тканевых клетках, несущих данный антиген; 3) недостаточное для иммунной реакции число Т-клеток; 4) отсутствие костимуляции при презентации антигена. Анергия Т-клеток, т.е. состояние клеток, когда они становятся неспособными взаимодействовать с антигеном. Подавление функций этих клеток происходит за счет снижения экспрессии ТКР и корецепторных молекул. Но такая форма регуляции слишком ненадежна, так как всегда существует опасность ее отмены под влиянием цитокинов, в частности ИЛ-2.

- Гибель Т-клеток. Для поддержания толерантности к собственным антигенам и гомеостаза иммунной системы важное значение имеет делеция Т-клеток вне тимуса, когда после активации антигеном большинство Т-клеток погибает в результате апоптоза. Это механизм служит для контроля аутоиммунных реакций и поддержания оптимального пула лимфоидных клеток.

- Иммунное отклонение (иммуносупрессия). Периферическая толерантность к антигенам может быть "заразительной", когда экспериментально индуцированная толерантность к одному антигену поддерживает толерантность или подавляет иммунный ответ на другой антиген, пока оба антигена структурно или физически связаны (например, локализованы в одной и той же ткани). Это указывает на механизм толерантности, отличный от "игнорирования" антигена или клеточной гибели. Одно из предложенных для данной формы толерантности объяснений предполагает существование двух популяций Т-лимфоцитов, продуцирующих разные цитокины: хелперных ТН1-клеток и хелперных ТН2-клеток. В результате возникает, например, индуцированное ИЛ-10 (ТН2-клетками) подавление воспалительной реакции или, в свою очередь, индуцированное ИФ-гамма (ТН1-клетками) подавление дифференцировки ТН0-клеток в ТН2-клетки. Феномен иммунного отклонения распространяется и на собственные антигены, поскольку развитие таких заболеваний, как диабет и воспалительный процесс в кишечнике, вызываемых хелперными ТН1-клетками, может быть предотвращено стимулированными антигеном хелперными ТН2-клетками.

В-клеточная толерантность к собственным антигенам. Продукция высокоаффинных IgG зависит от Т-клеток. Из-за этого, а также потому, что порог чувствительности Т-клеток к индукции толерантности ниже, чем у В-клеток, предполагается, что ареактивность В-клеток по отношению к собственным антигенам определяется отсутствием Т-клеточной помощи, соответствующие аутореактивные В-клетки будут

неспособны продуцировать аутоантитела. Толерантность В-клеток может индуцироваться также прямым воздействием антигена как во время их развития, так и после антигенной стимуляции. Аутореактивные В-клетки либо делетируются, либо становятся анергичными. Это зависит от аффинности антигенных рецепторов В-клеток и природы соответствующего антигена, в частности от того, является ли он интегральным белком клеточной мембраны или представляет собой растворимый циркулирующий, в основном мономерный белок. В-клетки, реагирующие на мембраносвязанные аутоантигены в конечном итоге делетируются: они имеют короткую продолжительность жизни и, можно сказать, обречены на гибель (вероятно, вследствие апоптоза) в костном мозге еще до поступления в периферические лимфоидные ткани. В-клетки, связывающие растворимые аутоантигены в периферических лимфоидных тканях, становятся анергичными (при условии, что концентрация антигена превышает некий критический уровень). Эффект анергии сопровождается прекращением созревания В-клеток и неспособностью взаимодействовать с хелперными Т-клетками, что косвенно обусловлено отсутствием экспрессии IgM. Кроме того, время полужизни анергичных В-клеток составляет лишь несколько суток, тогда как у нормальных периферических В-лимфоцитов оно равно нескольким неделям.

Толерантность можно индуцировать искусственно различными способами, и некоторые из них применимы в медицине для предотвращения отторжения чужеродных трансплантатов и лечения аутоиммунных заболеваний.

## **1.8 Лекция №8 (2 часа).**

### **Тема: «Иммунопатологии»**

#### **1.8.1 Вопросы лекции:**

1. Аллергии
2. Иммунодефициты, классификация, краткая характеристика.
3. Аутоиммунные заболевания, причины их вызывающие, их краткая характеристика.
4. Иммунопролиферативные заболевания, краткая характеристика

#### **1.8.2 Краткое содержание вопросов:**

1. Наименование вопроса №1.

Аллергия – состояние повышенной чувствительности животного организма к определенному веществу (аллергену), развивающееся при повторном воздействии этого вещества. Понятие было предложено в 1906 году австрийским педиатром Клеменсом Пирке. Аллергические реакции или реакции гиперчувствительности, как и другие иммунологические реакции, могут быть индуцированы либо собственными антигенами (аутоантигенами), либо чужеродными, но все они будут называться аллергенами.

Аллергические реакции (реакции гиперчувствительности) служат причиной развития многих патологических процессов и болезней. Вместе с тем, реакции гиперчувствительности являются компонентами защиты, например, от туберкулеза, бруцеллеза и др. Развитие гиперчувствительности в организме человека и животных к каким-либо аллергенам называют сенсibilизацией. В 1930 году Кук классифицировал эти реакции на гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) и гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). В 1969 году Джелл и Кумбс предложили классификацию аллергических реакций в зависимости от иммунологических механизмов. Согласно их классификации все аллергические реакции делятся на 4 типа:

- I тип – анафилактический;
- II тип – цитотоксический;
- III тип – иммунокомплексный;

IV тип – клеточный.

Первые три типа относятся к ГНТ, а последний к ГЗТ.

Классификация аллергенов:

- 1) бытовые (домашняя пыль, перхоть, пух, постельные клещи и др.);
- 2) грибковые (кандиды, трихофиты, актиномицеты и др.);
- 3) животного происхождения (эпидермис, яды перепончатокрылых, клещи и др.);
- 4) лекарственные (вакцины, сыворотки, препараты йода, антибиотики, витамины, сульфаниламиды и др.);
- 5) пищевые (коровье молоко, белки куриных яиц, рыба, ракообразные, цитрусовые, кофе, орехи, мед и др.);
- 6) растительные (пыльца, сок растений);
- 7) микробные или инфекционные (возбудитель туберкулеза, бруцеллеза, сапа, герпеса и др.)

Стадии развития аллергических реакций:

I стадия – иммунологическая. После первого контакта организма с аллергеном образуются аллергические антитела или сенсibilизированные Т-лимфоциты (ТГЗТ или Тх-1). Они накапливаются и организм становится сенсibilизированным к этому аллергену. Если этот аллерген попадает в организм повторно, образуются комплексы АГ-АТ или АГ-сенсibilизированные Т-лимфоцит;

II стадия – патохимическая. Комплексы АГ-АТ или АГ-сенсibilизированные Т-лимфоцит запускают процесс образования (или выделения готовых) биологически активных веществ (БАВ);

III стадия – патофизиологическая. В ответ на выделившиеся БАВ происходят изменения в работе клеток, тканей, органов.

Эффекты основных БАВ

Эффекты гистамина:

- сокращение гладких мышц бронхов (бронхоспазм);
- сокращение гладких мышц кишечника (диарея);
- расширение мелких кровеносных сосудов, сужение крупных сосудов (артериальная гипотония);
- повышение проницаемости сосудов (отек);
- стимуляция секреции слизи слизистой желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей.

Механизмы аллергических реакций 1-4 типов.

I тип – анафилактический. Иммуноглобулины, участвующие в реакции - Ig E и IgG4. Ig E обладает цитотропностью, т.е. способностью прикрепляться к клеткам.

Патогенез

1. Иммунологическая стадия - при проникновении аллергена в организм происходит цепь реакций, похожая на таковую при гуморальном иммунном ответе. Под действием ИЛ-4 и ИЛ-13 плазматические клетки начинают вырабатывать Ig E. ИЛ-4 не только стимулирует синтез Ig E, он необходим для переключения синтеза на Ig E с синтеза других классов иммуноглобулинов. Ig E фиксируется к Fc-фрагменту к Fc-рецепторам клеток-мишеней 1 порядка – тучных клеток (находятся в соединительной ткани) и базофилов (циркулируют в крови). Ig E могут фиксироваться на поверхности макрофагов, моноцитов, эозинофилов, тромбоцитов и лимфоцитов (клетки-мишени II порядка), но в меньшей степени. Фиксированные антитела могут длительное время находиться на поверхности клеток. При попадании аллергена в организм повторно, на тучных клетках и базофилах образуются иммунный комплекс - АГ- Ig E. Если аллерген оказался связанным хотя бы с двумя соседними Ig E, то тучные и базофилы активируются.

2. Патохимическая стадия. Комплекс АГ- Ig E приводит к дегрануляции тучных клеток и базофилов, т.е. высвобождаются БАВ: гистамин; гепарин; лейкотриены; простагландины;

ферменты (катепсин G, карбоксипептидаза и др.); цитокины (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и др.). После дегрануляции клетка остается жизнеспособной. В ответ на БАВ к месту попадания в организм антигена устремляются нейтрофилы, эозинофилы (выделяют ферменты, катионные белки, лейкотриены и основной белок, повреждающий эпителий) и макрофаги. Каждый тип клеток выделяет свои медиаторы воспаления и ферменты. Часть из них повреждает ткани, другие разрушают повреждающие медиаторы.

3. Патофизиологическая стадия. Под воздействием медиаторов гладкие мышцы сокращаются (отмечается спазм), увеличивается сосудистая проницаемость (наблюдается отек). При локализации процесса на слизистых оболочках – гиперсекреция. Клинические проявления: приступы бронхиальной астмы; ринит; конъюнктивит; крапивница; кожный зуд; местный отек; диарея и др.

Второй тип аллергических реакций — цитотоксический, при котором аллергенами становятся клетки ткани. Обычно это происходит в результате повреждающего действия лекарственных препаратов, ферментов бактерий и вирусов при инфекционных процессах, а также лизосомальных ферментов фагоцитов. В ответ на появление измененных клеток образуются антитела, представленные главным образом классами IgG и IgM. Антитела соединяются с соответствующими клетками, что приводит к включению одного из двух цитотоксических механизмов — комплементарного или механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности. Вид механизма зависит от характера антител (класс, подкласс) и их количества, фиксированного на поверхности клетки. В первом случае наступает активация комплемента, образуются активные его фрагменты, вызывающие повреждение клеток и даже их разрушение. Во втором случае к антителам, фиксированным на поверхности клетки-мишени, присоединяются так называемые К-клетки. Обычно это особый вид лимфоцитов, образующих супероксидный анион-радикал (активную форму кислорода), который повреждает клетку-мишень. Поврежденные клетки фагоцитируются макрофагами. К цитотоксическому типу реакций относятся такие проявления лекарственной аллергии, как лейкопения, тромбоцитопения, гемолитическая анемия и др. Этот же тип реакции наблюдается при попадании в организм аллогенных антигенов, например при переливании крови (в виде аллергических гемотрансфузионных реакций), при гемолитической болезни новорожденных.

Третий тип аллергических реакций — повреждение тканей иммунными комплексами, иммунокомплексный тип. Аллерген в этих случаях присутствует в растворимой форме (бактериальные, вирусные, грибковые антигены, лекарственные препараты, пищевые вещества). Образующиеся антитела относятся главным образом к классам IgG и IgM. Эти антитела называют преципитирующими за их способность образовывать преципитат при соединении с соответствующим антигеном. В определенных условиях такой иммунный комплекс может откладываться в тканях, чему способствуют повышение проницаемости сосудистой стенки; образование комплекса в небольшом избытке антигена; снижение активности фагоцитирующих клеток, что ведет к угнетению процесса очищения организма от иммунных комплексов и к увеличению времени их циркуляции в организме. Отложившиеся в тканях комплексы взаимодействуют с комплементом. Образуются его активные фрагменты, которые обладают хемотаксической активностью, стимулируют активность нейтрофилов, повышают проницаемость сосудов и способствуют развитию воспаления. Нейтрофилы фагоцитируют иммунные комплексы и при этом выделяют лизосомальные ферменты. Усиливается протеолиз в местах отложения иммунных комплексов. В результате происходит повреждение тканей и как реакция на это повреждение возникает воспаление. Третий тип аллергических реакций является ведущим в развитии сывороточной болезни, экзогенных аллергических альвеолитов, в некоторых случаях лекарственной аллергии и пищевой.

Четвертый тип аллергических реакций — аллергическая реакция замедленного типа (гиперчувствительность замедленного типа, клеточная гиперчувствительность). При этом типе реакций роль антител выполняют сенсibilизированные лимфоциты, имеющие на



своих мембранах структуры, аналогичные антителам (рис. 4). Реакция замедленного типа в сенсibilизированном организме проявляется через 24—48 ч после контакта с аллергеном. В основе реакций замедленного типа лежит образование так называемых сенсibilизированных Т-лимфоцитов (Т-киллеров). При хронических инфекциях, таких как туберкулез, бруцеллез, токсоплазмоз, вирусный гепатит, возбудитель размножается внутриклеточно, и возникает необходимость уничтожения инфицированных клеток, что и осуществляют Т-киллеры — субпопуляция Т-лимфоцитов, способная узнавать инфицированные клетки. В процессе этой реакции выделяются интерлейкины, другие медиаторы, привлекающие к месту событий вначале нейтрофилы. Затем нейтрофильная инфильтрация сменяется мононуклеарной, появляются эпителиоидные клетки и формируется гранулема. Контактные дерматиты также вызываются реакциями замедленного типа: простые химические соединения, например соли хрома, присоединяются к белкам клеток кожи, и эти белки становятся чужеродными для организма (аутоаллергенами); развивается сенсibilизация, а при повторных контактах с аллергеном возникает заболевание. Аллергические реакции замедленного типа на условно-патогенные микроорганизмы (стафилококки, стрептококки, грибки) лежат в основе таких аллергических заболеваний, как инфекционно-аллергические бронхиальная астма и риниты, аллергические конъюнктивиты и др. Этот тип реакции используется для диагностики инфекционных заболеваний при помощи аллергенов, например, туберкулез — при помощи туберкулина, бруцеллез — бруцеллина, туляремия — тулярина, сальмонеллез — маллеина и т.д.

## 2. Наименование вопроса №2.

Иммунодефициты, классификация, краткая характеристика

Иммунодефициты подразделяются на первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные).

Первичные иммунодефициты — это врожденные дефекты иммунной системы. В основу современной классификации первичных иммунодефицитов положено преимущественное поражение того или иного звена иммунитета. Согласно этой классификации, первичные иммунодефициты делятся на 5 групп: 1) недостаточность гуморального иммунитета составляет 50—60% всех первичных иммунодефицитов и проявляется нарушением продукции антител; 2) недостаточность клеточного иммунитета составляет 5—10% всех первичных иммунодефицитов и проявляется нарушением пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, первичное нарушение клеточного иммунитета в большинстве случаев сопровождается вторичным нарушением синтеза антител; 3) комбинированная недостаточность гуморального и клеточного иммунитета составляет 20—25% всех первичных иммунодефицитов, в эту группу входят заболевания, обусловленные первичным нарушением пролиферации и дифференцировки В- и Т-лимфоцитов, характерны снижение числа Т-лимфоцитов и уровня иммуноглобулинов в крови, которое наиболее выражено при тяжелом комбинированном иммунодефиците, комбинированной недостаточности гуморального и клеточного иммунитета часто сопутствуют другие врожденные заболевания; 4) недостаточность фагоцитов составляет 10—15% всех первичных иммунодефицитов, недостаточность фагоцитов обусловлена нарушением пролиферации, дифференцировки, хемотаксиса нейтрофилов и макрофагов и собственно процесса фагоцитоза, недостаточность фагоцитов часто сопровождается тяжелыми инфекциями; 5) недостаточность комплемента составляет не более 2% всех первичных иммунодефицитов, проявляется нарушением опсонизации, фагоцитоза и разрушения микроорганизмов и сопровождается тяжелыми инфекциями, вплоть до сепсиса, недостаточность комплемента часто наблюдается при аутоиммунных заболеваниях.

Основными клиническими проявлениями формирующегося иммунодефицита является развитие инфекций, аллергий, аутоиммунных, опухолевых заболеваний. Возбудителями инфекций часто являются условно-патогенные возбудители. При

нарушениях в Т-системе иммунитета чаще развиваются инфекции, вызываемые внутриклеточными паразитами. При недостаточности иммуноглобулинов повышается чувствительность к кокковой флоре. При нарушениях в системе фагоцитирующих клеток увеличивается восприимчивость к бактериальным (внеклеточным) и некоторым грибковым инфекциям (кандидоз, аспергиллез). Иммунная недостаточность, возникающая на фоне инфекционного процесса, часто является основной причиной его хронизации.

