

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра химии

П.Д. Новиков, А.А. Чиркин

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

Методические рекомендации

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2013*

УДК 612.017(075.8)
ББК 28.073я73+52.7я73
Н73

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 4 от 20.12.2012 г.

Авторы: профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии УО «ВГМУ», доктор медицинских наук, профессор **П.Д. Новиков**; заведующий кафедрой химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор биологических наук, профессор **А.А. Чиркин**

Рецензент:
заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «ВГМУ»,
доктор медицинских наук, профессор *И.И. Генералов*

Новиков, П.Д.
Н73 Теоретические основы иммунологии : методические рекомендации / П.Д. Новиков, А.А. Чиркин. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. – 48 с.

Издание подготовлено в соответствии с учебной программой по дисциплине «Биотехнология с основами иммунологии». Приводятся базовые понятия общей иммунологии.

Предназначается для студентов, обучающихся по специальности 1-02 04 04-01 Биология. Химия.

УДК 612.017(075.8)
ББК 28.073я73+52.7я73

© Новиков П.Д., Чиркин А.А., 2013
© ВГУ имени П.М. Машерова, 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Глава 1. Система иммунитета человека и животных: структура и функции	5
1.1. Система иммунитета	5
1.2. Лимфоидная система	6
1.3. Естественные киллеры (ЕК)	6
1.4. Система гранулоцитов	7
1.5. Система мононуклеарных фагоцитов	8
1.6. Гуморальные факторы естественного иммунитета	8
1.7. Система комплемента	8
1.8. Система тромбоцитов	9
1.9. Дендритные клетки	9
1.10. Иммунитет: определение, феномены иммунитета	9
1.11. Виды иммунитета	10
1.12. Цитокины и интерлейкины	13
Глава 2. Антигены	13
2.1. Свойства антигенов	14
2.2. Виды антигенов	15
2.3. Антигенная мимикрия	17
Глава 3. Иммуноглобулины и антитела	19
3.1. Строение иммуноглобулинов	19
3.2. Классы иммуноглобулинов	19
3.3. Возрастная динамика уровней иммуноглобулинов человека ...	21
3.4. Fc-рецепторы для иммуноглобулинов-антител	21
3.5. Антитела	22
3.6. Виды антител	23
3.7. Механизмы действия антител	24
Глава 4. Неинфекционная иммунология	26
4.1. Антигены эритроцитов	26
4.2. Аллогенные антигены лейкоцитов	27
4.3. Эндогенные (аутологичные) антигены	30
4.4. Молекулы поверхности лейкоцитов, кластеры дифференцировки	31
Глава 5. Механизмы и регуляция иммунного ответа	31
5.1. Разнообразие антител и рецепторов	31
5.2. Распознавание антигенов и кооперация клеток	33
5.3. Динамика иммунного ответа	33
5.4. Первичный и вторичный иммунный ответ	34
5.5. Иммунологическая толерантность	36
Контрольные вопросы	37
Практикум	37
Цитируемая литература	47

ВВЕДЕНИЕ

Данное издание подготовлено в соответствии с учебной программой по дисциплине «Биотехнология с основами иммунологии». В нем приводятся базовые понятия общей иммунологии.

Современная иммунология, по определению Д.К. Новикова (2005), – это наука о межклеточных и межмакромолекулярных взаимодействиях клеток системы иммунитета между собой, с другими клетками и биоактивными агентами и возникающих после этих взаимодействий нарушениях гомеостаза организма. Действительно, от клеток системы иммунитета лейкоцитов зависит резистентность организма, но с ними связаны процессы воспаления и повреждения тканей. Повышенная активность лейкоцитов сопряжена с развитием гиперчувствительности (аллергии и аутоаллергии), а сниженная приводит к недостаточной устойчивости к патогенам и иммунодефицитным состояниям.

Теоретические положения методических рекомендаций базируются на учебном пособии Д.К. Новикова «Медицинская иммунология». – Минск: Высшая школа, 2005. – 301 с. Практикум основан на учебном пособии «Иммунология : практикум : учеб. пособие» / Л.В. Ковальчук [и др.], 2010. – 176 с.

Изучение основ иммунологии является необходимым компонентом общепрофессиональной подготовки специалиста. Вместе с тем полученные знания и практические умения важны будущему учителю для профессиональной деятельности в направлении формирования принципов здорового образа жизни у школьников.

Методические рекомендации предназначены для студентов, обучающихся по специальности 1-02 04 04-01 Биология. Химия.

ГЛАВА 1. Система иммунитета человека и животных: структура и функции

Иммунология – это наука, изучающая реакции системы иммунитета организма на нарушения постоянства его внутренней среды. Центральными понятиями иммунологии являются **иммунитет, антитела, антигены и рецепторы**.

♦ **Антитела** – белковые молекулы, иммуноглобулины, которые образуются В-лимфоцитами и специфично взаимодействуют с антигенами.

♦ **Антигены** – любые вещества, чаще белки или гликопротеиды, которые попадая в организм вызывают образование антител.

♦ **Рецепторы** – молекулы на клетках, связывающие различные биологически активные вещества.

Иммунитет – функция системы иммунитета (СИ), которая представлена лейкоцитами (лимфоциты, макрофаги, гранулоциты), иммуноглобулинами и системой комплемента.

Понятие «иммунитет» часто ассоциируется с резистентностью к инфекции, бактериям, вирусам, простейшим, с «защитой» организма от них. Правда, существуют неиммунитетные способы защиты от инфекций как на социальном уровне (например, методы асептики, антисептики, уничтожение источников инфекции и другие противоэпидемические мероприятия), так и организменном (барьеры эпителия и слизистых оболочек, механизмы видовой невосприимчивости).

«Иммунитетом» нередко обозначают резистентность к инфекциям у растений и низших организмов, у которых нет такой системы иммунитета как у млекопитающих. Однако у них имеются системы неспецифической или полуспецифической, в том числе «иммунитетной», резистентности. И.И. Мечников первым описал клетки-пожиратели – фагоциты у личинок морских звезд, способные поглощать и переваривать корпускулярные чужеродные объекты, которые они могут «узнавать».

Следовательно, хотя у млекопитающих система иммунитета – наиболее сложная по строению структура, явление резистентности, в том числе к инфектам, может быть получено или без ее участия, или с помощью ее отдельных подсистем, например, фагоцитов.