### 3. Наименование вопроса №3.

Аутоиммунные заболевания (АЗ). Это разнородных по клиническим проявлениям заболевания, развивающиеся вследствие патологической выработки аутоиммунных антител или размножения аутоагрессивных клонов Т-киллеров против здоровых тканей организма, приводящих к повреждению и разрушению этих тканей и к развитию аутоиммунного воспаления. Возможные причины: 1) инфицированием организма каким-то инфекционным агентом, антигенные детерминанты (эпитопы) важнейших белков которого напоминают антигенные детерминанты нормальных тканей организма хозяина; 2) вызванная инфекционным агентом деструкция или некроз тканей, или изменение их антигенной структуры так, что патологически изменённая ткань становится иммуногенной для организма хозяина; 3) нарушение целостности тканевых (гистогематических) барьеров, в норме отделяющих некоторые органы и ткани от крови и, соответственно, от иммунной агрессии лимфоцитов хозяина; 4) гипериммунное состояние (патологически усиленный иммунитет) или иммунологический дисбаланс с нарушением «селекторной», подавляющей аутоиммунитет, функции тимуса или со снижением активности супрессорных реакций и повышением активности киллерных и хелперных субпопуляций. К аутоиммунным заболеваниям у животных относят: диабет, хронический тиреоидит, атрофический гастрит, язвенный колит, первичный цирроз печени, орхиты, полиневриты, ревмокардит, гломерулонефрит, ревматоидный артрит, дерматомиозит, гемолитическую анемию.

### 4. Наименование вопроса №4.

*Иммунопролиферативные заболевания.* Группа этих заболеваний объединяет патологические иммунопролиферативные процессы, которые исходят из клеток иммунной системы. Патология включает широкий спектр состояний от доброкачественных инфекций (инфекционный мононуклеоз) до нарушений злокачественного характера. Среди иммунопролиферативных состояний можно выделить ситуации с выраженным клеточным полиморфизмом или с преобладанием однотипных клеточных форм. Различают лейкозы (лимфопролиферативные заболевания, возникающие в костном мозге) и лимфомы (опухоли, первично возникающие в лимфоидной ткани, расположенной вне костного мозга). На развитие лейкозов, возможно, оказывают влияние ионизирующее излучение, химические и вирусные канцерогены и др. Происходит пролиферация клона клеток лимфоидного или миелоидного ростка, замершего на определенной стадии дифференцировки. Клетки накапливаются в костном мозге, а потом выходят в кровь. Различают острый и хронический лейкоз.

## 1.9 Лекция №9 (2 часа)

**Тема:** «Иммунобиологические препараты»

### 1.9.1 Вопросы лекции:

1. Определение и классификация иммунобиологических препаратов.
2. Характеристика вакцинных препаратов.
3. Характеристика иммунных сывороток и иммуноглобулинов.
4. Иммуномодуляторы

### 1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. Наименование вопроса №1.

Иммунобиологическими называются препараты, которые действуют на иммунную систему или через иммунную систему. Биологическая промышленность выпускает различные биологические препараты, которые подразделяются на следующие группы: вакцины; лечебно-профилактические иммунные сыворотки и иммуноглобулины; диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины; диагностические антигены и аллергены; бактериофаги; иммуномодуляторы.

## 2 Наименование вопроса №2.

Вакцины - средства специфической активной иммунопрофилактики. Вакцины могут содержать в своем составе: антиген; адъювант; консервант; стабилизатор.

В зависимости от природы антигена вакцины бывают: живые, инактивированные, химические, анатоксины, рекомбинантные, комбинированные и др.

*Живые вакцины.* Готовят из штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью (аттенуированных). Главное требование, предъявляемое к вакцинным штаммам, - наличие стойкой, наследственно передающейся авирулентности. При введении таких штаммов микроорганизмов в организм культура должна приживаться и размножаться, но не вызывать клинических проявлений болезни, что приводит к созданию иммунитета высокой напряженности и длительности. Вакцинные штаммы получают различными способами. Использование аттенуированных штаммов, возникших в естественных условиях обитания возбудителей инфекционных болезней. Искусственное получение аттенуированных штаммов возбудителей в лабораторных условиях: 1) выращивание возбудителя на искусственных питательных средах; 2) перевод возбудителя на другой вид восприимчивого животного; 3) перевод возбудителя на невосприимчивый вид животного. Ослабление вакцинных штаммов прямым (непосредственным) воздействием на ген возбудителя мутагенами физической природы (проникающая радиация, ультрафиолетовое излучение, пониженная или повышенная температура и др.). Комбинированные методы получения вакцинных штаммов в лабораторных условиях. Для приготовления вакцин аттенуированные штаммы возбудителей культивируют на специальных питательных средах в реакторах, куриных эмбрионах или культурах клеток и тканей. Полученную биомассу очищают от балластов, добавляют стабилизатор (сахарозу, желатин, глютамат натрия и др. - для лучшей сохранности клеток) и после проверки на безвредность, микробную загрязненность и активность в соответствии с общепринятыми методами используют для иммунизации животных и птиц. Живые вакцины имеют ряд преимуществ перед вакцинами других типов: главное из них - высокая иммуногенность, т. е. создание иммунитета высокой напряженности и длительности, приближающегося к постинфекционному; однократная иммунизация; возможность введения естественными путями и др. Среди недостатков живых вакцин следует отметить следующее: необходимость соблюдения мер предосторожности при их транспортировке и хранение при температуре 4-10°C; поствакцинальные реакции и осложнения; реверсия вирулентности; после вакцинации бактериальными вакцинами нельзя применять в течение 7 суток антибактериальные препараты. В настоящее время биопромышленность выпускает живые вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза, бруцеллеза, туляремии, листериоза, рожи свиней, сибирской язвы и др.

*Инактивированные вакцины.* Для приготовления инактивированных вакцин в качестве вакцинного штамма используют высоковирулентные и иммуногенные штаммы микроорганизмов, выращенные в жидких питательных средах в реакторах; выход бактериальной массы с плотных питательных сред незначительный. После культивирования бактериальную массу собирают и инактивируют. При использовании жидких питательных сред культуру возбудителя вначале инактивируют в том же реакторе, где производилось выращивание, а затем микробную массу отделяют от жидкой фракции центрифугированием. Если применяют плотные питательные среды, то выросшую на них культуру смывают физиологическим раствором в стерильные бутылки, в которых ее инактивируют. Для инактивации микроорганизмов применяют физические факторы

(нагревание) и химические вещества (в основном, формалин). Количество добавляемого формалина должно быть небольшим (от 0,2 до 0,5 %, при температуре 37°C в течение нескольких недель), так как в более высокой дозе он отрицательно действует на антигенную структуру микроорганизмов. Для повышения эффективности инаktivированных вакцин применяют адъюванты, на которых микробные тела адсорбируются (алюминиевые квасцы, гидроксид алюминия), или их эмульгируют в минеральных маслах. Это необходимо для создания «депо» на месте введения препарата, что способствует длительному воздействию микробного антигена на организм животного и обуславливает более высокий уровень образования антител. Кроме адъювантов в инаktivированные вакцины добавляют консерванты (для предотвращения контаминации препарата посторонней микрофлорой). Примеры инаktivированных вакцин: концентрированная формолквасцовая вакцина против паратифа телят; концентрированная гидроокисьалюминиевая формолвакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец.

*Химические вакцины.* Представляют собой антигены и антигенные комплексы, извлеченные из микробных культур тем или иным способом и в той или иной степени очищенные от балластных иммунизирующих веществ. В отдельных случаях извлеченные антигены являются в основном бактериальными эндотоксинами, полученными в результате обработки культур различными способами. Другие представляют собой «протективные антигены», продуцируемые некоторыми микробами в процессе жизнедеятельности в организме животных или в специальных питательных средах при соответствующих режимах культивирования (например, протективный антиген сибиреязвенных бацилл). Обязательный компонент – адъювант.

*Анатоксины.* Анатоксин (от греч. ана - обратное, противоположное действие и токсин - яд) – это токсин, утративший свою токсичность под действием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. Активная профилактика болезней, вызываемых токсинообразующими микроорганизмами, основана на применении анатоксинов. Это аналоги инаktivированных вакцин - препараты обезвреженного токсина, очищенного от балластных веществ, сконцентрированного и адсорбированного (чаще на алюмокалиевых квасцах для повышения его иммуногенности). Метод перевода экзотоксина в анатоксин был разработан французским иммунологом Г. Рамоном (1923), который установил, что прибавление к токсину формалина в небольших количествах и выдерживание при 37°C в течение месяца лишает его токсичности, но сохраняет иммунизирующую активность. Примером служит столбнячный, стафилококковый анатоксин.

*Поливалентные вакцины.* Готовят из нескольких типов одного вида микроорганизмов (например, поливалентная вакцина против лептоспироза).

*Ассоциированные вакцины.* Содержат антигены разных видов возбудителей. Это направление в вакцинопрофилактике очень перспективное, так как позволяет одновременно вакцинировать против нескольких болезней (например, ассоциированная вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула, вакцина ВАКДЕРМ, ПОЛИВАК-ТМ).

Живые вакцины проверяют на чистоту роста, безвредность, иммуногенность. Инаktivированные препараты проверяют на стерильность, безвредность, иммуногенность. Для контроля на стерильность используют различные питательные среды, которые обеспечивают надежное выявление аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов и дрожжей. При выявлении бактерий приготовленные препараты уничтожают. Важнейшим элементом контроля на безвредность является проверка вакцины на лабораторных и тех животных, для которых она предназначена. Обычно для этого используют от 3 до 5 животных на каждую серию изготовленной партии; одновременно проводят проверку на лабораторных животных. Вакцина безвредна, если у привитых животных она не вызывает никаких патологических симптомов и ухудшения их

общего состояния. Одним из наиболее важных свойств вакцины является ее иммуногенность. Иммуногенность препаратов определяют следующим образом: животных, обладающих чувствительностью к микробам, из которых приготовлены вакцины, иммунизируют этими препаратами. Через определенные промежутки времени (14-21 суток) иммунным и контрольным животным вводят установленную дозу культуры микроба (LD 50, или смертельная доза), затем наблюдают за ними в течение определенного периода времени (сроки зависят от особенностей возбудителя). При заболевании (или гибели) контрольных животных иммунизированные животные должны остаться живыми и здоровыми.

### 3. Наименование вопроса №3.

Изготовление лечебно-профилактических иммунных сывороток и иммуноглобулинов производит биологическая промышленность. В качестве продуцентов иммунных сывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию осуществляют нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации, интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения антигена и реакцией продуцента на последний. По окончании цикла иммунизации, когда в сыворотке крови продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных берут кровь. Чаще это делают на 10-14 сутки после введения продуценту последней дозы антигена. Из крови выделяют сыворотку общепринятыми методами и стерилизуют ее через бактериальные фильтры или методом тиндализации. В качестве консервантов используют 0,25-0,5% растворы фенола, 0,01-0,03% растворы тиомерсала (мертиолята) или другие. Контроль на стерильность сыворотки проводят по общепринятой методике высевками из препарата на питательные среды (МПА, МПБ с глюкозой, МППБ и на агар Сабуро). Безвредность каждой серии сывороточных препаратов проверяют на лабораторных животных, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки. Они должны оставаться здоровыми, без выраженных проявлений местной и общей реакции.

Специфическую активность сывороточных препаратов определяют с помощью реакции биологической нейтрализации: чем меньше доза сыворотки, способная нейтрализовать действие определенной дозы инфекционного агента или токсина, тем выше ее активность.

На каждую проверенную серию сыворотки заполняют паспорт, в котором указывают основные показатели: биофабрику, изготовившую сыворотку, название препарата, номер серии, дату изготовления, метод консервирования, титры, сроки и способы хранения. На этикетке указывают лечебные и профилактические дозы в зависимости от вида и возраста животных. Вводят сыворотку обычно внутримышечно или внутривенно.

Гипериммунные сыворотки применяют для лечебных и профилактических целей, так как они создают лишь временный пассивный иммунитет. Иммунитет наступает в ближайшие часы после введения сыворотки (2-3 ч) и не превышает 2-3 недель.

В ветеринарии применяют сыворотки (примеры): поливалентную антитоксическую сыворотку против паратифа телят, ягнят, овец и птиц; поливалентную антитоксическую сыворотку против колибактериоза телят, поросят, ягнят; гипериммунную сыворотку против пастереллеза крупного рогатого скота, буйволов, овец и свиней; сыворотку против рожи свиней; антитоксическую сыворотку против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец; антитоксическую противостолбнячную сыворотку. Сыворотка реконвалесцентов. Эта сыворотка крови переболевших животных, содержащая специфические антитела, применяется с лечебной и профилактической целями. Сыворотку реконвалесцентов рекомендуется получать и применять животным в одном и том же хозяйстве. Кровь от животных-доноров берут непосредственно в хозяйстве или во время убоя их на мясокомбинате.

*Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины.* Получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (возбудителем). В большинстве случаев продуцентами сывороток являются лабораторные животные (кролики, морские свинки), петухи и реже лошади. Иммуноглобулины. Важнейшей составной частью сыворотки крови являются белки, основная масса которых представлена альбуминами и глобулинами. Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки. С целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования последних. Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них активных белковых фракций - иммуноглобулинов - и удалении балластных фракций, не являющихся носителями антител. Иммуноглобулины намного превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из нативной сыворотки. В настоящее время выпускают специфические иммуноглобулины против бешенства, столбняка, сибирской язвы и др. Иммуноглобулины вводят подкожно или внутримышечно в дозах 0,5-2,0 мл/кг массы тела.

#### 4. Наименование вопроса №4.

Иммуномодуляторы (иммунокорректоры) — группа препаратов биологического (из органов животных, растительного сырья), микробиологического и синтетического происхождения, восстанавливающих функции иммунной системы. Иммуномодуляторы достаточно условно разделяют на иммуностимуляторы — вещества, повышающие иммунитет, и иммуносупрессанты (иммуносупрессоры), понижающие иммунитет. Иммуномодуляторы применяют в комплексной терапии хронических инфекций, опухолевых заболеваний, при иммунодефицитных состояниях, аллергических заболеваниях и др. Однако в некоторых случаях, особенно при так называемых аутоиммунных болезнях, когда иммунная система человека работает против организма, применяются лекарственные препараты, снижающие иммунитет.

Иммуномодуляторы имеют сложную классификацию. Они разделены на три большие группы: 1) эндогенные (синтезируемые самим организмом) вещества и их синтетические аналоги; 2) экзогенные (попадающие извне) вещества и их синтетические аналоги; 3) синтетические (химически чистые) вещества. К группе эндогенных препаратов относятся известные большинству иммуноглобулины, сыворотки, интерфероны. Все они могут синтезироваться самим организмом при патологическом процессе (например при гриппе) или быть полученными в лабораторных условиях и «добавляться» организму, когда необходимо поддержать иммунную защиту. В состав экзогенных препаратов входят различные вещества, которые вырабатываются вне нашего организма или получены химическим путем. Примеры таких препаратов - РИБОМУНИЛ, ИРС-19, ИМУДОН, БРОНХО-МУНАЛ, УРОВАКСОМ и др.). Третья группа — синтетические, нигде не встречаемые в природе вещества; они могут быть получены только синтетическим путем (ПОЛИОКСИДОНИЙ, КАГОЦЕЛ, ИММУНОМАКС, ТИМАЛИН, ТИМОПТИН и др.)

## 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

### 2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

**Тема: «Вводное занятие»**

**2.1.1 Цель работы:** познакомить с дисциплиной, с литературой, со схемой набора баллов в 4 семестре

#### 2.1.2 Задачи работы:

1. Дать определение иммунологии, ознакомить с часами, отведенными на эту дисциплину.

2. Ознакомить с рейтинговой системой по данной дисциплине.
3. Ознакомить с учебной литературой по иммунологии.
4. Провести входной контроль.

## **2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).**

**Тема: «Тканевые факторы неспецифической защиты. Механические барьеры (кожа, слизистые оболочки). Определение бактерицидности кожи. Воспаление».**

**2.2.1 Цель работы:** характеристика механических барьеров (кожи и слизистых оболочек) в защите организма. Стадии воспаления.

### **2.2.2 Задачи работы:**

1. Характеристика механических барьеров.
2. Определение бактерицидной активности кожи.
3. Характеристика стадий воспаления.

### **2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Взвесь культуры *E.coli* в физиологическом растворе.
2. Предметные стекла с пластинками агара Эндо, стерильные квачи, спиртовые тампоны.
3. Таблицы, стенды.

### **2.2.4 Описание (ход) работы:**

Отличительными чертами врожденных защитных механизмов являются их постоянное присутствие в организме вне зависимости от действия различных факторов и отсутствие выраженной специфичности, т. е. сходность проявления при действии различных факторов. Такого рода защитные механизмы способны одновременно защищать организм от целого ряда факторов практически сразу после рождения, тогда как специфические защитные реакции отсутствуют в организме изначально и возникают в течение жизни в результате контакта с конкретным антигеном и обладают ярко выраженной специфичностью, т. е. защищают только от того антигена, который и вызвал проявление этого механизма.

Факторы врожденного иммунитета являются первым барьером или эшелонem защиты от биологической агрессии, К факторам врожденного иммунитета относят: непроницаемость покровов (кожа, слизистые оболочки), лизоцим, гидролитические ферменты и соляную кислоту желудочно-кишечного тракта, интерферон, воспаление, фагоцитоз, систему комплемента и другие присутствующие в крови гуморальные факторы конститутивной защиты.

Кожные покровы составляют около 2 м<sup>2</sup> (у человека), но они подвержены, как правило, наиболее постоянному и наиболее жесткому воздействию внешних факторов, в том числе и биологического происхождения. Строение кожи как органа обеспечивает создание существенного механического барьера на пути агрессивных биологических факторов среды. Внешнюю поверхность кожи образует **многослойный эпителий (эпидермис)**, клетки которого способны синтезировать в значительных количествах роговое вещество. Это вещество, состоящее преимущественно из белка кератина, придает поверхностному слою эпителия относительную устойчивость к механическим воздействиям и к тому же крайне медленно разлагается большинством видов микроорганизмов. Отмирающие в результате накопления рогового вещества поверхностные слои постоянно слущиваются, обеспечивая тем самым частичное механическое удаление попавших на поверхность эпидермиса микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. В то же время в нижних слоях эпидермиса происходит постоянное образование новых клеток, замещающих отмирающие, поэтому защитный эффект эпидермального слоя кожи не утрачивается. Более того, чем сильнее воздействие на поверхностные слои эпидермиса, тем интенсивнее происходит образование новых

слоев, что и определяет неравномерность толщины эпидермального слоя в различных участках кожи. Несмотря на то, что через собственно эпидермис не проходят капилляры кровеносной системы, нижние его слои получают достаточное количество необходимых для постоянного деления питательных веществ из прилегающего слоя собственно кожи (дермы). Это обеспечивается особенностями строения верхнего слоя дермы и нижнего слоя эпидермиса, которое создает максимальную поверхность соприкосновения за счет взаимопроникновения этих слоев друг в друга.

**Собственно кожа (дерма)** представлена плотной волокнистой соединительной тканью, отличительной чертой которой является наличие большого количества плотного межклеточного вещества. Основными компонентами этого вещества являются белки коллаген и эластин, образующие волокна, и заполняющий пространство между этими волокнами полисахарид гиалуроновая кислота. Такое сочетание создает прочный плотный и в то же время растяжимый механический барьер на пути стремящихся проникнуть внутрь микроорганизмов. Преодолеть этот барьер способны только микроорганизмы, продуцирующие коллагеназы и гиалорунидазы, причем для их эффективного воздействия необходимо, чтобы эти микроорганизмы могли противостоять другим защитным факторам, определяемым кожей. Имеющиеся в коже **потовые железы** помимо выполнения своей основной терморегулирующей функции играют существенную роль и в формировании защитных свойств кожи. Наличие в составе потовой жидкости небольших количеств низкомолекулярных органических соединений (молочной кислоты, некоторых аминокислот, мочевой кислоты и мочевины) и ее кислотность (рН 5,5) являются неблагоприятным для бактерий и грибов фактором. В то же время в составе секретов **сальных желез** кожи также присутствуют неблагоприятно действующие на микроорганизмы вещества – триглицериды, другие многоатомные спирты, свободные жирные кислоты. Совместное действие этих секретов в целом придает поверхности кожи бактерицидные свойства, что экспериментально подтверждается гибелью помещенных на поверхность чистой кожи сапрофитных бактерий в течение 1 часа после нанесения. Следует также подчеркнуть значение секрета сальных желез как водоотталкивающего средства, поскольку попадающие с водой на поверхность кожи микроорганизмы (например, при купании в естественных водоемах) удаляются при стекании воды с несмачиваемой кожи.

**Слизистые оболочки** обеспечивают защиту организма несколько иным путем. Из-за почти полного отсутствия в составе образующих слизистые оболочки эпителиальных тканей межклеточного вещества механическая прочность слизистых оболочек крайне невелика и клетки слизистых довольно легко повреждаются при воздействии внешних факторов. Однако их высокая регенеративная способность позволяет компенсировать возникающие повреждения, а слой выделяемой этими клетками слизи препятствует непосредственному воздействию микроорганизмов на клетки

. Постоянное удаление выделяемых секретов в результате пассивного стекания или активности имеющихся в некоторых слизистых оболочках ресничных клеток способствует и удалению попавших на поверхность частиц. Поскольку процесс такого удаления, как правило, растянут во времени, большинство секретов слизистых имеют в своем составе **бактерицидные вещества**. Наиболее ярко это выражено в слизистых оболочках дыхательных путей и глаз, где в составе выделяемой слизи присутствует значительное количество **лизоцима** – ацетилмурамидазы, субстратом для которой является один из основных компонентов клеточной стенки бактерий – пептидогликан муреин. Кроме того, присутствующие в слизи носа полисахаридные субстанции обладают некоторым противовирусным действием. Наглядным примером значения выделяемой в дыхательном тракте слизи в борьбе с микроорганизмами является знакомое каждому увеличение ее количества при многих респираторных заболеваниях. В верхнем отделе пищеварительного тракта роль защитного секрета играет выделяемая слизистой оболочкой и специализированными железами слюна, которая помимо пищеварительных



ферментов содержит также и лизоцим. Выделяемые клетками слизистой оболочки желудка **пищеварительные ферменты** и **соляная кислота** также обладают выраженным микробицидным действием, а в просвете тонкого кишечника к защитному эффекту выделяемых здесь ферментов присоединяется **бактерицидный эффект компонентов желчи**.

В мочеиспускательном канале удалению чужеродных агентов с поверхности слизистой оболочки способствует периодическое смывание удаляемой мочой и лизоцим, также присутствующий в выделениях слизистой. Последнее касается также и секретов слизистых оболочек в половой системе. Кроме того, в секретах собственно половых желез также присутствуют бактерицидные агенты, например **спермин** в семенной жидкости.

Воспаление — защитно-приспособительная местная реакция организма на действие различных повреждающих факторов, одна из наиболее частых форм реагирования организма на патогенные раздражители. Классическими признаками воспаления являются: покраснение, повышение температуры, припухлость, боль и нарушение функции. Однако во многих случаях выражена лишь часть из этих признаков. Воспаление начинается с альтерации (повреждения клеток и тканей), являющейся результатом прямого действия этиологического фактора. При этом в клетке происходит ряд изменений — от ультраструктурных, возникающих в компонентах цитоплазмы, ядре клетки и ее мембране, до выраженных дистрофических процессов и даже полной деструкции клеток и ткани. Явления альтерации наблюдаются как в паренхиме, так и в строме. Первичная альтерация влечет за собой высвобождение биологически активных веществ (медиаторов воспаления) в пораженных тканях. Эти вещества, отличаясь по происхождению, химической природе и особенностям действия, играют роль пускового звена в цепи механизмов развития воспалительного процесса и ответственны за различные его компоненты. Высвобождение медиаторов воспаления может быть непосредственным результатом повреждающего действия патогенных факторов, но в значительной степени это опосредованный процесс, возникающий под влиянием лизосомных гидролитических ферментов, которые высвобождаются из лизосом при разрушении их мембраны. Лизосомы называют «стартовой площадкой воспаления», т.к. лизосомные гидролитические ферменты расщепляют все виды макромолекул, входящих в состав животных тканей (белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды). Под влиянием лизосомных гидролитических ферментов продолжается дезорганизация соединительнотканного каркаса микрососудов. Медиаторы воспаления, как клеточного, так и гуморального происхождения, накапливаясь по мере развития В., все более углубляют альтерацию ткани. Так, наиболее мощный медиатор гистамин вызывает расширение микрососудов, увеличение их проницаемости. Гистамин содержится в гранулах тучных клеток, а также в базофилах, высвобождается при дегрануляции этих клеток. Другой клеточный медиатор — серотонин, повышает сосудистую проницаемость. Его источником являются тромбоциты. К клеточным медиаторам В. относятся лимфокины, образующиеся в лимфоцитах, простагландины и др. Из гуморальных медиаторов наибольшее значение имеют кинины (брадикинин, каллидин), расширяющие прекапиллярные артериолы, увеличивающие проницаемость стенки капилляров и участвующие в формировании болевых ощущений. Кинины — группа нейровазоактивных полипептидов, образующихся в результате каскада химических реакций, пусковым механизмом которых является активация XII фактора свертывания крови. К медиаторам В. можно отнести и лизосомные гидролитические ферменты, т.к. они не только стимулируют образование других медиаторов, но и сами выступают в роли медиаторов, участвуя в фагоцитозе и хемотаксисе.

Определение бактерицидной активности кожи. На тыльную сторону предплечья наносится квачом взвесь *E.coli* (1 млн в 1 мл). Сразу прикладывается пластинка с питательной средой, а через 30-40 мин другая прикладывается рядом. Обе пластинки

помещаются в термостат на 24 часа, после чего подсчитывается количество выросших колоний и производится сравнение.

### Задания для самостоятельной работы

1. Ознакомится с наглядным материалом.
2. Выполнить практическое задание – определить бактерицидную активность кожи.
3. Подсчитать количество колоний на агаровых пластинках (через 24 часа), оформить протокол исследования.

#### Протокол исследования

Количество колоний, выросших на пластине №1 с питательной средой	Количество колоний, выросших на пластине №2 с питательной средой
Бактерицидная активность в %	

### Контрольные вопросы

1. В чем отличие врожденного и приобретенного иммунитета?
2. Каковы механизмы бактерицидной активности кожи?
3. Каковы механизмы защиты слизистых оболочек?

### 2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

**Тема: «Фагоцитоз. Морфология фагоцитов. Определение фагоцитарного числа и фагоцитарного показателя»**

**2.3.1 Цель работы:** познакомить с явлением фагоцитоза, расчетом показателей фагоцитоза.

#### 2.3.2 Задачи работы:

1. Познакомить студентов с методикой определения фагоцитарного числа и фагоцитарного показателя.
2. Выполнение практического задания по определению фагоцитарного числа и фагоцитарного показателя.

#### 2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе

1. Предметные стекла, скарификаторы одноразовые, пипетки на 0,1 и 0,2 мл, серологические пробирки стерильные
2. Раствор лимоннокислого натрия, взвесь *E. coli*.

#### 2.3.4 Описание (ход) работы:

Фагоцитоз представляет собой филогенетически наиболее древнюю иммунную реакцию и является первой реакцией иммунной системы на внедрение чужеродных антигенов, которые могут поступать в организм в составе бактериальных клеток или вирусных частиц, а также в виде высокомолекулярного белка или полисахарида. *Макрофаги* и *моноциты* — древние клетки иммунной системы. Последние являются циркулирующими в периферической крови предшественниками макрофагов, функции которых разнообразны. Впервые на защитную функцию макрофагов указал И. И. Мечников, открывший явление фагоцитоза и получивший за это Нобелевскую премию 1908 г. У человека и животных различают два типа профессиональных фагоцитов: 1) нейтрофилы; 2) моноциты.

Основные этапы фагоцитарной реакции сходны для клеток обоих типов. Реакция фагоцитоза может быть подразделена на несколько этапов.

1. Хемотаксис. В реакции фагоцитоза более важная роль принадлежит положительному хемотаксису. В качестве хемоаттрактантов выступают продукты выделяемые микроорганизмами и активированными клетками в очаге воспаления, а также продукты расщепления компонентов комплемента, протеолитические фрагменты факторов свертывания крови и фибринолиза, нейропептиды, фрагменты иммуноглобулинов и др. Однако, «профессиональными»

хемотаксинами служат цитокины группы хемокинов. Ранее других клеток в очаг воспаления мигрируют нейтрофилы, существенно позже поступают макрофаги. Скорость хемотаксического перемещения для нейтрофилов и макрофагов сопоставима, различия во времени поступления, вероятно, связаны с разной скоростью их активации.

2. Адгезия фагоцитов к объекту. Обусловлена наличием на поверхности фагоцитов рецепторов для молекул, представленных на поверхности объекта. При фагоцитозе бактерий или старых клеток организма хозяина происходит распознавание концевых сахаридных групп — глюкозы, галактозы, фукозы, маннозы и др., которые представлены на поверхности фагоцитируемых клеток. Распознавание осуществляется лектиноподобными рецепторами соответствующей специфичности, в первую очередь маннозосвязывающим белком и селектинами, присутствующими на поверхности фагоцитов. В тех случаях, когда объектами фагоцитоза являются не живые клетки, а кусочки угля, асбеста, стекла, металла и др., фагоциты предварительно делают объект поглощения приемлемым для осуществления реакции, окутывая его собственными продуктами, в том числе компонентами межклеточного матрикса, который они продуцируют. Хотя фагоциты способны поглощать и разного рода «неподготовленные» объекты, наибольшей интенсивности фагоцитарный процесс достигает при опсонизации, т. е. фиксации на поверхности объектов опсонинов к которым у фагоцитов есть специфические рецепторы - к Fc-фрагменту антител, компонентам системы комплемента, фибронектину и т. д.

3. Активация мембраны. На этой стадии осуществляется подготовка объекта к погружению. Происходит активация протеинкиназы C, выход ионов кальция из внутриклеточных депо. Большое значение играют переходы золь-гель в системе клеточных коллоидов и актино-миозиновые перестройки.

4. Погружение. Происходит обволакивание объекта.

5. Образование фagosомы. Замыкание мембраны, погружение объекта с частью мембраны фагоцита внутрь клетки.

6. Образование фаголизосомы. Слияние фagosомы с лизосомами, в результате чего образуются оптимальные условия для бактериолиза и расщепления убитой клетки. Механизмы сближения фagosомы и лизосом не ясны, вероятно имеется активное перемещение лизосом к фagosомам.

7. Киллинг и расщепление. Велика роль клеточной стенки перевариваемой клетки. Основные вещества участвующие в бактериолизе: перекись водорода, продукты азотного метаболизма, лизоцим и др. Процесс разрушения бактериальных клеток завершается благодаря активности протеаз, нуклеаз, липаз и других ферментов, активность которых оптимальна при низких значениях pH.

8. Выброс продуктов деградации.

Фагоцитоз может быть: 1) завершённым; 2) не завершённым.

Определение активности и интенсивности фагоцитоза позволяет оценить состояние фагоцитарной системы, возможность участия фагоцитирующих клеток в патогенезе заболевания и определить тактику лечения. *Активность фагоцитоза (фагоцитарный показатель)* - отображает процент фагоцитов, способных к активному захвату частиц. *Интенсивность фагоцитоза (ФЧ - фагоцитарное число)* - показывает количество частиц, поглощенное одним фагоцитом. Оба эти показателя характеризуют поглотительную способность фагоцитирующих клеток крови (нейтрофилов и моноцитов).

**Фагоцитарный показатель** фиксирует среднее количество микробов, которое поглотила одна фагоцитирующая клетка (фагоцит), соответственно фагоцитарное число (ФЧ) отображает данное количество. Формула фагоцитарного числа применяется в самых различных областях диагностирования, в частности, когда необходимо проверить функциональную активность кровяных лейкоцитов, для чего применяют специальные тесты. Так моноциты и гранулоциты крови испытываются на способность к захватыванию и перевариванию предложенных им так называемых тест-объектов: стандартных микрочастиц, либо мертвых бактерий. В результате оценивается их фагоцитарная активность. Следствием изучения фагоцитарного пула является получение четкого представления о самых ранних этапах реакции инфекционного агента с организмом, что позволяет подойти к прогнозированию результатов такого взаимодействия. Выраженные через фагоцитарное число параметры имеют важное значение при комплексном изучении результатов диагностики различных проявлений иммунодефицитного состояния: длительно не заживающих ран, рецидивирующих воспалительных гнойных состояний, частых послеоперационных осложнений и пр. Используя фагоцитарный показатель и фагоцитарное число, оценивается поглотительная способность фагоцитов. Фагоцитарное число является ключевым

показателем при оценке фагоцитарной активности нейтрофилов – основного вида лейкоцитов, составляющего 47% - 72% общего числа лейкоцитов крови.

Такую оценку считают важной составляющей общей характеристики иммунного статуса, способного нарушаться при различных воспалительно-инфекционных осложнениях. Критерием оценки фагоцитарного звена систем иммунитета является функциональная активность и количество нейтрофилов (иногда - моноцитов) крови. В ходе определения поглотительной активности и способности нейтрофилов к поглощению стафилококков, частиц латекса и кандид вычисляется фагоцитарное число, подсчитывается фагоцитарный индекс, а также определяется множество других параметров.

*Определение фагоцитарной активности лейкоцитов у больных и здоровых людей.*

Постановку реакции фагоцитоза осуществляют следующим образом. В ходе приготовления смеси для исследования фагоцитоза в видалевскую пробирку наливают 0,1 мл 2%-ного лимоннокислого натрия, 0,2 мл исследуемой крови и 0,1 мл взвеси тест-микроба, в качестве которого используют лабораторный штамм стафилококка №209 либо *V.mesentericus* (суточная агаровая культура по стандарту) в концентрации 400 млн микробных тел в 1 мл (объект фагоцитоза). Все компоненты тщательно смешивают, после чего производят обработку полученной смеси для исследования фагоцитоза. При этом пробирку помещают на 30 мин в термостат (37°C). После инкубации пробирку со смесью центрифугируют в течение 3 мин при 1000 об/мин. Затем из верхнего слоя осадка готовят мазки, которые фиксируют смесью Никифорова (равные части спирта и эфира) и окрашивают по Романовскому-Гимзе. Под микроскопом просматривают 100 лейкоцитов (общее число лейкоцитов) и подсчитывают общее число поглощенных лейкоцитами микробов.