1.1. Система иммунитета

Система иммунитета (СИ) – это совокупность клеток, органов и тканей, осуществляющих иммунные реакции. Она включает несколько самостоятельных подсистем, которые реагируют как единое целое:

1. *Лимфоидная система (лимфоциты)* – образует специфические факторы иммунитета (антитела и Т-клетки, специфичные к антигену).
2. *Естественные киллеры (ЕК).*
3. *Система гранулоцитов* включает нейтрофильные, базофильные (тучные клетки) и эозинофильные лейкоциты.
4. *Система мононуклеарных фагоцитов* (моноциты, макрофаги).
5. *Гуморальные факторы неспецифического естественного иммунитета.*
6. *Система комплемента.*
7. *Система тромбоцитов.*
8. *Дендритные клетки.*

Все системы, кроме лимфоидной, принимают участие в реакциях иммунитета относительно неспецифично. Физиологическая роль СИ не ограничивается созданием иммунитета, она участвует в регуляции метаболизма, в пролиферации клеток и регенерации тканей, в поддержании физиологического гомеостаза организма. Функции СИ регулируются нервной и эндокринной системами организма. С другой стороны, СИ влияет на функции этих систем. Неиммунитетные функции СИ и «иммунитетные» реакции различных систем и органов тесно взаимосвязаны и опосредуются *цитокинами*.

1.2. Лимфоидная система

Лимфоидная система представлена центральными и периферическими органами. К *центральной* относятся красный костный мозг и тимус (см. раздел Т-лимфоциты). К *периферическим* – циркулирующие лимфоциты крови, лимфатические узлы, селезенка, миндалины, лимфоидная ткань кишечника (пейеровы бляшки, солитарные фолликулы, лимфоидные образования аппендикса и др.), бронхоассоциированная лимфоидная ткань (в области бифуркации трахеи), лимфоидные образования кожи печени. Общая масса лимфоидной ткани сопоставима с массой печени и содержит 10^{13} лимфоцитов.

Лимфоциты неоднородны. Различают две их популяции: *Т-лимфоциты*, которые дифференцируются в тимусе («тимусные») и *В-лимфоциты*, созревающие в костном мозге. *Лимфопоэз* – процесс первичной дифференцировки и созревания. *Иммунопоэз* – деление лимфоцитов и последующая дифференцировка под влиянием антигенов с образованием иммунных лимфоцитов и антител.

1.3. Естественные киллеры (ЕК)

Это клетки естественного, врожденного иммунитета. Представляют собой самостоятельную, третью популяцию лимфоцитов. Возникают из костномозговых предшественников под влиянием ГМ-КСФ и ИЛ 2. Представляют собой крупные гранулярные лимфоциты (5–15% среди лимфоцитов в крови, много в печени и селезенке), имеющие почковидное ядро и азурофильные гранулы в цитоплазме. Однако они могут быть похожими на малые лимфоциты. В гранулах содержится перфорин (вызывает образование пор в клетке) и гранзимы (сериновые эстеразы, индуцирующие апоптоз в клетках-мишенях).

Рецепторы ЕК связываются с гликопротеинами и гликолипидами, узнавая олигосахаридные маннозные детерминанты, которые имеются на вирусзараженных, опухолевых и некоторых других клетках.

Для лизиса мишеней ЕК выделяют белок *перфорин* (подобен компоненту комплемента С9); связываясь с мембраной, он формирует в ней трансмембранный канал, через который в клетку-мишень впрыскиваются *гранзимы*, активирующие в ней каспазы (сериновые протеазы), а они активируют эндонуклеазы, осуществляющие фрагментацию ДНК – апоптоз. Разрушение мишеней происходит и за счет осмозиса (некроз). Весь процесс лизиса продолжается 1–2 часа.

Дефициты функций ЕК служат причиной вирусных, особенно герпетических инфекций и, возможно, развития опухолей.

1.4. Система гранулоцитов

Эта система включает нейтрофильные, базофильные и эозинофильные гранулоциты (микрофаги). Все они происходят из ГСК в костном мозгу через ряд предшественников: миелобласт – промиелоцит – миелоцит – юный – палочко-ядерный – зрелый под влиянием ГМ-КСФ. В костном мозгу имеется резерв зрелых лейкоцитов (три четверти всех), в крови около 3%, остальные находятся в тканях.

Нейтрофилы. Общее количество в организме составляет около $1,0 \times 10^{13}$, в крови – $2,5\text{--}4,5 \times 10^9/\text{л}$, 55–60% всех лейкоцитов. Увеличение в крови – *нейтрофилия* наблюдается при воспалении и инфекциях. Средний срок циркуляции нейтрофилов в крови – 9 часов, а в тканях 2–3 дня, после чего они подвергаются апоптозу. В цитоплазме имеют азурофильные и специфические гранулы. Азурофильные гранулы содержат β -глюкуронидазу, катепсины, кислые гидролазы, кислые и нейтральные протеазы, эластазу, миелопероксидазу. В специфических гранулах находятся коллагеназа, лизоцим, белок, связывающий витамин B_{12} .

Основной функцией нейтрофилов является фагоцитоз чужеродных объектов (бактерий, клеток), после чего они превращаются в «гноеродные тельца» – составную часть гноя. При фагоцитозе происходит усиление обмена веществ по пентозофосфатному пути с активацией дыхания – «*респираторного взрыва*». Из гранул нейтрофилов высвобождаются НАДФ-оксидаза и цитохром *b*, которые участвуют в образовании супероксидного анион-радикала (O_2^-), гидроксильного радикала (OH), пероксида водорода, синглетного кислорода, NO, гипохлорита (HClO), оказывающих бактерицидное и мембранолитическое действие. Важные факторы бактерицидности – катепсины, лизоцим и катионные пептиды – *дефензины* вызывают образование ионных каналов в клеточной стенке стафилококков, кишечной палочки, криптококков. Лактоферрин связывает железо, делая его недоступным для бактерий.

Выделяя ферменты и мембранолитические вещества, нейтрофилы разрушают окружающие клетки и формируют гнойный очаг распада, который в результате воспаления отграничивается от окружающих тканей.

Базофилы (0,5–1% в крови) участвуют в аллергических реакциях. На поверхности базофилов имеется от 6000 до 60000 высокоаффинных $\text{Fc}\epsilon$ -рецепторов, связывающих IgE. В гранулах базофилов содержится большое количество медиаторов аллергии (гистамин, серотонин, фактор активации тромбоцитов, простагландины, лейкотриены, факторы хемотаксиса, гепарин). Эти медиаторы выделяются при дегрануляции базофилов, которая возникает после взаимодействия связанного базофилом антитела класса IgE с соответствующим аллергеном. Базофилы могут выделять ИЛ-3, 4, 5, 6 и другие.