Производят расчет показателей фагоцитоза, в качестве которых используют 2 показателя:

- Процент фагоцитирующих лейкоцитов, т.е. количество лейкоцитов из 100, проявивших фагоцитарную активность – фагоцитарный показатель (индекс);
- Фагоцитарное число, т.е. число микробов, поглощенных в среднем одним лейкоцитом.

Для здоровых лиц процент фагоцитирующих лейкоцитов составляет 50-70%, а фагоцитарное число - 2,0-4,0.

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с методикой определения фагоцитарного показателя и числа.
2. Взять кровь и выполнить работу в соответствии с излагаемой методикой, приготовить мазки и окрасить их по Романовскому-Гимзе, произвести расчет указанных показателей, заполнить протокол исследования.

#### **Протокол исследования**

Фагоцитарный показатель	Фагоцитарное число

#### **Контрольные вопросы**

1. Кто впервые открыл фагоцитоз?
2. Какие клетки осуществляют фагоцитоз?
3. Какие стадии фагоцитоза существуют?
4. Какой бывает фагоцитоз?
5. Как определяется фагоцитарное число?
6. Как определяется фагоцитарный показатель?
7. Для чего определяются эти показатели?

#### **2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).**

**Тема: «Гуморальные факторы врожденного иммунитета. Определение лизоцима в сыворотке крови»**

**2.4.1 Цель работы:** познакомить студентов с гуморальными факторами врожденного иммунитета и методикой определения С-реактивного белка.

**2.4.2 Задачи работы:**

1. Характеристика гуморальных факторов врожденного иммунитета.
2. Знакомство с методикой определения лизоцима в сыворотке крови.
3. Знакомство с методикой определения С-реактивного белка и выполнение работы по его определению.

**2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Сыворотки крови.
2. Диагностический набор для определения СРБ методом латекс-агглютинации.

**2.4.4 Описание (ход) работы:**

К гуморальным факторам относят: комплемент, интерфероны, лизоцим, бета-лизины, лактоферрин, пропердин, белки острой фазы, самым значимым из которых является С-реактивный белок. Основным гуморальным фактором неспецифической резистентности является комплемент - сложный комплекс белков сыворотки крови (около 20), которые участвуют в уничтожении чужеродных антигенов, активации свертывания, образовании кининов. Для комплемента характерно формирование быстрого, многократно усиливающегося ответа на первичный сигнал за счет каскадного процесса. Активироваться комплемент может двумя путями: классическим и альтернативным. В первом случае активация происходит за счет присоединения к иммунному комплексу (антиген-антитело), а во втором - за счет присоединения к липополисахаридам клеточной стенки микроорганизмов, а также эндотоксину. Независимо от путей активации происходит образование мембранатакующего комплекса белков комплемента, разрушающего антиген. Вторым и не менее важным фактором, является интерферон. Он бывает альфа-лейкоцитарный, бета-фибробластный и гамма-интерферониммунный. Вырабатываются они соответственно лейкоцитами, фибробластами и лимфоцитами. Первые два вырабатываются постоянно, а гамма-интерферон - только в случае попадания вируса в организм. Суть действия лизоцима и бета-лизинов заключается в том, что, являясь ферментами, они специфически разрушают липополисахаридные последовательности в составе клеточной стенки микроорганизмов. Отличие бета-лизинов от лизоцима заключается в том, что они вырабатываются в стрессорных ситуациях. Пропердин, или фактор Р, — глобулярный белок, обнаруженный в сыворотке крови высших животных. Представляет собой несколько растворённых в кровотоке проферментов, относящихся к системе комплемента, которая обеспечивает врождённый иммунитет, известно, что пропердин участвует в некоторых специфических иммунных реакциях. Он играет роль в воспалении ткани, а также в процессе поглощения фагоцитами патогенов. Кроме того, известно его участие в нейтрализации некоторых вирусов.

Лактоферрин — полифункциональный белок из семейства трансферринов. Лактоферрин является глобулярным гликопротеином с молекулярной массой около 80 кДа и широко представлен в различных секреторных жидкостях, таких как молоко, слюна, слезы, секреты носовых желез. Лактоферрин является одним из компонентов иммунной системы организма, принимает участие в системе неспецифического гуморального иммунитета, регулирует функции иммунокомпетентных клеток и является белком острой фазы воспаления. Наиболее изученным является механизм антибактериальной активности лактоферрина. Антибактериальные свойства белка обусловлены способностью лактоферрина связывать железо и тем самым лишать бактериальную микрофлору необходимого для ее роста и жизнедеятельности микроэлемента. Лактоферрин обладает антивирусной активностью против широкого спектра вирусов человека и животных с ДНК и РНК геномами.

Интерфероны. Общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемые клетками организма в ответ на вторжение вируса. При заражении клетки вирус начинает размножаться. Клетка-хозяин одновременно с этим начинает продукцию интерферона, который выходит из клетки и вступает в контакт с

соседними клетками, делая их невосприимчивыми к вирусу. Он действует, запуская цепь событий, приводящих к подавлению синтеза вирусных белков и в некоторых случаях сборки и выхода вирусных частиц (путём активации олигоаденилатциклазы). Таким образом, интерферон не обладает прямым противовирусным действием, но вызывает такие изменения в клетке, которые препятствуют в том числе и размножению вируса. Образование интерферона могут стимулировать не только интактные вирусы, но и различные другие агенты.

Лизоцим. Это фермент ацетилмурамидаза, разрушающий оболочки бактерий (Гр+), лизирующий их. Он находится почти во всех тканях и жидкостях организма. Способность к разрушению клеточных оболочек бактерий, с чего и начинается уничтожение, объясняется тем, что лизоцим в высокой концентрации находится в фагоцитах и его активность увеличивается при микробной инфекции. Лизоцим усиливает антибактериальное действие антител и комплемента. Он входит в состав слюны, слез, кожных выделений как средство, усиливающее барьерную защиту организма.

Определение активности сывороточного лизоцима (Бухарин О.В., 1971)

Необходимые ингредиенты - испытуемая сыворотка, суточная культура *M. lysodeicticus* (штамм 2665 ГКИ им. Л. А. Тарасевича), фосфатный буфер 1/15 М (рН 6,2).

Приготовление бактериальной суспензии микрококка: культуру выращивают в течение суток на рыбном или мясопептонном агаре при температуре 37°, после чего ее смывают 1/15 М фосфатным буфером рН 6,2) Полученную бактериальную взвесь стандартизируют на ФЭК-М по левому барабану до оптической плотности 0,66.

Ход определения: в опытную пробирку наливают 0,4 мл фосфатного буфера (рН 6,2) и 0,1 мл исследуемой сыворотки крови и 2 мл стандартизированной взвеси микрококка. Смесь инкубируют 30 минут при 37°; после чего измеряют ее оптическую плотность на ФЭК-М по правому барабану в кювете № 2 с зеленым светофильтром. По таблице определяют концентрацию лизоцима.

С-реактивный белок. В ответ на инфекцию или повреждение тканей резко увеличивается концентрация некоторых белков плазмы крови, имеющих общее название "белки острой фазы". К этим белкам относятся С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоидный А-белок, альфа1- антитрипсин, альфа2-макроглобулин, фибриноген, церулоплазмин, компонент комплемента С9 и фактор В. Основным белком этой группы является С-реактивный белок. Этот белок, взаимодействуя с фосфорилхолином бактериальной стенки, выступает и как опсонин и как индуктор классического пути активации системы комплемента. СРБ человека состоит из пяти идентичных, нековалентно связанных полипептидных цепей, образующих замкнутый пентамер. Важное свойство СРБ - способность связываться при участии кальция с некоторыми микроорганизмами, у которых в состав мембраны входит фосфорилхолин. Образовавшийся комплекс активирует систему комплемента (по классическому пути). Это приводит к связыванию С3b с поверхностью микроба, и в результате последний опсонизируется (гр. *opsoneum* - делать съедобным), т.е. подготавливается к фагоцитозу. Реакция белков острой фазы на воспалительный процесс в организме человека неодинакова, в связи с чем их можно разделить на несколько групп. К первой группе белков острой фазы, концентрация которых повышается в самом начале воспаления, относят С-реактивный белок (СРБ). Его уровень увеличивается в первые 6-8 ч и достигает максимума на 2-е сутки от начала заболевания, превышая часто исходный уровень в 20-100 раз. При эффективном лечении бактериальной инфекции снижение уровня СРБ начинается с 3-х суток, а на 6-10-й день он возвращается к норме, т.е. достоинства СРБ как маркера различных заболеваний заключаются в следующем:

У здоровых лиц концентрация СРБ в сыворотке крови меньше 6 г/мл. При такой концентрации агглютинация отсутствует - результат отрицательный.

### Задания для самостоятельной работы

1. Познакомится с характеристикой гуморальных факторов неспецифической защиты.
2. Законспектировать методику определения лизоцима в сыворотке крови.

#### Контрольные вопросы

1. Каков механизм антибактериального действия комплемента?
2. Каков механизм антибактериального и противовирусного действия лактоферрина?
3. Каков механизм действия лизоцима?
3. Каков механизм антибактериального действия СРБ?
4. Как используется СРБ для диагностики и прогнозирования течения патологического процесса?

### 2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

**Тема: «Модельные системы в иммунологии. Правила работы с экспериментальными животными. Различные способы введения антигенов животным»**

**2.5.1 Цель работы:** познакомить студентов с лабораторными моделями, используемые в иммунологии.

#### 2.5.2 Задачи работы:

1. Познакомится с модельными системами в иммунологии.
2. Правилами работы с лабораторными животными.
3. Способы введения лабораторным животным антигена.

#### 2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе

1. Антиген, спиртовые тампоны, ватки.
2. Одноразовые шприцы на 1 мл, кюветы.
3. Лабораторные мыши.

#### 2.5.4 Описание (ход) работы:

Лабораторные животные, экспериментальные, или подопытные, животные, используемые в лабораториях для научных и практических целей. Л. ж. должны быть здоровы, обладать некоторыми специфическими особенностями (например, восприимчивостью к исследуемым инфекциям, чувствительностью к исследуемым веществам и др.), отличаться дешевой разведением и содержания. При опытах на Л. ж. учитываются их видовые особенности (например, грызуны — ночные животные); всё шире применяют т. н. чистопородных животных и стерильных животных (свободных от присутствия бактерий, грибов, простейших, вирусов и др.). Для исследований по генетике, микробиологии, вирусологии, токсикологии, радиобиологии чаще используют белых мышей и крыс, для физиологических опытов — собак, кошек, кроликов, обезьян, лягушек, а также хомячков, хлопковых крыс, полёвок, песчанок, степных и африканских хорьков, кротов. Нередко опыты ставят на черепахах, рыбах, птицах и др.

Чистые (инбредные) линии у животных с перекрестным оплодотворением получают путем близкородственных скрещиваний в течение нескольких поколений. В результате животные, составляющие чистую линию, получают одинаковые копии хромосом каждой из гомологичных пар. В настоящее время чистые линии животных (а первую очередь крыс и мышей) и растений играют важнейшую роль в проведении биологических и медицинских исследований. Генетическая однородность используемых учеными организмов повышает воспроизводимость результатов и снижает вероятность воздействия на результат исследования генетических различий между особями (например, в контрольной и опытной группе). С помощью традиционной селекции и методов генной инженерии получено множество чистых линий с заданными свойствами (например, повышенной склонностью к потреблению алкоголя, высокими уровнем заболеваемости разными формами рака и т.п.), используемые для конкретных исследований.

Способы заражения. В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривенным, пероральным или интраназальным и др. При перечисленных способах, за исключением перорального и интраназального, заражение осуществляется с помощью шприца. Взвесь микробной культуры, эмульсию из зараженных органов или кровь больного осторожно набирают в шприц, после чего конец иглы закрывают кусочком ваты, смоченным 5% раствором хлорамина, 5% раствором карболовой кислоты или спиртом. Повернув шприц иглой вверх, осторожно выпускают из него пузырьки воздуха. Загрязненную вату бросают в банку с дезинфицирующим раствором.

Наркоз лабораторных животных. Для наркоза чаще всего применяют эфир или хлороформ. Мышей усыпляют в банке с притертой пробкой, куда опускают кусочек ваты, смоченной эфиром или хлороформом. Эфиром чаще всего пользуются для наркоза мышей, крыс, морских свинок, кроликов и собак. Кошек обычно наркотируют хлороформом, но можно пользоваться для этой цели смесью спирта с хлороформом и эфиром (в равных объемах).

Применяют также 10% раствор уретана под кожу в дозах: для мышей—0,15 мл, для крыс—2-3 мл, для морских свинок—1,5-3 мл и для кроликов—8-12 мл. Наркоз наступает обычно через 45—60 минут.

*Внутрикожный метод.* При этом способе применяют тонкие (№18-20) острые иглы с небольшим скосом. После тщательного выстригания или бритья место инъекции протирают спиртом, захватывают пальцами левой руки кожную складку, в которую и вводят, почти параллельно складке, очень тонкую иглу. При попадании в кожу материал поступает только при довольно сильном надавливании на поршень шприца и образует на месте инъекции возвышение эпидермиса в виде пузырька (горошины). Если такого пузырька не образовалось, значит введенный материал попал не в толщу кожи, а в подкожную клетчатку. Материал внутрикожно вводят в небольших количествах (0,1—0,2 мл).

*Скарификация.* Иногда исследуемый материал втирают в неповрежденную или скарифицированную кожу, соответствующий участок которой предварительно освобождают от шерсти, обрабатывают спиртом и хорошо высушивают. Скарификацию кожи производят скальпелем, оспенным пером или хирургической иглой путем нанесения насечек, царапин. Материал (1—2 капли) втирают стеклянной палочкой или шпателем в недоступных слизыванию местах.

*Подкожный способ* заражения. Кожу в месте введения материала берут у ее основания, приподнимают I и II пальцами левой руки. Иглу шприца вкалывают снизу образовавшейся складки. Проколов кожу и пройдя вглубь на несколько миллиметров, иглу отклоняют вправо или влево и затем медленно вводят материал, содержащийся в шприце. Изменять направление иглы под кожей рекомендуется для того, чтобы введенное вещество не выступало через прокол кожи наружу. Затем складку кожи опускают, на место укола накладывают ватный тампон, смоченный спиртом или спиртовым раствором, а иглу быстро вынимают. Наиболее удобными местами для подкожного введения материала у кроликов и морских свинок являются область спины и боковые поверхности несколько ниже подмышечных впадин, у крыс и мышей—область спины, крестца и затылка. Количество жидкости, вводимой подкожно, не должно превышать 30 мл для кроликов, 15 мл — для морских свинок, 10 мл- для крыс и 1 мл - для мышей.

*Внутримышечный способ* заражения. Выбирают участок тела с наиболее развитым мышечным слоем. У кроликов, морских свинок, крыс и мышей таким местом является наружная верхняя треть бедра задней лапы. Захватывают I и II пальцами левой руки толстую мышечную складку и вводят иглу почти под прямым углом в глубь мышц. Объем жидкости, допустимый для внутримышечного введения, составляет для кроликов 8 мл, для морских свинок-5 мл, для крыс-3 мл, для мышей-0,5 мл.



*Внутрибрюшинный способ* заражения. Помощник держит животное вниз головой. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что в значительной мере уменьшает возможность его повреждения в момент прокола. У животных (за исключением мышей) в нижней трети живота, несколько отступая от средней линии, делают скальпелем или остроконечными ножницами надсечку кожи длиной 2—3 мм и через нее вводят притупленную иглу, держа шприц перпендикулярно к брюшной стенке. Преодолевая сопротивление, очень осторожно, буравящими движениями иглу продвигают вглубь. Чувство «провала», исчезновение ощущения сопротивления на пути говорят о проникновении иглы в брюшную полость. После этого иглу переводят в вертикальное положение и вводят содержащийся в шприце материал в полость брюшины. Внутрибрюшинно можно вводить до 30 мл жидкости кроликам, до 10 мл - морским свинкам, до 5 мл - крысам, до 2 мл - мышам.