Тучные клетки находятся в соединительной ткани и слизистых оболочках (на $1 \text{ г } 10^4\text{--}10^6$ клеток) и имеют много общих свойств с базофилами. В них содержатся гранулы, богатые медиаторами аллергии. Они имеют до 100000 рецепторов для IgE и являются эффекторными клетками аллергических реакций. Тучные клетки I типа кожи и слизистых оболочек содержат химазу, хондриотинсульфат, а II типа в слизистых оболочках альвеол, бронхов, кишечника – триптазу, гепарин.

Эозинофилы играют большую роль в противопаразитарном иммунитете и аллергии. В норме в крови их 0,5–3% и они созревают под действием ИЛ-5.

При аллергии и паразитарных инвазиях количество эозинофилов в крови увеличивается до 10–20% – *эозинофилия*. В их гранулах содержатся основной белок – цитотоксин и нейротоксин, повреждающий паразитов и собственные клетки организма.

1.5. Система мононуклеарных фагоцитов

В систему мононуклеарных фагоцитов объединяют моноциты крови и различные макрофаги (купферовские клетки печени – звездчатые ретикулоэндотелиоциты, альвеолярные макрофаги, макрофаги соединительной ткани, астроциты глии, остеокласты). Все они возникают из гемопоэтической стволовой клетки и проходят ряд стадий: монобласт-промоноцит-моноцит-макрофаг. Созревают под влиянием четырех гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ), выделяемых Т-лимфоцитами, фибробластами и макрофагами. В зависимости от последующей локализации макрофаги приобретают специфические структурные и морфологические черты.

Функции макрофагов:

- фагоцитоз;
- распознавание и представление (презентация) антигенов;
- секреция медиаторов системы иммунитета.

1.6. Гуморальные факторы естественного иммунитета

В естественном иммунитете против микроорганизмов активно участвуют белки острой (ранней) фазы воспаления: С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид, альфа₂-макроглобулин, фибриноген, β-лизины, интерфероны, система комплемента, лизоцим и др.

1.7. Система комплемента

Комплементом (complement – дополнять) называют сложную систему белков (более 30) сыворотки крови, многие из которых являются проферментами. Основные компоненты системы комплемента обозначаются буквой С с соответствующим номером (С1, С2, С3 и т.д.). Они образуются в печени и секретируются макрофагами. Активация системы комплемента протекает *классическим, лектиновым и альтернативным* путями в виде каскадной цепной реакции, управляемой семью регуляторными белками. При этом каждый предыдущий компонент каскада активирует последующий за счет ферментативного расщепления. Агрегат С5bС6-С9 получил название *мембраноатакующего комплекса* (МАК). В механизме его литического действия много общего с действием перфорина. МАК встраивается в мембрану клетки-мишени за счет гидрофобных взаимодействий, образуя трансмембранный канал диаметром 10 нм. Через него в клетку поступают ионы натрия и вода, а выходят ионы калия, что приводит к набуханию клетки и лизису.

При заболеваниях, сопровождающихся образованием иммунных комплексов (аутоиммунные болезни, инфекции), уровень белков комплемента снижается – *гипокомplementемия*. Комплемент стимулирует фагоцитоз и *расщепление иммунных комплексов*.

При недостаточности комплемента развиваются иммунодефициты.

1.8. Система тромбоцитов

Тромбоциты (норма в крови – $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$) участвуют в иммунных и аллергических реакциях. Возникают из мегакариоцитов, пролиферацию которых усиливает ИЛ-11.

Под влиянием иммунных комплексов и факторов активированного компонента, а также тромбоцитарного фактора (ТАФ) происходит агрегация тромбоцитов и выделение из них медиаторов. В их гранулах содержатся: гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены, ТАФ, лизоцим, β -лизины, лизосомальные ферменты, факторы, стимулирующие фагоцитоз и хемотаксис лейкоцитов, а также активирующие кининовую и свертывающую систему крови и др. Из α -гранул выделяется β -тромбоглобулин, тромбоцитарный фактор роста гладкомышечных клеток, ингибитор активатора плазминогена. Для тромбоцитов характерны следующие свойства: адгезия (Р-селектин, CD62P) к поврежденному эндотелию и другим клеткам, агглютинация, агрегация, секреция медиаторов и факторов, а также вязкий метаморфоз, т.е. превращение в аморфную массу.

Помимо участия в свертывании крови и воспалении, медиаторы и факторы тромбоцитов модифицируют иммунные реакции. Тромбоциты могут фагоцитировать и убивать бактерии, вирусы.

1.9. Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) – гетерогенная популяция подвижных клеток с характерной звездчатой формой, многочисленными выростами и ворсинками; присутствуют во всех тканях в незрелом виде и отличаются по свойствам, экспрессии рецепторов.

В коже ДК – белые отростчатые эпидермоциты (клетки Лангерганса) находятся в исчерченном сквамозном слое эпидермиса, высокочувствительны к ультрафиолетовым лучам.

Дендритные клетки слизистых оболочек сходны по свойствам с клетками Лангерганса, но могут, в отличие от них, сразу представлять антигены Т-лимфоцитам.

Особая субпопуляция дендритных клеток (потомки фибробластов) находится в фолликулах лимфоузлов (*интрафолликулярные*). Они связывают и длительно сохраняют антиген, поддерживают иммунологическую память, стимулируют созревание В-лимфоцитов.

1.10. Иммуитет: определение, феномены иммуитета

Иммуитет – это эволюционно обусловленная совокупность реакций взаимодействия между системой иммуитета и биологически активными агентами (антигенами). Эти реакции направлены на сохранение фенотипического постоянства внутренней среды (гомеостаза) организма и результатом их могут быть различные феномены и реакции иммуитета. Одни из них являются полезными, защитными, другие обуславливают патологию.

К первым относятся:

Противоинфекционный иммуитет – приобретенная специфическая невосприимчивость организма к конкретным инфекционным агентам возбудителям заболеваний (микробам, вирусам).

Толерантность – терпимость, неответчаемость системы иммунитета на собственные биологически активные вещества.

Другие реакции иммунитета, патологического, «стрессового уровня» приводят к развитию заболеваний:

Гиперчувствительность – повышенная иммунная («иммунитетная») реакция на антигены-аллергены, служит причиной двух видов заболеваний: аллергических – на экзогенные аллергены (*аллергия*); аутоаллергических (аутоиммунных) – на эндогенные, собственные биомолекулы (*аутоаллергия*). При аутоаллергических (аутоиммунных) болезнях «свои» молекулы узнаются системой иммунитета как «чужие» и на них развиваются реакции. Система иммунитета в норме не отвечает на «свое» и отторгает «чужое».