*Внутривенное заражение* кроликов. Кроликов заражают в краевую вену уха. Вдоль наружного края уха выщипывают шерсть, затем это место слегка пощелкивают кончиками пальцев, чтобы вызвать гиперемию сосудов, и протирают ватой, смоченной в 70% спирте или ксилолом. Но многократное применение ксилола не рекомендуется ввиду сильного раздражения кожи. После обработки кожи ксилолом его необходимо снять с поверхности. После явного набухания вены под ухо подводят II палец левой руки. Прокол вены следует делать ближе к верхушке уха, так как при частых уколах возможна облитерация сосуда в этом месте, но проксимальный участок вены остается неповрежденным. Чтобы удостовериться, правильно ли введена игла, вводят сначала небольшое количество материала. При нахождении иглы в полости вены материал вводится свободно, в противном же случае жидкость из шприца вытекает с трудом, а на ухе в месте введения образуется вздутие. Если игла не попала в вену, ее вынимают и вводят повторно в другое место, ближе к основанию уха. По окончании введения нижний участок вены слегка придавливают, а к месту укола прикладывают кусочек стерильной ваты, смоченной спиртом или спиртовым раствором йода, после чего из вены извлекают иглу. Внутривенно кроликам можно вводить до 20 мл жидкости.

Внутривенное заражение крыс и мышей. Крыс и мышей заражают в боковую вену хвоста. Непосредственно перед введением материала хвост животного, чтобы вызвать гиперемию сосудов, погружают в сосуд с водой, подогретой до 50°C, смазывают ксилолом или толуолом. После того как сосуды заметно набухают, корень хвоста сдавливают пальцами. Для введения материала лучше всего пользоваться туберкулиновыми иглами, очень тонкими и короткими, с косым срезом. При введении иглы в вену шприц держат под острым углом, почти параллельно оси хвоста. Иглу повертывают отверстием наружу. Корень хвоста освобождают от сдавливания. Как и в предыдущем случае, нахождение иглы в вене определяют по легкости введения материала и отсутствию заметного уплотнения в месте, где находится игла. Взрослым белым крысам допускается вводить до 6 мл жидкости, мышам—до 0,5 мл.

*Заражение через пищеварительный тракт.* Заразить животное через рот можно двумя способами. Материал, предназначенный для заражения, примешивают к корму или питью животного. Такой способ является наиболее простым и естественным, однако, в лабораторной практике применение его ограничено, поскольку количество материала, попадающее в организм заражаемого животного, не подлежит точному учету. Поэтому значительно чаще материал, предназначенный для заражения, вводят животному шприцем, игла которого имеет незначительный изгиб и утолщение на конце в виде оливы. Наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного. Диаметр иглы для мышей должен быть не более 1 мм, для крыс—1,5 мм, длина, соответственно, 35-45 и 70-75 мм. Крыс и мышей фиксируют перед заражением в вертикальном положении: одной рукой помощник держит животное за складку кожи на затылке, около ушей, другой—за корень хвоста. Животным открывают рот браншами пинцета, вставляя их между нижней и

верхней челюстями. Иглу, введенную в рот, продвигают по задней стенке глотки на глубину 1 см у мышей и 2-2,5 см у крыс.

На указанной глубине игле придают вертикальное положение. Процесс введения иглы, как правило, затруднений не представляет, конец ее проникает непосредственно в желудок или нижний отдел пищевода. Количество материала, вводимого за один раз в желудок мышей, должно быть не более 1 мл, взрослым крысам - не более 3,5 мл. При пероральном введении жидкостей мелким лабораторным удобнее пользоваться полихлорвиниловой трубкой, представляющей собой наружную оболочку одного провода многожильного телефонного кабеля, из которого удален проводник. Длина трубки 15-17 см, наружный диаметр 1-1,5 мм, такой эластический зонд при незначительном усилии легко проникает из полости рта в пищевод и желудок животного, не требуя строгого ограничения глубины введения, так как даже при излишне глубоком введении стенки желудка не повреждаются. Вводимая жидкость дозируется с помощью шприца, на сосок которого надевают эластический зонд, внутренний просвет которого 0,5—0,7 мм.

Морских свинок и кроликов перед заражением *per os* фиксируют в нормальном для животного положении. Удобнее всего завернуть их в полотенце и посадить к помощнику на колени. Заразный материал вводят через эластический зонд. Для этой цели обычно выбирают катетер из наиболее мягкой и эластичной резины длиной 7,5—8 см и толщиной не более 0,3—0,5 см. Перед введением зонда в рот животному вставляют роторасширитель или, как его называют, «зевник», который представляет собой дощечку с круглым отверстием в середине. Ширина дощечки для кролика равна 2 см, для морской свинки - 1 см. Через отверстие вставленного в рот «зевника» осторожно вводят в пищевод зонд, смазанный вазелином или глицерином. Для того чтобы облегчить введение зонда, животному вливают пипеткой в рот несколько капель воды, вызывая глотательные движения, во время которых зонд легко, без внешнего воздействия продвигается в глубь пищевода. Наружный конец введенного зонда присоединяют к шприцу, наполненному материалом, который вводят в желудок медленно в количестве 2,5—3,5 мл морским свинкам и 3,5—5 мл кроликам.

*Заражение через дыхательные пути* (интраназальное заражение). Животному, фиксированному на доске, прикладывают к носу кусочек ваты, смоченной эфиром или хлороформом. К заражению приступают после того, как у животного появится состояние легкого наркоза. Зараженный материал с помощью шприца вводят в нос небольшими каплями на глубину 1—1,5 мм мышам, 2—3 мм крысам, 4 мм кроликам и морским свинкам. Чтобы не поранить слизистые оболочки, для введения материала берут абсолютно тупую иглу.

*Заражение в переднюю камеру глаза* (интраокулярный метод). Производится обычно у кроликов под местной анестезией глаза. Затем фиксируют глазное яблоко путем захватывания складки конъюнктивы (кнаружи от верхнего края роговицы) глазным пинцетом. После этого тонкой иглой, смоченной исследуемым материалом, протыкают роговицу у лимба в очень косом направлении и проникают в переднюю камеру глаза на глубину не менее 1 мм. Иглу тотчас же вынимают, а ранка закрывается сама по себе. При правильном введении иглы вытекания влаги из передней камеры быть не должно. Можно также после прокола роговицы продвинуть иглу в центральном направлении до тех пор, пока из просвета иглы не покажется жидкость. Выпустив несколько капель влаги передней камеры глаза, иглу соединяют со шприцем и вводят исследуемый материал (не более 0,05 мл).

#### **Задания для самостоятельной работы**

1. Изучить методы заражения лабораторных животных.
2. Отработать на мышах различные способы заражения.

#### **Контрольные вопросы**

1. Какие животные чаще всего используются в экспериментальной иммунологии?

2. Как получают инбредные линии животных?
3. Какова техника внутривенного заражения?
4. Какова техника внутримышечного заражения?
5. Какова техника подкожного заражения?

## **2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа).**

**Тема: «Выделение органов иммунной системы из трупов лабораторных животных, подсчет количества Т- и В-лимфоцитов».**

**2.6.1 Цель работы:** выделение органов и клеток иммунной системы из трупов лабораторных животных.

### **2.6.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с методиками выделения органов иммунной системы и клеток, приготовление суспензии, подсчет клеток в камере Горяева.
2. Практическое выполнение студентами задания.

### **2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Спирт, вата, хирургические инструменты (ножницы, пинцеты, скальпели), бритва, стерильные шприцы.
2. Стерильная среда 199; стерильная лабораторная посуда; гомогенизатор; капроновые фильтры, лед, камеры Горяева, световой микроскоп.

### **2.6.4 Описание (ход) работы**

*Выделение В-лимфоцитов из костного мозга мышей*

1. Мышей усыпляют с помощью эфира.
  2. Ножницами делается круговой надрез кожи вокруг плюсны (кожа предварительно обрабатывается спиртом), держа лапку пинцетом. Другим пинцетом следует снять «чулок» кожи вплоть до бедра.
  3. Ножницами подрезают мышцы около коленного сустава, оголив кость. Скальпелем отодвигают мышцы вплоть до бедра.
  4. В районе бедренного сустава ножницами отделяют ногу от туловища и в коленном суставе отрезают бедро от голени.
  5. Большую берцовую кость помещают в чашку Петри, очищают от остатков мышц и удаляют эпифизы со стороны коленного и бедренного суставов.
  6. Из кости с помощью шприца вымывают раствором содержимое в пробирку, которую ставят в стакан со льдом.
  7. Измельчают костный мозг в гомогенизаторе, фильтруют взвесь клеток через стерильный капроновый 4-слойный фильтр.
  8. Подсчитывают клетки в камере Горяева.
- Количество клеток из 2-х берцовых костей обычно составляет около 20 млн (В-клеток).

*Выделение Т-лимфоцитов из тимуса мыши*

1. Мышей усыпляют с помощью эфира, фиксируют в спинном положении, обрабатывают спиртом, делают разрез кожи по середине туловища вдоль всего туловища.
2. Кожа фиксируется препаровальными иглами.
3. Делают два разреза ножницами вдоль средней линии грудной клетки с левой и правой стороны от нижних ребер до ключицы. Расстояние между разрезами – 3-4 мм.
4. Подрезанный лоскут, отгибают пинцетом, открывают грудную полость. Хорошо видны две продолговатые дольки беловатого тимуса, лежащего на сердце.
5. Тимус отделяют, помещают в стерильную чашку Петри, которая расположена на льду.
6. Тимус отделяют от соединительнотканной капсулы, гомогенизируют в охлажденной

стерильной среде, полученную взвесь фильтруют через стерильный капроновый 4-слойный фильтр.

7. Подсчитывают количество клеток в камере Горяева.

Обычно из тимуса получают до 80 млн тимоцитов.

#### *Выделение клеток из селезенки*

1. Мышей усыпляют с помощью эфира, фиксируют на правом боку, обрабатывают левый бок спиртом.

2. В районе «талии» животного делают поперечный разрез кожи длиной 2-2,5 слева от середины туловища, затем разрез раздвигают пинцетом, делают разрез мышц, пинцетом достают селезенку, отрезают соединительнотканые тяжи.

3. Селезенку отделяют от капсулы и гомогенизируют в охлажденной среде.

4. Полученную взвесь фильтруют через стерильный капроновый 4-слойный фильтр.

5. Взвесь спленоцитов подсчитывается в камере Горяева.

Селезенка одной мыши содержит 120-130 млн В- и Т-лимфоцитов (соотношение – 55 и 35 % соответственно).

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Выделить из трупа костный мозг, селезенку, тимус.

2. Из этих органов приготовить клеточную суспензию

3. Подсчитать количество клеток в камере Горяева

4. Заполнить протокол исследования.

#### **Протокол исследования**

Количество В-лимфоцитов в костном мозге	Количество Т-лимфоцитов в тимусе	Количество Т-и В-лимфоцитов в селезенке

#### **Контрольные вопросы**

1. Как выделяют тимус из трупа

2. Как выделяют селезенку из трупа

3. Как выделяют костный мозг из бедра

4. Как выделяют лимфатические узлы?

5. Как готовится суспензия?

### **2.7 Лабораторная работа № 7 (2 часа).**

**Тема:** «Этапы получения моноклональных антител. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов и цитотоксической активности Т-киллеров и естественных клеток-киллеров».

**2.7.1 Цель работы:** дать представление об этапах получения моноклональных антител и методах оценки пролиферативной активности лимфоцитов и цитотоксической активности Т-киллеров и естественных киллеров.

#### **2.7.2 Задачи работы:**

1. Знакомство с этапами получения моноклональных антител и использованием моноклональных антител для диагностики и лечения.

2. Знакомство с методами оценки пролиферативной активности лимфоцитов и методами исследования цитотоксической активности Т-киллеров и NK-клеток.

#### **2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Таблицы, диагностикумы с моноклональными антителами.

#### 2.8.4 Описание (ход) работы

Для исследования пролиферативной активности иммунокомпетентных клеток используют тесты на определение: способности Т- и В-лимфоцитов усиливать пролиферацию в ответ на различную стимуляцию (митогенами, антигенами).

Цитотоксические тесты проводят, чтобы оценить способность Т-киллеров, НК-клеток, макрофагов убивать соответствующие клетки-мишени *in vitro*. Пролиферативную активность Т-лимфоцитов оценивают по интенсивности синтеза ДНК в ответ на стимуляцию митогеном (поликлональная стимуляция) или антигеном (моно- и олигоклональная стимуляция). Митогены стимулируют пролиферацию значительной части Т-лимфоцитов, поэтому результат оценивают обычно через 3 сут. Антиген стимулирует пролиферацию только тех Т-лимфоцитов, которые несут рецептор к нему, поэтому индуцированную антигеном пролиферацию оценивают через 5-7 сут. Для оценки пролиферативной активности Т-лимфоцитов, как и при проведении кожных проб, применяют набор широко распространенных антигенов. Отсутствие реакции на митогены свидетельствует о тяжелой недостаточности клеточного иммунитета.

Оценка цитотоксичности. Обычно оценивают цитотоксичность, ограниченную по HLA, опосредованную лимфоцитами CD8. Клетками-мишенями служат собственные клетки, несущие на своей поверхности чужеродный антиген, связанный с антигенами HLA класса I. Лимфоциты CD8 играют важную роль в защите от вирусных инфекций. Наряду с лимфоцитами CD8 ограниченную по HLA цитотоксичность осуществляют некоторые лимфоциты CD4, распознающие антиген в комплексе с антигенами HLA класса II. Обе субпопуляции лимфоцитов несут антигенраспознающий рецептор, образованный альфа- и бета-цепями. Лимфоциты CD8 с антигенраспознающим рецептором, образованным гамма- и дельта-цепями, участвуют в цитотоксичности, не ограниченной по HLA. Эти лимфоциты присутствуют в крови в незначительном количестве и разрушают клетки-мишени подобно НК-лимфоцитам, то есть без предварительной иммунизации. Оценка клеточной цитотоксичности необходима для диагностики иммунодефицитов. Оценку цитотоксической активности лимфоцитов проводят следующим образом: 1) клетки-мишени обрабатывают радиоактивной меткой ( $^{51}\text{Cr}$ ); 2) к меченым клеткам-мишеням добавляют исследуемые лимфоциты; 3) гибель клеток-мишеней оценивают по выходу радиоактивной метки в раствор. Полученные результаты сравнивают с нормальными показателями. При исследовании ограниченной по HLA цитотоксичности исследуемые Т-лимфоциты предварительно инкубируют с антигеном, присутствующим на клетках-мишенях.

Цитотоксичность НК-лимфоцитов не зависит от предварительной иммунизации и не ограничена по HLA. Цитотоксическую активность НК-лимфоцитов оценивают с помощью метода, используя в качестве клеток-мишеней разные линии трансформированных клеток, чувствительных к действию НК-лимфоцитов. Разрушение клеток-мишеней осуществляется лишь при образовании тесного контакта с НК-лимфоцитами. Этот контакт может быть прямым или опосредованным, при котором НК-лимфоциты прикрепляются к покрытым IgG клеткам-мишеням через рецептор к Fc-фрагменту IgG -- антителозависимая клеточная цитотоксичность. Благодаря этому механизму могут быть разрушены клетки-мишени, первоначально устойчивые к действию НК-лимфоцитов. Антителозависимую клеточную цитотоксичность оценивают с помощью стандартного метода, используя клетки-мишени, покрытые антителами класса IgG. НК-лимфоциты играют важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете и участвуют в отторжении трансплантата. Снижение цитотоксической активности НК-лимфоцитов выявляется при многих заболеваниях, в том числе при злокачественных новообразованиях, а отсутствие наблюдается крайне редко.

Активация НК-лимфоцитов цитокинами. После инкубации с определенными цитокинами цитотоксическая активность НК-лимфоцитов значительно повышается. Так, при добавлении интерферона гамма активность НК-лимфоцитов повышается уже через

несколько часов. После инкубации с интерлейкином-2 в течение нескольких суток НК-лимфоциты становятся активными в отношении любых трансформированных клеток-мишеней, в том числе опухолевых клеток. В настоящее время исследуется возможность применения активированных цитокинами НК-лимфоцитов при некоторых злокачественных новообразованиях.