Анергия, т.е. отсутствие реакции на инфекционные агенты (вариант толерантности) может быть причиной инфекций, обусловлена недостаточностью противоинфекционного иммунитета.

Основой реализации всех реакций иммунитета является **иммунологическая память**. Суть ее в том, что клетки системы иммунитета «помнят» о тех чужеродных веществах, с которыми они встречались и на которые реагировали. Иммунологическая память лежит в основе феноменов противоинфекционного иммунитета, толерантности и гиперчувствительности.

На «физиологическом уровне» система иммунитета «работает» постоянно, формируя новые клетки, иммуноглобулины и цитокины; ее фоновое функционирование поддерживается стимуляцией постоянно персистирующими на коже и слизистых оболочках микроорганизмами (вирусами, бактериями, грибами). Нормальное взаимодействие с ними, постоянная их элиминация, предупреждение их генерализации, «надзор» за ними – залог здорового организма и показатель нормальной *элиминирующей* функции СИ.

1.11. Виды иммунитета

Существуют механизмы «неиммунитетной», **естественной неспецифической резистентности организма**. К ним относятся защита организма от внешних агентов: наружными покровами (кожа, слизистые оболочки), механическими (слущивание эпителия, движение ресничек и секретов, слизистых оболочек, чихание, кашель), физическими механизмами (барьеры), химическими веществами (бактерицидное действие соляной, молочной, жирных кислот, ряда ферментов, особенно лизоцима - мурамидазы).

Видовая невосприимчивость (конституциональный, наследственный иммунитет) – это вариант неспецифической резистентности организма, генетически обусловленный особенностями обмена веществ данного вида. Он в основном связан с отсутствием условий, необходимых для размножения возбудителя. Например, животные не болеют некоторыми болезнями человека (сифилис, гонорея, дизентерия), и, наоборот, люди невосприимчивы к возбудителю чумы собак. Данный вариант резистентности не является истинным иммунитетом, так как он не осуществляется системой иммунитета.

От неспецифической, «неиммунитетной» резистентности, следует отличать *неспецифические факторы иммунитета* или *естественный врожденный иммунитет* (innate natural immunity). Они включают клетки и гуморальные факторы.

Среди гуморальных факторов важными являются естественные, предсуществующие антитела. Такие антитела исходно имеются в организме в небольшом количестве против многих бактерий и вирусов.

Неспецифическими факторами иммунитета служат система комплемента, С-реактивный белок, фермент лизоцим, интерфероны, цитокины и др. Клеточные факторы – это фагоциты (моноциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты), которые проявляют свою активность во всех тканях, полостях, могут выходить на поверхность слизистых оболочек и там выполнять защитную функцию.

Характеристики **врожденного иммунитета**:

- существует с рождения, генетически предопределен;
- антигеннеспецифичен, но может быть избирательным – только к определенным патогенам;
- не усиливается при повторном контакте с патогеном;
- служит триггером для индукции приобретенного иммунитета.

Противоинфекционный приобретенный иммунитет (acquired immunity) – совокупность реакций системы иммунитета, направленных на удаление инфекционного агента – возбудителя заболевания. По Р.В. Петрову – это способ защиты от живых тел и веществ, несущих чужеродную генетическую информацию.

Этот иммунитет зависит от специфических факторов иммунитета, которыми служат антитела – продукты В-лимфоцитов и Т-лимфоциты, имеющие специфический рецептор к антигену (ТКР – TCR).

В зависимости от вида инфекционного агента различают следующие виды противоинфекционного иммунитета:

1. **Антибактериальный**, который может быть стерильным и нестерильным. При стерильном – микроорганизмы из организма удаляются, а иммунитет сохраняется. При нестерильном – для поддержания иммунитета необходимо присутствие в организме небольшого количества микроорганизмов или их антигенов.
2. **Антитоксический** – против продуктов жизнедеятельности бактерий – токсинов.
3. **Противовирусный** – против вирусов или их антигенов.
4. **Противогрибковый** – против патогенных грибов.
5. **Противопаразитарный** – против патогенных простейших и гельминтов.

Противоинфекционный приобретенный иммунитет возникает в течение жизни в результате стимуляции клеток СИ антигенами микроорганизмов или получения готовых иммунных факторов. Поэтому он бывает *естественным* и *искусственным*, каждый из которых может быть *активным* и *пассивным*.

Естественный активный иммунитет появляется в результате контакта с возбудителем (после перенесенного заболевания или после скрытого контакта без проявления симптомов болезни).

Естественный пассивный иммунитет возникает в результате передачи от матери к плоду через плаценту (трансплацентарный) или с молоком готовых защитных факторов – лимфоцитов, антител, цитокинов и т.п.

Искусственный активный иммунитет индуцируется после введения в организм вакцин, содержащих микроорганизмы или их субстанции – антигены.

Искусственный пассивный иммунитет создается после введения в организм готовых антител или иммунных клеток. Такие антитела содержатся в сыворотке крови иммунизированных доноров или животных.

Характеристики **приобретенного иммунитета**:

- специфичен к определенному патогену (бактерии, вирусу);
- специфичность зависит от наличия иммунных Т- и В-клеток памяти, несущих специфические рецепторы и/или от присутствующих антител;
- усиливается при повторных контактах с патогеном;
- может сопровождаться гиперчувствительностью (аллергией) к патогену;
- возникает после контакта СИ с патогеном, сопровождаясь (или нет) клиническими симптомами заболевания; может индуцироваться соответствующими вакцинами.

Иммунитет всегда конкретен, специфичен и направлен против определенного возбудителя заболевания, вируса, бактерии. Поэтому к одному возбудителю, например, вирусу кори, иммунитет есть, а к другому (вирусу гриппа) его нет. Эта конкретность и специфичность определяется антителами и рецепторами иммунных Т-клеток против соответствующих антигенов.

Понятие «*специфичность иммунитета*» является одним из центральных в иммунологии. Наиболее специфичными к антигену являются антитела и рецепторы лимфоцитов после многократных иммунизаций, т.е. контактов с ним. Высокая специфичность характеризуется высокой степенью сродства – *комплементарностью (аффинностью)* и сильным связыванием (*авидностью*), молекул и рецепторов.

Приобретенный (адаптивный) иммунитет возникает после иммунного ответа на инфекцию (бактерию, вирус), после которого остается иммунологическая память.

Неинфекционный иммунитет – совокупность реакций системы иммунитета, направленных на неинфекционные биологически активные агенты – антигены. В зависимости от природы этих антигенов он подразделяется на следующие виды:

1. *Аутоаллергия («аутоиммунитет»)* – реакции системы иммунитета на собственные антигены (белки, липопротеиды, гликопротеиды). Она обусловлена нарушением распознавания «своих» молекул, когда они воспринимаются системой иммунитета как «чужие» и разрушаются.
2. *Трансплантационный иммунитет* возникает при пересадке органов и тканей от донора к реципиенту, в случаях переливания крови и иммунизации лейкоцитами. Эти реакции связаны с наличием индивидуальных наборов молекул на поверхности лейкоцитов – человеческих лейкоцитарных антигенов – HLA. Набор этих молекул идентичен только у однояйцевых близнецов.
3. *Противоопухолевый иммунитет* – направлен против антигенов опухолевых клеток.
4. *Репродуктивный иммунитет* в системе «мать-плод». Это реакции матери на антигены плода, так как он отличается по ним за счет генов, полученных от отца.
5. *Антитоксический* – против ядов животных, змей, насекомых и др.

1.12. Цитокины и интерлейкины

Дифференцировка и взаимодействие клеток системы иммунитета между собой, а также с клетками других систем организма, осуществляется с помощью регуляторных молекул – цитокинов.

Цитокины – это секретируемые активированными клетками СИ, иногда эпителием, фибробластами и другими клетками, низкомолекулярные гликопротеины и пептиды, осуществляющие регуляцию взаимодействий и активацию всех звеньев самой СИ и влияющие на различные органы и ткани.

Регуляторные функции цитокинов обусловлены тем, что после взаимодействия их с рецепторами клеток, возникает сигнал, который через внутриклеточную систему ферментов и медиаторов передается в ядро, где активируются соответствующие гены. Продукты этих генов осуществляют регуляцию СИ.

Цитокины, выделяемые преимущественно клетками системы иммунитета, получили название *интерлейкинов* (ИЛ) – факторов межлейкоцитарного взаимодействия. Они нумеруются: ИЛ-1 – ИЛ-25, а некоторые обозначаются буквами. Все они являются гликопротеидами с молекулярной массой (ММ) от 15 до 60 кДа. Выделяются лейкоцитами при стимуляции продуктами микробов и другими антигенами.

ГЛАВА 2. Антигены

Антигены (АГ) – это любые простые или сложные вещества, которые при попадании внутрь организма тем или иным путем вызывают иммунную реакцию и способны специфично взаимодействовать с продуктами этой реакции: антителами и иммунными Т-клетками.

Основные определения:

Иммунизация – введение антигенов в организм с целью создания иммунитета или получения антител.

Антигенность – способность молекул антигена вызывать реакцию системы иммунитета у данного организма. Она зависит от *чужеродности* для него молекул этого вещества, а чужеродность, в свою очередь, от степени генетических различий между организмом-продуцентом молекул антигена и иммунизируемым организмом. Поэтому различают:

- *ксеногенные* (гетерологичные) антигены – биомолекулы животных при введении человеку (межвидовые различия), наиболее сильные антигены;
- *аллогенные* антигены или *изоантигены*, внутривидовые, отличающие людей (и животных) друг от друга;
- *аутоантигены* – собственные молекулы организма, на которые из-за нарушения ауто толерантности развивается иммунная реакция.
- *особые: толерогены* – вещества-антигены, индуцирующие в организме не иммунный ответ, а неответаемость – *толерантность*. Это особый вид специально изготовленных антигенов (деагрегированных мономеров с одним эпитопом). Антигены, вводимые в организм в очень больших или очень низких дозах, тоже могут вызвать толерантность.

2.1. Свойства антигенов

Основными свойствами антигенов являются *иммуногенность* и *специфичность*. Под *иммуногенностью* понимают способность антигена индуцировать в организме иммунную реакцию. *Специфичность* определяется взаимодействием антигена только с комплементарными ему антителами или рецепторами Т-лимфоцитов определенного клона.

Полноценными антигенами являются природные или синтетические биополимеры, чаще всего белки и их комплексные соединения (гликопротеиды, липопротеиды, нуклеопротеиды). Они имеют молекулярную массу обычно более 10 kDa (минимально – м.м. 0,45 kDa), обладают достаточно жесткой структурой. Полноценные антигены обычно поливалентны – на 1 молекуле высокомолекулярного АГ может быть 10–20 и более эпитопов.

Белки более иммуногенны. Например, свиной гормон поджелудочной железы – инсулин имеет молекулярную массу 5,8 kDa и является антигеном для человека, в то время как декстран с молекулярной массой 100 kDa – слабый антиген. Слабыми антигенами являются также коллаген, желатин, протамины и т.д. Это связано с тем, что во многом антигенность обуславливается наличием в молекуле радикалов аминокислот, имеющих вид разветвленных цепей, обладающих заряженными функциональными группами, содержащих ароматические структуры. Чем более сложную пространственную структуру имеет биомолекула, тем выше ее антигенные свойства.

Степень иммуногенности антигена зависит от генотипа организма: одни организмы на данный антиген вырабатывают много антител (сильный ответ), другие – мало (слабый ответ). Это показано на разных гибридных линиях мышей и важно для человека при вакцинации, так как от степени иммунного ответа на вакцину зависит иммунитет к возбудителю.

Участок молекулы антигена, взаимодействующий с одним активным центром АТ или Т-клеточного рецептора, получил название *антигенной детерминанты* или *эпитопа*. Размер детерминанты – 2–3 нм³, что составляет 7–15 остатков аминокислот (м.м. 0,6–1,0 kDa). Взаимодействие эпитопа антигена и активного центра антитела определяет феномен *специфичности* иммунной реакции. Эпитопами могут быть как линейные участки молекулы белка, образующие конформационную α -спираль, так и ее ответвления (секвенциальные детерминанты). Размеры конформационных эпитопов в миоглобине составляют 6–8 аминокислот, и этот тип эпитопов широко представлен в различных молекулах.

Гаптены – низкомолекулярные вещества, которые в обычных условиях не вызывают иммунную реакцию. Однако при связывании с высокомолекулярными молекулами-«носителями» они приобретают иммуногенность. К гаптенам относятся лекарственные препараты и большинство химических веществ. Они способны запускать иммунный ответ после связывания с белками организма, например с альбумином, а также с белками на поверхности клеток (эритроцитов, лейкоцитов). В результате образуются антитела, способные взаимодействовать с гаптеном. При повторном попадании гаптена в организм возникает вторичный иммунный ответ, нередко в виде повышенной аллергической реакции.

Адьюванты (adjuvantis – вспомогательный) усиливают иммунный ответ при введении с ними антигенов. Обычно антиген сорбируется на адьюванте.