Получение моноклональных антител. Г. Келлер и Ц. Мильштейн в 1974-1975 гг. получили гибридные клетки из лимфоидной опухоли (миелома) и нормального лимфоцита. Гибридные клетки имели часть хромосом (а следовательно, и свойств) нормального лимфоцита (другая часть хромосом выбрасывалась из клеток в течение первых делений, пока геном не стабилизировался) и часть - от опухоли. Размножались только клетки, унаследовавшие от миеломы способность к неограниченному делению. Параллельно в них шел биосинтез тех или иных продуктов нормального лимфоцита, например антител; последние и требовались Г. Келлеру и Ц. Мильштейну. Неограниченно делящиеся клетки «позволяют» себя клонировать, т.е. физически «рассадить» по одной (каждую в отдельную посуду) и получить клоны клеток - потомков одной клетки. Такие клетки называли гибридами. Лимфоциты для гибридизации получают из селезенки или лимфоузлов, предварительно иммунизированных целевым антигеном мышей. В качестве опухолевых клеток-партнеров используют специально выведенные для получения гибридом мутантные клетки мышинной миеломы (иногда ее же называют плазмоцитомой). Суспензию лимфоидных клеток от иммунных мышей смешивают в одной пробирке в минимальном объеме среды с суспензией миеломных клеток и на 1-2 мин добавляют сливающий агент. У Келлера и Мильштейна сначала этим агентом был, как и у цитогенетиков, вирус Сендай, но через несколько месяцев уже все «гибридомщики» в качестве сливающего агента использовали синтетические полимеры – полиэтиленгликоли. По прошествии 1-2 мин суспензию клеток, содержащую смесь неслившихся лимфоидных клеток, неслившихся клеток миеломы и гибридных клеток 3 вариантов («лимфоцит-лимфоцит», «миелома-миелома», «лимфоцит-миелома»; из них искомыми клетками являются только гибриды «лимфоцит-миелома»), отмывают и разводят в рассчитанном объеме селективной среды ГАТ. В течение первых 7-10 дней культивирования названной смеси клеток в культуре происходит следующее: 1) неслившиеся лимфоциты и гибриды «лимфоцит-лимфоцит» погибают в силу своей природной недолговечности; 2) неслившиеся клетки миеломы и гибриды «миелома-миелома» погибают от невозможности осуществлять биосинтез своей ДНК в присутствии аминоптерина - метаболического яда; 3) единственные клетки, имеющие возможность выжить в среде НАТ, это искомые гибридные клетки «лимфоцит-миелома»: биосинтез пуриновых оснований у них обеспечен ГГФРТ, ген которой получен из нормального лимфоцита, и средовым гипоксантином, а биосинтез пиримидиновых оснований осуществляется из средового тимидина с участием тимидинкиназы. От клеток миеломы данные гибридные клетки наследуют свойство неограниченной пролиферации. От нормальных иммунных В-лимфоцитов - биосинтез иммуноглобулинов. Если клон клеток гибридомы синтезирует антитела, то эти антитела называют моноклональными - продуцируются одним клоном, являются высокоспецифичными, направленными к заданной антигенной детерминанте, идентичными по изотипу, аллотипу и идиотипу, а также по аффинитету и физико-химическим характеристикам.

Моноклональные антитела в настоящее время широко применяют в различных областях медицины. В основе применения монАТ в различных областях лежит возможность получения больших количеств высокоаффинных антител, специфичных по отношению: 1) к иммуногенным антигенам, определяющим гистосовместимость и дифференцировку; 2) дифференцировочным, опухолевым и другим антигенам клеточной поверхности, которые лишены полиморфизма и неиммуногенны в аллогенных системах, но распознаются при ксеногенной иммунизации; 3) вирусным и бактериальным

антигенам; 4) единичным антигенным детерминантам разнообразных белков, нуклеиновых кислот и сахаров.

### **Контрольные вопросы**

1. С какой целью оценивается пролиферативная активность лимфоцитов?
2. С какой целью оценивается цитотоксическая активность Т-лимфоцитов и NK-клеток?
3. Кто впервые получил моноклональные антитела?
4. Каковы основные этапы получения моноклональных антител?
5. Как в ветеринарной практике используются моноклональные антитела?

## **2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа)**

**Тема: «Серологические реакции, цели постановки, общая характеристика».**

**2.8.1 Цель работы:** получить представление о серологических реакциях.

### **2.8.2 Задачи работы:**

1. Определить цели постановки серологических реакций.
2. Познакомить с классификацией серологических реакций, антигенов и антител, участвующих в серологических реакциях.
3. Познакомить с методикой получения сыворотки крови.

### **2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Табличный материал.
2. Серологические пробирки, диагностические сыворотки и антигены, термостат, холодильник, штативы серологические, стеклянные капилляры кровь,

### **2.8.4 Описание работы**

Серология как раздел иммунологии занимается постановкой и учетом серологических реакций. Серологические реакции – это реакции между антигенами и антителами, воспроизведенные вне организма.

Цели постановки серологических реакций:

- 1) по известному антигену обнаружить антитела в сыворотке крови;
- 2) по известной сыворотке обнаружить антигены (чаще всего в патматериале или провести идентификацию выделенной культуры);
- 3) провести исследования напряженности иммунитета;
- 4) для проведения ретроспективной диагностики.

Серологические реакции по конечному взаимодействию АГ и АТ подразделяются на следующие типы: осадочные; лизирующие; нейтрализующие.

Фазы протекания осадочных реакций: 1) специфическая невидимая (происходит образование иммунных комплексов АГ-АТ); 2) неспецифическая видимая (иммунные комплексы выпадают в осадок).

Антигены, участвующие в серологических реакциях подразделяются на корпускулярные или клеточные (в их роли выступают целые микробные клетки или эритроциты) и молекулярно-дисперсные или растворимые (в их роли выступают токсины или отдельные части микробных клеток).

Антитела, участвующие в серологических реакциях, подразделяются на следующие виды: агглютинины; преципитины; бактериолизины; гемолизины; нейтрализующие.

Одним из компонентов реакций является сыворотка крови. Этапы получения сыворотки: 1) взятие крови из вены в стерильные пробирки (кровь должна стекать в пробирку по стенке); 2) пробирки с кровью помещают в термостат при температуре

37° С на 30-40 мин (для свертывания); 3) обводка (сгусток отделяется от стенок металлической спицей или тонко оттянутой пастеровской пипеткой); 4) пробирки помещаются в холодильник (на 8-12 часов для ретракции сгустка); 5) переливание сыворотки в серологические пробирки стерильные (сыворотка должна быть светло-желтого цвета, прозрачная).

Основные серологические реакции: РА; РП; РСК; РИФ; ИФА; РН.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с наглядным материалом.
2. Ознакомится с различными диагностическими наборами для серологических исследований.
3. Приготовить из нативной крови сыворотку крови.

### **Контрольные вопросы**

1. Каковы цели постановки серологических реакций?
2. Как классифицируются антитела, участвующие в серологических реакциях?
3. Как классифицируются антигены, участвующие в серологических реакциях?
4. Каковы этапы приготовления сыворотки из нативной крови?

## **2.9 Лабораторная работа № 9 ( 2 часа)**

### **Тема: «Реакции агглютинации (РА)»**

**2.9.1 Цель работы:** дать представление о сущности реакции агглютинации и ее модификациях.

### **2.9.2 Задачи работы:**

- 1.Познакомить студентов с механизмом РА.
2. Познакомить студентов с модификациями РА.
- 3.Освоить методы постановки реакции пробирочным и капельным методами.

### **2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Бруцеллезный роз-бенгал антиген, позитивная бруцеллезная сыворотка, единый бруцеллезный антиген.
2. Планшеты, мерные пипетки, пробирки серологические, штативы для серологических пробирок, физиологический раствор, пастеровские пипетки, резиновые груши

### **2.9.4 Описание работы**

*Агглютинацией* называется склеивание микробных или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролитов. Двухфазный характер этого взаимодействия ничем не отличается от механизма других двухкомпонентных реакций иммунитета: первая фаза – соединение бактерий с антителом; вторая – соединение бактерий под влиянием солевого раствора. Антиген, вступающий в реакцию, носит название агглютиногена, антитела сыворотки – агглютинины, а комплекс антигена + антитело, выпадающий при положительной реакции – агглютинат.

Реакция агглютинации используется для серологической диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бруцеллеза, сальмонеллеза, колибактериоза, сапа, листериоза, кампилобактериоза и др.

Она проводится для:

- а) обнаружения специфических антител в исследуемых сыворотках;
- б) установления вида (серогруппы, сероварианта) выделенного микроорганизма (антигена) из патологического материала с использованием известных сывороток, содержащих специфические антитела.



Агглютинация происходит при температуре 37°C в слабощелочной солевой среде.

Существует много вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая реакция агглютинации, которая проводится в пробирках с различными разведениями сыворотки; на предметных стеклах (капельная, пластинчатая: кровяно-капельная гемагглютинация; кольцевая проба (реакция) с молоком, Роз-бенгалева проба (РБП) и др.).

Компонентами для постановки реакции агглютинации для определения вида микроба с использованием известных специфических сывороток являются:

1. Диагностические агглютинирующие сыворотки.

2. Исследуемый антиген, в качестве последнего используют взвесь микробов. Для этого суточную или 20-часовую изучаемую культуру на скошенном МПА смывают 5 мл 0,85%-ного раствора хлористого натрия и переносят в чистую пробирку.

При постановке капельным методом антигеном служит микробная культура.

3. Физиологический раствор поваренной соли.

*Постановка реакции агглютинации пробирочным методом.* В качестве примера выступает РА на бруцеллез с сывороткой крови крупного рогатого скота.

Реакция ставится в объеме 1 мл жидкости. Разлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками; автоматическими пипетками Флоринского, одиночными или групповыми.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок, поставленных в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых сывороток. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки. После приготовления основного разведения сывороток в остальные 4 пробирки, кроме 2-й, каждого ряда разливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из первой пробирки из разведения 1:25 вносят 0,5 мл во вторую пробирку, получая разведение 1:50. Из этого разведения готовят разведение 1:100, перенося из одной пробирки 0,5 мл жидкости. Методом последовательного разведения готовят разведение 1:200 и 1:400. Из последней пробирки (1:400) излишек жидкости 0,5 мл удаляют. Во все пробирки, кроме первой, вносят по 0,5 мл антигена, разведенного 1:10. Таким образом получают ряд из четырех исследуемых пробирок с разведениями сыворотки 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме 0,5 мл. Первая пробирка с сывороткой в разведении 1:25 без антигена служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроля:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех разведениях, как с исследуемыми;
- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации.

После розлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно стряхивают и помещают в термостат при 37-38°C на 16-20 ч, затем выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах:

(++++)- полное просветление жидкости, на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100%-ная агглютинация);

(+++)- неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании – мелкие зерна (75%-ная агглютинация);

(++)- незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50%-ная агглютинация);

(+)- едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество зерен (25%-ная агглютинация);

(–) – просветление жидкости, образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется равномерная взвесь.

*За титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++)*.

*Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.*

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сыворотками крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два (++)

Для определения природы антител в исследуемом материале предложено несколько модификаций проведения реакции агглютинации.

Применяется КР с целью проверки благополучия стад на бруцеллез крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Компонентами реакции являются:

-исследуемое молоко;

-антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, который представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет;

- сыворотка позитивная бруцеллезная.

В агглютинационные пробирки берут по два мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с антигеном. При каждой постановке реакции одновременно с испытуемыми пробами молока ставят контроли: с молоком от заведомо здоровой коровы; со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока). Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водяную баню или термостат при 37-38°C на 1 час. Если в молоке имеются бруцеллезные антитела, то они образуют с антигеном комплекс, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывают вверх, образуя синее кольцо (остальная часть молока остается белой) – реакция положительная. При отрицательной реакции столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после добавления к нему антигена, а слой сливок – белого или слегка желтоватого цвета.

*Капельный метод РА* применяют в основном для идентификации культур бактерий, а также для установления их принадлежности к определенным серогруппам и серовариантам. Так поступают при диагностике колибактериоза и сальмонеллезов. Техника постановки РА сводится к следующему. На предметное стекло наносят каплю сыворотки и каплю физиологического раствора (контроль). Петлю с бактериальной культурой увлажняют в капле сыворотки, затем культуру тщательно растирают рядом с каплей, смешивают с сывороткой и энергично 6-10 раз покачивают стекло круговыми движениями. Агглютинация наступает сразу или не позднее 1-2 мин. Реакцию агглютинации учитывают при хорошем освещении. Пользование лупой облегчает учет реакции.

Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную взвесь. То же самое должно быть при проведении контроля (антиген + физиологический раствор).

Роз-бенгал проба (РБП). Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз-бенгал антигеном применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у многих видов животных.

Компонентами РБП являются: испытуемые сыворотки крови; бруцеллезный антиген для РБП, изготавливаемый на биопредприятиях, представляет собой стандартизованную

суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет; позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки; 0,5%-ный карболизированный физиологический раствор.

Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18-30°C. Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки. При исследовании сывороток крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток других животных – 0,015 мл, тщательно смешивают покачиванием и легким вращением в течение 4 мин. Одновременно проводят контроли антигена с позитивной и негативной сыворотками, с физиологическим раствором. Реакцию считают положительной при выраженной агглютинации окрашенных бруцелл в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

Реакция гемагглютинации (РГА). Эта реакция не относится к реакциям иммунитета, так как является результатом действия естественных гемагглютининов некоторых бактерий и вирусов на эритроциты, что влечет за собой их агглютинацию.

Реакцию ставят на плексигласовых панелях с лунками.

Исследуемый материал разводят физраствором и к этим разведениям добавляют равный объем 1-2%-ной взвеси эритроцитов, после чего панели с реакцией помещают в термостат на 30 мин или оставляют при комнатной температуре на 1 ч.

Учет реакции производят по характеру осадка. При положительной реакции осадок из склеившихся эритроцитов имеет форму раскрытого «зонтика» с изрезанными краями, а при отрицательной — компактный диск в виде «кнопки» с ровными краями.

Реакция гемагглютинации позволяет только выявить гемагглютинирующую способность бактерий и вирусов.

Для идентификации этих микроорганизмов в дальнейшем используют реакцию торможения гемагглютинации.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА – иммунная реакция, в которой специфические антитела, взаимодействуя с антигеном, лишают его способности агглютинировать эритроциты.

Реакция проводится в два этапа. На первом этапе разводят специфическую сыворотку от 1:10 до 1:1280, К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем жидкости, содержащий антиген в четырехкратном титре, который определен в РГА. Если титр антигена равен 1:640, агглютинируют эритроциты, делают разведение в 4 раза концентрированное – 1:160.

После инкубирования при 37°C в течение 30 мин на втором этапе к этой смеси добавляют равный объем 1-2%-ной взвеси эритроцитов. Если сыворотки и антигена взято по 0,25 мл, то эритроцитов добавляют 0,5 мл.

Контролем является проба, где сыворотка заменена физраствором. Реакция читается после выдерживания в течение 30 мин в термостате или 45 мин при комнатной температуре.

При положительной РТГА образуется плотный осадок эритроцитов (задержка реакции) на дне пробирки, имеющих вид «пуговки» диска.

При отрицательной РТГА отмечается выраженная гемагглютинация в виде «зонтика».

Реакция используется для идентификации и типизации выделенного антигена, титрования вирусосодержащих жидкостей и материалов и серологическом диагностики вирусных инфекций.

Реакция непрямой гемагглютинации (Р Н Г А). Сущность этой реакции заключается в том, что на поверхность эритроцитов адсорбируют или антиген, или антитела (иммуноглобулины), которые приобретают способность агглютинироваться в присутствии специфических антител или антигена. Главными достоинствами РНГА – высокая

чувствительность и специфичность, техническая простота, стабильность используемых компонентов. РНГА применяют при диагностике инфекционных болезней:

- 1) для обнаружения в титрования антител в исследуемой сыворотке крови с помощью известного эритроцитарного антигенного диагностикума;
- 2) для идентификации неизвестного антигена с помощью известного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума.

Учет РНГА проводится так же, как и при постановке РГА.

### Задания для самостоятельной работы

1. Поставить пробирочную РА, капельную РА (РБП), кольцевую РА с молоком.
2. Заполнить протокол исследования.

#### Протокол исследования

Вид серологической реакции	Результат реакции

### Контрольные вопросы

1. В чем сущность феномена агглютинации?
2. Каким образом неизвестный микроорганизм идентифицируется в РА?
3. Как определить титр сыворотки в пробирочной РА?

### 2.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа)

**Тема:** «Реакции преципитации (РП)».

**2.10.1 Цель работы:** познакомить студентов с реакцией преципитации (РП).

**2.10.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с сущностью реакции преципитации.
2. Познакомить студентов с техникой постановки реакции кольцепреципитации (РКП) и диффузионной преципитации (РДП).

**2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Сибиреязвенная преципитирующая сыворотка, стандартный сибиреязвенный антиген, стерильный физиологический раствор.
2. Пастеровские пипетки, пробирки Уленгута, 1,5%-й агаровый гель, стерильные чашки Петри, штампы для РДП, трафареты, эксикатор, табличный материал.

#### 2.10.4 Описание работы

Реакция преципитации (РП), как и реакция агглютинации, принадлежит к разряду серологических реакций осадочного типа, но в отличие от РА в ней используют не корпускулярные, а растворимые антигены микроорганизмов. Образование комплексов антиген — антитело сопровождается изменением оптической плотности среды (помутнением) — преципитацией (от лат. praecipitatio — падение вниз), что расценивают как положительный результат реакции.

Антиген для РП готовят из чистых культур микроорганизмов, если антиген предназначен для серодиагностики, или из тканевого материала, содержащего микроорганизмы, если РП ставят, чтобы при помощи известной иммунной сыворотки обнаружить возбудитель в патологическом материале.

Физические методы экстрагирования антигенов основаны на механическом разрушении микробных клеток посредством растирания с кварцевым песком, встряхивания на шюттель-аппарате в колбе со стеклянными шариками, многократного

замораживания и оттаивания или воздействия ультразвуком. Полисахаридные термостойкие антигены выделяют термической обработкой (кипячением, автоклавированием).

Из химических методов получения антигенов достаточно широко используют экстрагирование трихлоруксусной кислотой (полный антиген Буавена); кислотный или щелочной термогидролиз—прогревание материала, например, в 1%-м растворе уксусной кислоты или 0,1 н. растворе гидроксида натрия; экстрагирование при помощи ацетона, мочевины, этилового спирта, эфира и других растворителей; часто применяют различные детергенты — дезоксихолат натрия, лаурилсульфат натрия и т.д.; используют методы ферментативного разрушения микробных клеток, например, посредством воздействия трипсином.

На основе феномена преципитации разработаны реакция кольцепреципитации (РКП), реакция диффузионной преципитации (РДП), радиальной иммунодиффузии; принцип реакции преципитации использован в иммуноэлектрофорезе и встречном иммуноэлектрофорезе.

*Реакция кольцепреципитации (РКП).* Известна по имени автора как реакция Асколи (1911); разработана для диагностики сибирской язвы. РКП используют в ветеринарной диагностической практике преимущественно для выявления микробных антигенов в тканевом материале. Обязательное условие постановки РКП — прозрачность раствора антигена и иммунной сыворотки, поэтому при необходимости компоненты реакции освобождают от взвешенных частиц фильтрованием, например, через асбестовую вату. Техника постановки РКП включает в себя три варианта: метод «наслаивания» антигена (в уленгутевские пробирки вносят пастеровской пипеткой с тонким капилляром, не смачивая стенок пробирки, 0,3...0,4 мл иммунной преципитирующей сыворотки, затем по стенке пробирки осторожно наслаивают на поверхность сыворотки 0,1...0,2 мл растворимого исследуемого антигена, смешивания компонентов не происходит благодаря различию плотности сыворотки и экстракта, учет результатов проводят на фоне темной бумаги, через 1...2 мин в зоне взаимной диффузии антигена и антител, на границе контакта компонентов, происходит помутнение среды, видимое сбоку как серо-белый диск); метод «подслаивания» антител (в пробирку вначале вносят антиген, а затем осторожно при помощи пастеровской пипетки на дно пробирки, под антиген, «подслаивают» иммунную сыворотку); микровариант РКП был разработан для экономии компонентов.

При постановке кольцевой РП в ходе исследования тканевого материала необходимы следующие контроли: 1) иммунная сыворотка + стандартный антиген; 2) иммунная сыворотка + физиологический раствор; 3) иммунная сыворотка + экстракт из тканей здоровых животных. Показания РП считают достоверными, если в первом контроле получают положительный, а в остальных — отрицательный результат.

*Реакция диффузионной преципитации (РДП).* Основана на встречной диффузии антител (иммунной сыворотки) и растворимых антигенов в агаровом геле (двойная диффузия). Если антиген состоит из смеси моноантигенов, то каждый из них диффундирует с различной скоростью и точки эквивалентных соотношений каждого антигена и гомологичных антител будут находиться в различных участках агарового геля, где и формируется преципитат в виде линий. Таким образом, каждая пара антиген — антитело образует свою линию преципитации. При помощи РДП можно анализировать сложные антигенные смеси, поскольку каждый антиген дает свою линию преципитации. В ряде случаев РДП используют как метод серологической диагностики инфекционных болезней. Из очищенного агара фирмы «Дифко» готовят 1,5%-й раствор агара в физиологическом растворе (рН 7,2...7,4) с добавлением мертиолата (конечное разведение 1:10 000) как консерванта. На хорошо обезжиренное стекло, лежащее строго горизонтально, наливают расплавленный агар в количестве, достаточном для формирования слоя геля толщиной

3...4 мм. Затем штампами вырезают лунки в агаровом геле; агар из лунки удаляют с помощью трубочек. На дно лунки вносят каплю горячего агара с последующим его удалением, что создает «дно» лунки и предотвращает подтекание компонентов под гель.

В зависимости от конкретной задачи применяют штампы с различным количеством пробойников, обеспечивающие получение лунок разного диаметра и на разном расстоянии. При изучении неизвестных реагентов оптимальное расстояние между лунками необходимо установить в предварительных опытах. В зависимости от конкретной задачи в центральную лунку вносят иммунную сыворотку, в периферические — анализируемые антигены или наоборот. Сыворотка и антиген не должны выходить за пределы лунки на поверхность агара. Затем пластины помещают в эксикатор. На дно эксикатора наливают небольшое количество воды с антисептиком. Пластины с компонентами выдерживают при комнатной температуре 10...72 ч.

Учет результатов: полосы преципитации образуются только в зоне эквивалентности, т. е. там, где все антитела связаны с антигеном. (Если в жидкой среде соединить эквивалентные количества реагентов, то в надосадочной жидкости после формирования преципитата не будет свободных антигена и антител.)

При изучении в РДП различных антигенов возможны три варианта результата реакции: 1) реакция идентичности: слияние линий преципитации, относящихся к двум соседним антигенам (у сравниваемых антигенов гомологичные детерминанты — антигены оценивают как идентичные); 2) реакция неидентичности: пересечение линий преципитации (у сравниваемых антигенов нет гомологичных антигенных детерминант); 3) реакция неполной идентичности: неполное пересечение линий преципитации с формированием так называемой «шпоры» (такая картина возникает, когда у одного из антигенов помимо гомологичных есть и специфические детерминанты, которые второй антиген в составе своей молекулы не несет).

#### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с техникой постановки и учета результатов кольцевой РП и РДП.
2. Поставить РКП и РДП, произвести учет, заполнить протокол.

#### **Протокол исследования**

Модификация РП	Учет результатов

#### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность феномена преципитации?
2. Какова техника постановки РДП?
3. Какова техника постановки кольцевой РП?

#### **2.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа)**

**Тема: «Реакция связывания комплемента».**

**2.11.1 Цель работы:** дать представление о реакции связывания комплемента.

**2.11.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с сущностью РСК.
2. Познакомить студентов с этапами постановки РСК.

**2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Физиологический раствор, 2,5%-я суспензия эритроцитов барана в

- физиологическом растворе, бруцеллезный антиген, положительная бруцеллезная свинки, гемолизин.
2. Мерные пипетки на 1 и 5 мл, серологические пробирки, водяная баня.
  3. Табличный материал.

#### 2.11.4 Описание работы

Реакция связывания комплемента (РСК) заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через Fc-фрагмент антител присоединяется комплемент (C), т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело. Если же комплекс антиген—антитело не образуется, то комплемент остается свободным. Специфическое взаимодействие АГ и АТ сопровождается связыванием комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом АГ-АТ. Если АГ и АТ соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если АТ не соответствует АГ, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз.

**Компоненты.** Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям. Для ее проведения необходимы 5 ингредиентов, а именно: АГ, АТ и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система). Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, тканевых липидов, вирусы и вирусосодержащие материалы. В качестве комплемента используют свежую или сухую сыворотку морской свинки.

**Механизм.** РСК. Реакция проводится в две фазы: 1-я фаза — инкубация смеси, содержащей три компонента антиген + антитело + комплемент; 2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана, и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген—антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз сенсibilизированных антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит — антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз; реакция отрицательная.

**Характеристика компонентов.**

1. Солевой раствор для разведения компонентов: используют физиологический раствор. Более стабильные результаты иммунного гемолиза получают при введении в раствор ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , поскольку они необходимы для эффективного действия системы комплемента.
2. Эритроциты барана: эритроциты дефибринированной крови барана отмывают физиологическим раствором (2500 мин-1 три раза по 5 мин). В реакции обычно используют 2,5%-ю суспензию.
3. Гемолизин выпускают биофабрики. Представляет собой сыворотку крови кролика, иммунизированного эритроцитами барана, содержащую антитела к эритроцитам. На коробках с гемолизином указывают его активность в виде титра, определенного в реакции иммунного лизиса.
4. Комплемент — сыворотка крови морской свинки. Биофабрики выпускают комплемент в лиофилизированном виде (срок годности 1 год). В случае необходимости комплемент можно получить пункцией сердца морской свинки при помощи шприца с иглой.

5. Антиген: диагностические антигены для РСК готовят на биофабриках. На коробках с антигеном указывают его активность (титр антигена) в виде разведения, рекомендованного для использования в РСК.

6. Все исследуемые сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают при 56...64 °С в водяной бане для инактивации собственного комплемента.

При длительном хранении гемолизина и комплемента перед постановкой главного опыта РСК их титруют на гемолитической системе. Титром комплемента считают минимальное его количество, которое обеспечивает полный гемолиз суспензии эритроцитов в пробирках с негативной сывороткой и антигеном и позитивной сывороткой без антигена.

Главный опыт РСК. Кроме исследуемых сывороток крови при постановке основного опыта РСК в качестве контрольных используют положительную и отрицательную сыворотки крови. Все сыворотки предварительно разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 5 и прогревают при 56...64 °С в водяной бане для инактивации собственного комплемента.

Результат РСК учитывают по наличию или отсутствию гемолиза эритроцитов в пробирках и выражают в крестах: 1)(++++) — полная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость прозрачная); 2) (+++) — задержка гемолиза сильно выражена (после оседания эритроцитов жидкость слабозащелочного цвета); 3) (++) — частичная задержка гемолиза (после оседания эритроцитов жидкость интенсивно окрашена в красный цвет); 4) (+) — слабая задержка гемолиза (незначительный осадок эритроцитов, жидкость интенсивно окрашена); 5) (—) — полный гемолиз, осадка эритроцитов нет.

Как положительный результат РСК оценивают задержку гемолиза минимум на два креста и более.

Учет результатов начинают с контрольных пробирок:

7-я пробирка — контроль физиологического раствора: гемолиза не должно быть;

6-я пробирка — контроль индикаторной системы и комплемента: должен быть полный гемолиз;

5-я пробирка — контроль антигена: должен быть полный гемолиз;

3-я пробирка — контроль с отрицательной сывороткой: должен быть полный гемолиз;

2-я пробирка — контроль с положительной сывороткой: должна быть задержка гемолиза.

Если все перечисленные контроли свидетельствуют о правильности приготовления компонентов реакции и выборе их доз, приступают к учету результатов РСК с исследуемой сывороткой крови.

Первоначально учитывают результаты в 4-й пробирке (безантигенный ряд) — контроль антикомплемента сыворотки. При полном гемолизе в 4-й пробирке (отсутствие антикомплемента) можно учитывать результат в 1-й пробирке (антигенный ряд), где результат может варьировать от полного гемолиза (отрицательный результат) до полной задержки гемолиза (положительный результат). Если исследуемая сыворотка антикомплемента, то результат в первой пробирке учитывать нельзя и от этого животного необходимо брать кровь для повторного исследования. Окончательный учет результатов РСК проводят через 18...20 ч, за это время не лизированные эритроциты оседают на дно пробирки.

Рассмотрена постановка РСК в макроварианте (2,5 мл), есть микровариант - объеме 1 мл, когда каждый компонент взят в объеме 0,2 мл.

#### **Задания для самостоятельной работы**

1. Ознакомится с техникой постановки РСК и ее учетом.
2. Провести постановку главного опыта РСК.
3. Зарисовать схему постановки РСК и заполнить протокол исследования.

#### **Протокол исследования**

Ход главного опыта РСК	Характеристика компонентов реакции
------------------------	------------------------------------



--	--

## Контрольные вопросы

1. В чем сущность РСК?
2. Что представляет собой комплемент?
3. Какова схема постановки главного опыта РСК?
4. В чем отличие РСК от РДСК?

### 2.12 Лабораторная работа № 13 (2 часа)

**Тема: «Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)».**

**2.12.1 Цель работы:** познакомить студентов с реакциями иммунофлуоресценции и реакции нейтрализации.

**2.12.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с сущностью РИФ и РН.
2. Рассмотреть этапы постановки и учет этих реакций.

**2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Табличный материал.

**2.12.4 Описание работы**

Реакцию иммунофлуоресценции, предложил Кунс в 1942 году. Однако эта старая реакция получила в настоящее время "вторую жизнь" благодаря появлению гибридных технологий, позволяющих получать моноклональные антитела. Их применение позволило значительно увеличить ее чувствительность и специфичность. Популярность РИФ объясняется экономичностью, наличием широкого спектра диагностических наборов, быстротой получения ответа. Сегодня в этой реакции используются как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела меченые флюоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Для уменьшения неспецифического свечения фона применяют обработку мазка бычьим сывороточным альбумином, меченным родамином или голубым Эванса. Это комплексный метод сочетает в себе серологическую реакцию, при которой происходит специфическое взаимодействие антигена и антитела с образованием иммунного комплекса, и микроскопическое исследование под люминесцентным микроскопом, с помощью которого этот комплекс обнаруживают.

Преимущество РИФ состоит в том, что с его помощью возможно за два-три часа серологически идентифицировать микроорганизм непосредственно в патологическом материале, без выделения в чистой культуре (экспресс-метод). РИФ применяют и для выявления антител в крови животных.

Приготовление препарата для РИФ. При выявлении возбудителя инфекции (антигена) на предметном стекле готовят мазки-отпечатки из органов или другого материала. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют ацетоном (5 мин), или этанолом (10.... 15 мин), или метанолом (5...10 мин). Препарат можно фиксировать и нагреванием, как при обычной световой микроскопии. Мазки-отпечатки из органов и тканей лучше обрабатывать охлажденным до -20 °С ацетоном 2...4 мин. В зависимости от конкретных задач окрашивание готовых препаратов люминесцирующими сыворотками проводят различными способами.

*Прямая РИФ.* Разработал Coons с соавт. (1950). На предметное стекло с фиксированным антигеном наносят каплю люминесцирующей иммунной сыворотки в рабочем разведении, содержащей антитела против искомого антигена. Чтобы избежать высыхания, препарат помещают во влажную камеру (чашку Петри) с фильтровальной бумагой, смоченной водой, и выдерживают в термостате при 37...38 °С 15...30 мин. Затем

препарат 5... 10 мин промывают от несвязавшихся иммуноглобулинов проточной (водопроводной) водой с рН не ниже 7,0. Промытый препарат высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Прямая РИФ используют только для идентификации неизвестного антигена; к его недостатку относят необходимость приготовления люминесцирующей сыворотки для каждого вида идентифицируемого микроорганизма.

*Непрямая РИФ.* Применяют в двух вариантах. Двухступенчатая РИФ - предложили Weller и Coons (1954). Этот вариант считают более универсальным, так как при помощи одной люминесцирующей антивидовой сыворотки можно выявлять различные виды микроорганизмов. На антиген наносят каплю немеченной иммунной сыворотки (сыворотка первой ступени). Препарат выдерживают в термостате 15...30 мин, затем его промывают, чтобы удалить несвязавшиеся антитела иммунной сыворотки, и просушивают. Если антитела сыворотки первой ступени соответствуют антигену, то вода не вымывает образовавшийся АГ-АТ-комплекс (антитела зафиксированы на антигене). На подсушенный препарат наносят каплю люминесцирующей антивидовой сыворотки (сыворотка второй ступени) в рабочем титре. Препарат повторно помещают в термостат во влажной камере на 15...30 мин, затем промывают водой и подсушивают. Антивидовая сыворотка представляет собой меченные флуорохромом антитела против иммуноглобулинов крови животного того вида, от которого получена иммунная сыворотка первой ступени. Таким образом, антитела первой сыворотки служат антигеном для меченых антител антивидовой сыворотки. В результате, к образовавшемуся на первом этапе АГ-АТ-комплексу присоединяются антитела второй ступени, образуется двойной комплекс, который можно обнаружить в люминесцентном микроскопе.

Универсальность непрямого варианта обусловлена тем, что, используя на первом этапе полученные от животных одного вида (например, от лошадей) иммунные сыворотки против различных микроорганизмов, на втором этапе с помощью одной антивидовой сыворотки можно идентифицировать неограниченное количество возбудителей инфекционных болезней.

*Трехступенчатая РИФ.* Представляет собой вариант РСК на стекле. В данном случае в иммунном комплексе на стекле при помощи люминесцирующей сыворотки выявляют связанный комплемент.

Наибольшее распространение получили наборы, основанные на прямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ), однако имеются тест-системы, использующие реакцию непрямого иммунофлуоресценции

Оценка результатов РИФ. Учитывают яркость свечения, цвет, локализацию и структуру свечения. Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: 1) (++++ ) — очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темной центральной частью клетки; 2) (++++) — яркая флуоресценция периферии клетки; 3) (++) — слабое свечение периферии клетки; 4) (+) — нет контрастного свечения периферии и центральной части микробной клетки. Отсутствие специфического свечения обозначают знаком «минус» (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей болезней положительным результатом чаще считают специфическое свечение бактериальных клеток не ниже, чем на четыре или три креста.

### **Задания для самостоятельной работы**

1. Познакомится со схемами постановки РИФ.
2. Зарисовать схему постановки прямого и непрямого метода постановки РИФ.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность одноступенчатого РИФ?
2. В чем сущность двухступенчатого РИФ?