В месте введения антигена адъюванты создают депо, из которого антиген медленно поступает в организм, обеспечивая длительную антигенную стимуляцию. Адъюванты стимулируют фагоцитоз, обладают митогенным действием на лимфоциты. В качестве адъювантов используют гидроксид или фосфат алюминия, масляную эмульсию, адъювант Фрейнда – сложную смесь, состоящую из минерального масла, эмульгатора и убитых микобактерий туберкулеза.

Аллергены – антигены или гаптены, которые при повторном попадании в организм вызывают аллергическую реакцию. Поэтому все антигены и гаптены могут быть аллергенами.

Иммунный ответ на одни антигены (белки и др.) зависит от активного участия Т-лимфоцитов, это *тимусзависимые антигены*. Другие – *тимуснезависимые антигены* (высокополимерные полисахариды, липополисахариды, агрегированные или связанные с частицами белка) запускают иммунный ответ и синтез антител В-клетками без Т-лимфоцитов.

Кроме того, даже одни и те же антигены в одних условиях вызывают защиту от инфекции – иммунитет, в других – толерантность, неответаемость, в третьих – гиперчувствительность (аллергию).

2.2. Виды антигенов

Существует два вида антигенов (АГ): *экзогенные* и *эндогенные* (аутологичные). Экзогенные антигены попадают в организм из внешней среды. Среди них различают *инфекционные* и *неинфекционные* АГ.

Инфекционные АГ – это антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших. Все они могут служить аллергенами, так как вызывают аллергические реакции.

Известны следующие разновидности бактериальных антигенов:

- *группоспецифические* (встречаются у разных видов одного рода или семейства);
- *видоспецифические* (у различных представителей одного вида);
- *типоспецифические* (определяют серологические варианты – серовары, антигеновары внутри одного вида).

В зависимости от локализации в бактериальной клетке различают К-, Н- и О-антигены (обозначают буквами латинского алфавита).

К-АГ (м.м. около 100 кД) – это гетерогенная группа наиболее поверхностных, капсульных АГ бактерий. Характеризуют групповую и типовую принадлежность бактерий. Они находятся в капсуле и связаны липидным фрагментом с поверхностным слоем липополисахарида клеточной стенки. Содержат главным образом кислые полисахариды, в состав которых входят галактуриновая, глюкуроновая и идуроновая кислоты. Встречаются вариации в строении этих антигенов внутри вида, на основании чего, например, различают 75 типов (серотипов) пневмококков, 80 типов клебсиелл и т.д. Капсульные антигены используются для приготовления вакцин менингококков, пневмококков, клебсиелл. Однако введение высоких доз полисахаридных антигенов может вызывать толерантность. У кишечной палочки К-АГ подразделяются на фракции А, В, L. Наиболее термостабильна А-фракция, выдерживающая кипячение более 2 часов. В- и L-фракции термолабильны и разрушаются при кипячении. Разновидностью К-АГ является поверхностный Vi-АГ. Он встречается у живых сальмонелл брюшного тифа и некоторых других энтеробактерий. Ранее его считали фактором,

обуславливающим вирулентность (Vi) микроба. Однако в большей степени Vi-Аг ответственен за персистенцию возбудителя у бактерионосителей.

О-АГ – полисахарид, входит в состав клеточной стенки бактерий, являясь частью *липополисахарида* (ЛПС). Этого антигена много у грамотрицательных бактерий. О-АГ определяет антигенную специфичность ЛПС и по нему различают много серовариантов бактерий одного вида. Например, для каждой группы сальмонелл характерно наличие определенного О-АГ (полисахарида): у группы А это фактор 2, у группы В – фактор 4 и т.д. У R-форм бактерий О-АГ теряет боковые цепи полисахарида и типоспецифичность. Чистый О-АГ слабо иммуногенен. Он термостабилен (выдерживает кипячение в течение 1–2 часов), химически устойчив (выдерживает обработку формалином и этанолом).

Эпитопы О-АГ представлены гексозами (галактоза, рамноза и др.) и аминасахарами (N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин). У грамположительных бактерий в состав О-АГ входят также глицеринтейхоевая и рибитолтейхоевая кислоты.

Строение ЛПС сложное. Центральная часть ЛПС (ядро) – олигосахаридный «кор», состоящий из остатков 2-кето-3-дезоксиктоната, галактозы, глюкозы, гептозы и N-ацетилглюкозамина. С одной стороны, к этому ядру присоединен *липид А*, а с другой – О-специфические полисахаридные цепочки из 3–4 сахаров, которые являются наиболее иммуногенными в ЛПС и определяют его специфичность.

Липид А – это гетеродимер, содержит глюкозамин и жирные кислоты, обладает сильной адьювантной, неспецифической иммуностимулирующей активностью и токсичностью; не иммуногенен, т.к. экранирован полисахаридом. Однако антитела к нему могут возникать. Липид А обеспечивает митогенную активность ЛПС для В-лимфоцитов.

В целом ЛПС является *эндотоксином*. Уже в небольших дозах он вызывает лихорадку из-за активации макрофагов и выделения ими ИЛ-1, ФНО α и других цитокинов, поликлональную тимуснезависимую активацию В-лимфоцитов и синтез антител, дегрануляцию гранулоцитов, агрегацию тромбоцитов. Он может связываться с любыми клетками организма, но особенно с макрофагами. В больших дозах угнетает фагоцитоз, вызывает токсикоз, нарушение функции сердечно-сосудистой системы, тромбозы, эндотоксический шок. ЛПС некоторых бактерий входит в состав иммуностимуляторов (продигиозан, пирогенал).

Тейхоевые и липотейхоевые кислоты относятся к О-АГ. Они присоединены одним концом к глубинному слою пептидогликана, являются высокомолекулярными полисахаридами и Т-независимыми антигенами.

Пептидогликан (муреин, мукопептид) содержит N-ацетилглюкозамин и муравовую (ацетилмуравовую) кислоту, к которым через амидную часть присоединен тетрапептид. Его второй и четвертый аминокислотные остатки постоянны – это D-глутаминовая кислота и D(L)-аланин. Пептидогликаны клеточной стенки бактерий, особенно полученные из них фракции мурамилпептидов обладают сильным адьювантным эффектом на клетки СИ, неспецифически усиливая ответ на различные антигены. Они активируют макрофаги через серотониновые рецепторы.

Н-АГ входит в состав бактериальных жгутиков, термостабилен, основа его – белок флагеллин.

Антигенами бактерий являются также их экзотоксины, рибосомы и ферменты.