3. В чем сущность трехступенчатого РИФ?
4. Для каких целей используют РИФ?
5. Какой флуорохром чаще всего используется в лабораторной практике?

### **2.13 Лабораторная работа № 13 (2 часа)**

**Тема: «Реакция иммуноферментного анализа (ИФА)».**

**2.13.1 Цель работы:** познакомить студентов с иммуноферментным анализом.

#### **2.13.2 Задачи работы:**

1. Познакомить студентов с сущностью ИФА.
2. Рассмотреть этапы постановки и учета прямого и непрямого методов ИФА.

#### **2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Табличный материал, видеоматериал.
2. Оборудование для постановки ИФА (шейкер-инкубатор, автоматический промыватель для микропланшет, ридер), автоматические пипетки (8-и канальные), диагностический набор для постановки ИФА на бруцеллез, исследуемые сыворотки.

#### **2.13.4 Описание работы**

Иммуноферментный анализ используется в двух целях: при необходимости определить наличие антигенов возбудителя какой-либо инфекции, либо (что практикуется гораздо чаще) для установления присутствия антител класса IgA, IgM, IgG к антигену возбудителя болезни. Принцип иммуноферментного анализа базируется на иммунной реакции антигена с антителами, когда, присоединяя к антителам ферментную метку, исследователь определяет результаты реакции антитело-антиген, фиксируя появление, либо изменение уровня ферментативной активности.

Первая реакция наблюдается между очищенным антигеном возбудителей (АГ) и устанавливаемым Ig (АТ) путем фиксирования к плоскости лунок планшета иммунолога. Вторая иммунологическая реакция проводится с целью выявления появившихся иммунных комплексов. В роли антигена здесь используют специфический связавшийся Ig, антителами же к нему выступает конъюгат – Ig (антииммуноглобулин) к определенному Ig человека (животных), который метят ферментом (чаще пероксидазой). Происходящую за этим ферментативную реакцию катализирует ферментная часть молекулы конъюгата. В качестве субстрата реакции применяют не имеющее цвета вещество под названием хромоген, в процессе реакции хромоген приобретает окраску. По интенсивности окрашивания лунки определяют количество находящегося в пробе иммуноглобулина. По завершению реакции проводится фотометрирование лунки, учет результатов ведут при помощи специального прибора. Математическая обработка результатов исследования показывает наличие и количество характерных антител в пробе.

Для серодиагностики используют 96-луночный полистирольный планшет, на боковых поверхностях ячеек которого заблаговременно адсорбируют антиген. При внесении исследуемой сыворотки в ячейки планшета к антигену прикрепляются гомологичные ему антитела. Затем в ячейки помещают меченные ферментом антитела против антител (иммуноглобулинов) человека. В случае, если исследуемая сыворотка содержит определяемые антитела - они проявятся как антигены, в реакцию с которыми вступят меченные антитела. Добавленный после промывки хромоген (краситель) позволит зафиксировать реакцию по характерному окрашиванию ячеек. Интенсивность такой окраски будет пропорциональна доле фермента, и, соответственно – количеству антител. Измеряя оптическую плотность (ОП) находящейся в ячейке жидкости и сравнивая ее с шаблонным образцом, подсчитывают концентрацию антител на единицу объема. Чаще

всего результат подсчитывают в единицах ОП. Характерно, что каждая тест-система снабжена собственными показателями патологии и нормы, а также показателями учета результатов, которые и следует принимать во внимание, интерпретируя результаты. ИФА используют в гистохимическом (иммунопероксидазная реакция) и твердофазном вариантах.

**Твердофазный ИФА.** Применяют наиболее широко. В этом случае антитела или антигены фиксируют на нерастворимых носителях: микропанелях, стеклянных или нейлоновых шариках. Обнаружение антигена (антител) по схеме «сэндвич». Для обнаружении АТ в исследуемой сыворотке лунки полистироловых микропанелей, сенсibiliзируют специфическими для искомого антитела антигеном. Добавляют в лунки образцы сывороток, инкубируют в шейкере-инкубаторе при 37 °С, отмывают лунки от несорбированных антител фосфатно-буферным раствором. Далее в лунки вносят конъюгат (меченые ферментом, чаще всего пероксидазой хрена, антивидовые моноклональные АТ); панели инкубируют при 37 °С, затем их отмывают от несвязавшихся антител. В лунки вносят субстрат (перекись водорода) и хромоген (чаще всего тетраметилбензидин - ТМБ) инкубируют в темноте при 20...22 °С от 5 до 30 мин, при наличии иммунных комплексов в лунках наблюдается синее окрашивание. Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты (для пероксидазы), синее окрашивание меняется на желтое. Учет результатов визуальный или спектрофотометрический.

Обнаружение антигенов основано на том же принципе, но твердофазный носитель сенсibiliзируют известным антителом, добавляют исследуемый материал, затем конъюгат. Вносят субстрат и по цветной реакции судят о наличии или отсутствии антигенов в исследуемом материале.

#### **Задание для самостоятельной работы**

1. Изучить технику постановки ИФА.
2. Пронаблюдать весь ход реакции, зарисовать схему.
3. Заполнить протокол исследования.

#### **Протокол исследования**

Проба сыворотки	Результат реакции

#### **Контрольные вопросы**

1. В чем сущность ИФА?
2. Оборудование, необходимое для постановки этой реакции?
3. В чем особенность гистохимического и непрямого твердофазного методов?
3. Как происходит учет реакции?

### **2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).**

#### **Тема: «Реакция нейтрализации»**

**2.14.1 Цель работы:** дать представление об этапах постановке РН.

#### **2.14.2 Задачи работы:**

1. Знакомство с этапами постановки реакции нейтрализации.
2. Инфекции, при которых ставится РН.

#### **2.14. 3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Таблицы, диагностикумы с моноклональными антителами.

#### 2.14.4 Описание (ход) работы

**Реакция нейтрализации.** Относится к иммунологическим реакциям, в которых, например, учитывают потерю биологической активности антигена при взаимодействии с гомологичными антителами. Если антигеном служит бактериальный экзотоксин, то он теряет свои токсические свойства (нейтрализуется), вирус как антиген теряет в этом случае инфекционное действие и т. д.

В бактериологических диагностических исследованиях наиболее часто используют РН как метод обнаружения и идентификации бактериальных токсинов.

РН бактериального экзотоксина. Используют при диагностике таких бактериозов, как ботулизм, инфекционная энтеротоксемия овец и др., возбудители которых (*C. botulinum*, *C. perfringens*) синтезируют сильный экзотоксин. Для постановки диагноза на эти бактериальные инфекции достаточно обнаружить экзотоксин в РН. Рассмотрим технику постановки РН на примере обнаружения токсинов *C. perfringens*. Для постановки РН необходимы диагностические иммунные сыворотки, содержащие антитела к определенному бактериальному токсину. Такие диагностические сыворотки получают путем гипериммунизации животных-продуцентов анатоксинами, токсинами инактивированными (формальдегидом), но сохранившими свои иммуногенные свойства. *C. perfringens* продуцирует шесть типов экзотоксинов, различающихся по антигенной структуре (А, В, С, D, Е, F).

Исследуемый материал, в котором предположительно находится токсин (содержимое кишечника), разводят физиологическим раствором в соотношении 1:1, экстрагируют при комнатной температуре 1 ч, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют при 5000 мин<sup>-1</sup> 20 мин. Надосадочную жидкость вводят внутрибрюшинно или внутривенно по 0,5 мл двум белым мышам массой 16... 18 г. При наличии токсина в исследуемом материале животные погибают в течение 12 ч. После обнаружения токсина его идентифицируют в реакции нейтрализации.

Диагностические антитоксические сыворотки (типов А, С, D, Е) предварительно разводят стерильным физиологическим раствором до концентрации 10 ед/мл. Содержимое каждой пробирки после инкубирования вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 0,5 мл двум белым мышам. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч. Если токсин принадлежит *C. perfringens*, то мыши, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, остаются живы.

#### Контрольные вопросы

1. В чем сущность реакции нейтрализации?
2. Для диагностики каких инфекций используется эта реакция?
3. Какие тест-объекты чаще всего используются в лабораторной практике

#### 2.15-16 Лабораторная работа №15-16 (4 часа).

**Тема: «Определение иммунного статуса человека и животных»**

**2.15-16.1 Цель работы:** знакомство с методами определения иммунного статуса животных.

**2.15-16.2 Задачи работы:**

1. Знакомство с тестами для определения иммунологического статуса животных.
2. Практическое выполнение одного из тестов – выведение лейкограммы крови.

**2.15-16. 3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе**

1. Пробирки, кровь, антикоагулянт, пипетки, предметные стекла, метиленовая синька Леффлера.

2. Табличный материал.
3. Микроскопы бинокулярные.

## 2.15-16.4 Описание (ход) работы

**Иммунный статус** - комплекс количественных и функциональных показателей, отражающих конкретное состояние иммунной системы, определяемое с помощью стандартных общепринятых тестов. В настоящее время выделяют иммунодиагностические методы 1-го и 2-го уровня.

Отличительные особенности иммунодиагностических тестов 1 и 2 уровня

Тесты 1-го уровня	Тесты 2-го уровня
Ориентировочные	Аналитические
Методики доступны	Методики трудоемкие
Получение результата в течении нескольких суток	Получение результата в течении суток, недель
Информативны	Высокая информативность
Возможно проведение в гематологических и биохимических лабораториях	Возможно проведение только в специализированных лабораториях

**Показанием к назначению исследования иммунологического статуса** может быть любое подозрение на неадекватную работу иммунной системы: тяжелое течение инфекционных болезней, наличие хронических или часто рецидивирующих инфекционных заболеваний, наличие очагов хронического воспаления, заболевания соединительной ткани, аутоиммунные процессы и др. Среди нарушений работы иммунной системы в первую очередь следует выделить следующие:

- Недостаточность иммунной системы или иммунодефицит – пониженная активность иммунной системы, развивающаяся в результате сниженного количества компонентов иммунной системы или их недостаточной функциональной активности.
- Гиперреактивность иммунной системы, иными словами – избыточная активность, которая может приводить к тяжелому течению вызвавшего ее заболевания.
- Аутоиммунные реакции (иммунная система атакует собственные ткани).

Оценка иммунного статуса позволяет уточнить диагноз заболевания, а также определить лечебную тактику при обнаружении отклонений в работе иммунной системы (могут быть назначены иммуностимулирующие препараты или проведена заместительная терапия с помощью введения иммунных сывороток, иммуноглобулинов, лейкоцитарной массы, препаратов интерферонов). Чтобы сделать иммунограмму (комплексное исследование состояния иммунной системы), необходимо сдать на анализ кровь из вены.

По результатам этого анализа можно судить о том, способен ли организм человека защититься от постоянно атакующих его бактерий и вирусов, достаточно ли в нем клеток и молекул, призванных поддерживать постоянство внутренней среды, а также каковы соотношения таких клеток и молекул. Для оценки иммунологической реактивности организма применяют комплекс простых и достаточно точных иммунологических реакций, позволяющих составить обобщенное представление о клеточном и гуморальном звеньях иммунитета.

### Имунодиагностические методы 1-го уровня

Имунодиагностические методы 1-го уровня включают в себя определение:

- 1) относительного и абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови (общепринятый анализ крови клинический);
- 2) относительного и абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток с использованием моноклональных антител против CD3-, CD 19- (или CD 20-, CD 72)- и CD16- CD56- маркеров соответственно;
- 3) субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-хелперов (CD3,CD4) и Т-киллеров (CD3,CD8 ) и их соотношения (CD4/CD8);
- 4) концентрации сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgM, IgG, IgA);

- 5) фагоцитарной активности лейкоцитов, выработки активных форм кислорода;
  - 6) активности комплемента;
  - 7) возможен анализ других показателей (например, цитокинов).
- Минимальный набор тестов должны выполнять все лаборатории и центры клинической иммунологии, входящие в систему иммунологической службы РФ

**Тесты второго уровня.** Эти тесты доступны лишь хорошо оснащенным, специализированным иммунологическим лабораториям.

К ним относятся:

- 1) определение субпопуляций Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител;
- 2) тест торможения миграции лейкоцитов с использованием в качестве стимулятора ФГА (фитогемагглютинина);
- 3) оценка пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов на митогены, антигены, аллогенные клетки;
- 4) оценка активности киллерных лимфоцитов (К- и ЕК-клетки);
- 5) выявление циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК);
- 6) определение различных компонентов комплемента;
- 7) оценка различных этапов фагоцитоза и рецепторного аппарата фагоцитов;
- 8) тесты по определению медиаторов иммунной системы, в том числе продукции и рецепции интерлейкинов;
- 9) анализ генов, ответственных за экспрессию иммунологически значимых молекул.

Лейкоцитарная формула включает в себя определение относительного количества (%) нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, базофилов, моноцитов. Исследование лейкоцитарной формулы имеет большое значение в диагностике гематологических, инфекционных, воспалительных заболеваний, а также оценке тяжести состояния и эффективности проводимой терапии. В то же время, изменения лейкоцитарной формулы не являются специфичными - они могут иметь сходный характер при разных заболеваниях или, напротив, могут встречаться непохожие изменения при одной и той же патологии у разных больных. Лейкоцитарная формула имеет возрастные особенности, поэтому ее сдвиги должны оцениваться с позиции возрастной нормы

#### *Метод подсчета в камере Горяева.*

Взятие и разведение крови производят пробирочным методом. В пробирку (лучше видалевскую) вносят 0,4 мл разводящей жидкости и 0,02 мл капиллярной крови. Полученное разведение практически считается равным 1 : 20. В качестве разводящей жидкости обычно употребляют 3—5%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим (уксусная кислота лизирует эритроциты, метиленовый синий окрашивает ядра лейкоцитов). Перед заполнением камеры Горяева пробирку с разведенной кровью тщательно встряхивают. Камеру заполняют так же, как для подсчета эритроцитов. Лейкоцитов гораздо меньше, чем эритроцитов (1—2 на большой квадрат), поэтому для точности подсчет производят в 100 больших квадратах (неразграфленных). Расчет: в 100 больших квадратах (1600 малых) сосчитано а лейкоцитов. Помня, что объем малого квадрата равен  $1/4000 \text{ мм}^3$ , а кровь разведена в 20 раз, рассчитывают количество лейкоцитов в 1 мкл крови:  $4000 \cdot 20$  и делят на 1600 =  $a \cdot 1/2$ . Практически для получения действительного содержания лейкоцитов в 1 мкл крови достаточно полученное при подсчете число разделить пополам и приписать 2 нуля. В среднем ошибка метода составляет  $\pm 7\%$ .

Более точным (ошибка 2—3%) и совершенным является подсчет лейкоцитов с помощью электронных аппаратов. Подсчет лейкоцитов в счетчиках частиц производят по тому же принципу, что и эритроцитов. Предварительно кровь разводят и смешивают с каким-либо лизирующим эритроциты реактивом. В автоанализаторе «Техникон» в качестве такового применяют раствор уксусной кислоты, в аппаратах «Культер» и «Целлоскоп» — сапонин или сапоглобин, которые добавляют разведенными (1 : 500, 1 : 700) в изотоническом растворе хлорида натрия (6 капель на 20 мл разведения).

### Задание для самостоятельной работы

1. Познакомится с тестами и методиками их оценки.
2. Приготовить мазки из крови, окрасить их, вывести лейкоформулу, сделать вывод.

#### Протокол исследования

Нейтрофилы палочкоядерные	Нейтрофилы сегментоядерные	Лимфоциты	Моноциты	Эозинофилы	Плазмоциты

### Контрольные вопросы

1. Для чего проводится оценка иммунного статуса?
2. Что включают в себя тесты первого уровня?
3. Что включают в себя тесты второго уровня?

### 2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).

**Тема: «Демонстрация разных видов иммунобиологических препаратов и иммуномодуляторов»**

**2.17.1 Цель работы:** дать представление о многообразии биологических препаратов.

#### 2.17.2 Задачи работы:

1. Знакомство с вакцинами и сыворотками.
2. Знакомство с иммуномодуляторами.

#### 2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе

1. Вакцины, сыворотки противобактериальные, противовирусные, диагностические, антигены, бактериофаги, иммуномодуляторы.

#### 2.17.4 Описание (ход) работы

Знакомство с демонстрируемыми биологическими препаратами. Выяснение предприятия – изготовителя, срока изготовления, номера партии, серии и т.д.

### Задание для самостоятельной работы

1. Познакомится с разными видами биологических препаратов

#### Протокол исследования

Вид биопрепарата	Цель использования

### Контрольные вопросы

1. С какой целью используются вакцинные препараты?
2. С какой целью используются лечебные сыворотки?
3. Какие бывают сыворотки?
4. Какие виды иммуномодуляторов существуют?

## 3. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

**ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)**

## 4. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

**ПО ПРОВЕДЕНИЮ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)**