Антигены грибов. У грибов имеются полисахариды клеточной стенки (маннаны и маннанопротеины), цитоплазматические и ядерные белки, многочисленные ферменты (енолаза, альдолаза, протеиназы, белки теплового шока 70 kDa, 90 kDa). Выявлено более 80 антигенов, они обладают общими детерминантами, из-за чего перекрестно реагируют с антителами. Для иммунологических тестов используют экстракты цельных клеток, очищенный маннан или цитоплазматические белки. Антигены (аллергены) вызывают немедленные (антитела IgM, IgG, IgA, IgE классов) и замедленные (Т-клеточные) реакции и сенсибилизацию без клинических проявлений. Антитела к грибковым антигенам выявляются у многих здоровых лиц (к *Candida albicans* до 30%). В крови больных сепсисом и слизисто-кожным кандидозом находят антигены кандид.

Антигены грибов обладают иммуностимулирующим, аллергическим и иммунодепрессивным действием.

Антигены вирусов. У большинства вирусов имеются суперкапсидные – поверхностные оболочечные, белковые и гликопротеидные АГ (например, гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа), капсидные – оболочечные и нуклеопротеидные (сердцевинные) АГ. Определение вирусных антигенов в крови и других биологических жидкостях широко используется для диагностики вирусных инфекций. Наиболее иммуногенные, протективные пептиды вирусов используются для создания синтетических вакцин. По строению они вариабельны даже у одного вида вирусов.

Антигены паразитов. Гельминты и другие паразиты сложны по строению и содержат большое количество полисахаридных и белковых антигенов. Антигенная мозаика специфична для каждого вида паразитов. Стимулируя иммунные реакции, они часто вызывают аллергию.

Протективные антигены. Это совокупность антигенных детерминант (эпитопов), которые вызывают наиболее сильный иммунный ответ, что предохраняет организм от повторной инфекции данным возбудителем.

Пути проникновения инфекционных агентов и их антигенов в организм разнообразны: через поврежденную и иногда неповрежденную кожу; через слизистые оболочки носа, рта, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей. Пути распространения инфектов и их антигенов – через кровь, лимфу, а также по поверхности слизистых оболочек.

2.3. Антигенная мимикрия

У микробов различных видов и у человека встречаются общие, сходные по строению АГ. Это явление называется *антигенной мимикрией*. Часто гетероантигены отражают филогенетическую общность данных представителей, иногда являются результатом случайного сходства конформации и зарядов молекул АГ. Например, АГ Форсмана содержится в эритроцитах барана, сальмонеллах и у морских свинок. Гемолитические стрептококки группы А содержат перекрестно реагирующие АГ (в частности, М-протеин), общие с АГ эндокарда и клубочков почек человека. Такие бактериальные антигены вызывают образование антител, перекрестно реагирующих с клетками человека, что приводит к развитию ревма-

тизма и постстрептококкового гломерулонефрита. У возбудителя сифилиса есть фосфолипиды, сходные по строению с теми, которые имеются в сердце животных и человека. Кардиолипиновый антиген сердца животных используется для выявления антител к спирохете у больных людей (реакция Вассермана).

Суперантигены – особая группа антигенов, которые в дозах значительно меньших, чем митогены, вызывают неспецифическую поликлональную активацию и пролиферацию большого числа Т-лимфоцитов (до 20%, обычные антигены – 0,01%). Эти антигены так же, как и обычные, распознаются Т-хелперами в ассоциации с антигенами гистосовместимости II класса или Т-супрессорами с молекулами I класса. Однако они высокотропны к β -цепям некоторых типов Т-клеточных рецепторов и стимулируют все Т-клетки, несущие их, независимо от антигенной специфичности. При этом вырабатывается много ИЛ-2 и других цитокинов, вызывающих воспаление и повреждение тканей. Суперантигенами являются бактериальные энтеротоксины, стафилококковые, холерные токсины и другие бактериальные антигены, некоторые вирусы (ротавирусы). После активации наступает апоптоз – гибель Т-лимфоцитов и возникает их дефицит.

В-клеточные суперантигены связываются с Fab-фрагментами различных иммуноглобулинов (VL и VH цепями), могут активировать В-лимфоциты. Белок А стафилококков, наряду со взаимодействием с Fc-фрагментами IgG, связывается с 15-50% IgM, IgA, IgG и IgE через Fab фрагмент. Белок L пептострептококка связывается с VL порцией иммуноглобулинов.

Митогены – вещества, стимулирующие пролиферацию лимфоцитов. Фитогемагглютинин, конконавалин А стимулируют деление преимущественно Т-лимфоцитов, а ЛПС – В-лимфоцитов.

К **неинфекционным антигенам** относятся АГ растений, лекарственные препараты, химические, природные и синтетические вещества, антигены клеток животных и человека.

Антигены растений часто вызывают у чувствительных к ним людей аллергические реакции, т.е. являются аллергенами. Пыльца растений – причина поллинозов (пыльцевой аллергии). Пищевые продукты растительного происхождения индуцируют пищевую аллергию.

Практически все *химические* вещества, особенно ксенобиотики (синтетические вещества не встречающиеся в природе) и лекарства – это гаптены, которые индуцируют аллергию у длительно контактировавших с ними людей.

Среди антигенов тканей и клеток животных и человека различают *стромальные* антигены, поверхностные клеточные – *мембранные* АГ, *цитоплазматические* (микросомальные, микротубулярные), *митохондриальные*, *ядерные* (нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты).

Антигены животных по отношению к человеку являются *ксеногенными* антигенами. Поэтому при введении, например, белков сыворотки животных (лошадиной противодифтерийной и др.) всегда возникает иммунная реакция, которая будет аллергической при повторном их поступлении. Шерсть и перхоть животных (кошек, собак) являются сильными аллергенами для человека.

ГЛАВА 3. Иммуноглобулины и антитела

Иммуноглобулины (антитела) – это большое семейство белков, которые синтезируются В-лимфоцитами и плазматическими клетками. Иммуноглобулины находятся в крови и при электрофорезе сыворотки крови образуют фракцию γ -глобулинов. Часть особых иммуноглобулинов - секреторных – присутствует во всех секретах, продуцируемых слизистыми оболочками (слезная жидкость, слизь носа, бронхов, кишечника, половых органов). Свободные иммуноглобулины-антитела могут связываться лейкоцитами и другими клетками специальными Fc-рецепторами.

3.1. Строение иммуноглобулинов

В структуре иммуноглобулиновой молекулы различают 2 тяжелые (H – heavy) и 2 легкие (L – light) полипептидные цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Существуют 2 вида L-цепей (κ -каппа и λ -лямбда) и 5 разновидностей H-цепей – гамма (γ), мю (μ), альфа (α), эпсилон (ϵ) и дельта (δ). Тяжелые цепи определяют принадлежность иммуноглобулинов к соответствующему классу: IgG – тяжелая цепь γ , IgA – α , IgM – μ , IgD – δ , IgE – ϵ .

В цепях молекулы иммуноглобулинов различают константные (constant) и переменные (variable) фрагменты. Отдельные замкнутые в виде сфер участки цепей иммуноглобулина получили название *доменов*. Различают CL, CH1, CH2 и CH3 домены, а в IgM и IgE и CH4 домены, в V-фрагменте – VH и VL домены (в зависимости от цепи). Гипервариабельные участки (часты замены аминокислот) доменов тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов (регионы, определяющие комплементарность – CDR) формируют *активный центр* молекулы иммуноглобулина (антитела). Это полость длиной 6 нм, шириной 1–1,7 нм, глубиной 0,6–0,7 нм, в которую вмещается детерминанта (*эпитоп*) антигена. Структуры активного центра Ig, которые непосредственно соединяется с эпитопом антигена называют *паратоп*. Их соединение обеспечивается адгезией структур на основе физико-химических взаимодействий.

Между CH1 и CH2 доменами тяжелой цепи локализуется подвижный – «шарнирный» участок молекулы иммуноглобулина, чувствительный к протеолитическим ферментам (папаину, пепсину, трипсину). Под действием папаина молекула иммуноглобулина расщепляется на 2 Fab-фрагмента (Fragment antigen binding – фрагмент, связывающий антиген) и Fc-фрагмент (Fragment crystallizable – фрагмент кристаллизующийся).

Когда молекула Ig связывает антиген, CH2 домен Fc-фрагмента иммуноглобулина активирует комплемент по классическому пути, а CH3 домен может связываться с Fc-рецепторами, имеющимися на лейкоцитах и других клетках.

3.2. Классы иммуноглобулинов

Иммуноглобулины класса G (м.м. 150 кДа) составляют основную массу иммуноглобулинов сыворотки крови (75–85%) – 10 г/л (8–12 г/л). Они неоднородны по строению Fc-фрагмента, среди них различают четыре субкласса: G1, G2, G3, G4, процентное соотношение которых – 60:20:15:5.

Снижение концентрации IgG обозначается как *гипогаммаглобулинемия* IgG, увеличение – *гипергаммаглобулинемия* IgG. Антитела класса IgG появляются в большом количестве при вторичном иммунном ответе, поэтому основную массу антител против бактерий, их токсинов и вирусов составляют IgG. При образовании комплекса с антигеном IgG активирует комплемент по классическому пути. IgG является единственным иммуноглобулином, проникающим через плаценту в организм плода. Будучи антителом, он защищает новорожденных и детей раннего возраста от инфекций и составляет основную массу иммуноглобулинов в крови. Поэтому препараты IgG (в чистом виде) применяются с заместительной целью при дефиците этих иммуноглобулинов и в случае тяжелых инфекций.

С другой стороны, они используются для лечения аллергических и аутоиммунных заболеваний, так как подавляют иммунный ответ. Следовательно, эти иммуноглобулины выполняют регуляторную роль, создавая условия для нормального иммунного ответа.

Иммуноглобулины класса М (м.м. 950 кДа) содержатся в сыворотке крови в концентрации от 0,8 до 1,5 г/л, в среднем – 1 г/л. В крови они находятся в виде пентамеров, состоящих из 5-ти мономеров, соединенных J-цепью. Такие молекулы содержат 10 активных центров и могут связывать больше антигенных детерминант (от 5 до 10). Антитела IgM синтезируются в организме при первичном иммунном ответе, низкоаффинны, но высокоавидны из-за большого числа активных центров. В комплексе с антигеном они более эффективно активируют комплемент по сравнению с IgG. Момеры IgM являются рецепторами В-клеток.

Иммуноглобулины класса А (м.м. 160 kDa) имеются в крови и секретах слизистых оболочек. В сыворотке крови содержится 2 г/л (от 1,5 до 3 г/л) IgA (субклассы A₁ и A₂). В крови IgA присутствуют в виде мономеров, а в секретах в форме димеров и тримеров. Димеры характеризуются наличием дополнительной J-цепи, сшивающей два мономера в районе Fc-фрагмента, и секреторного компонента, который присоединяется к IgA в эпителиальной клетке. Он (гликопротеид) обеспечивает прохождение IgA через эпителиальную клетку и защиту его от расщепления протеолитическими ферментами секретов. Секреторные IgA (sIgA), будучи антителами, формируют местный иммунитет, препятствуют адгезии микроорганизмов к эпителию слизистых оболочек, опсонизируют микробные клетки, усиливают фагоцитоз. Кроме этого, они препятствуют адсорбции и репродукции вирусов в клетках эпителия. Ежедневно в слизистой оболочке кишечника синтезируется до 3 г секреторного IgA. Большое количество его выделяется со слюной из носа. Новорожденные получают секреторный IgA с молоком матери.

Иммуноглобулины класса D (м.м. 185 kDa) содержатся в сыворотке крови в концентрации 0,03-0,04 г/л. Они служат рецепторами созревающих В-лимфоцитов. Количество IgD увеличивается при некоторых вирусных инфекциях.

Иммуноглобулины класса E (м.м. 190 кД) присутствуют в сыворотке крови в концентрации около 0,00005 г/л или от 0 до 100 МЕ/мл (одна международная единица равна 2,4 нг). При аллергии их содержание в крови увеличивается и многие из них специфичны к аллергену, т.е. являются антителами. Эти IgE-антитела отличаются по строению (степени гликозилирования) от обычных IgE-

иммуноглобулинов. IgE имеются в секрете слизистых оболочек носа, бронхов, кишечника, среди них много антител против аллергенов.

3.3. Возрастная динамика уровней иммуноглобулинов человека

У новорожденных в крови имеется только материнский IgG (8-10 г/л); уровень его снижается к 5-6 месяцам (до 5 г/л), а затем увеличивается за счет синтеза собственного IgG. Количество IgM очень небольшое (0,02-0,1 г/л), к году уровень их увеличивается, IgA и IgE – отсутствуют. В возрасте 2-х лет уровень всех иммуноглобулинов близок к нормам взрослых, а полностью соответствует им к 10 годам.

Аллотипы иммуноглобулинов – это вариации в их строении у разных индивидуумов, обусловленные разными аллелями соответствующих генов, чаще постоянных доменов тяжелых и легких цепей. Тяжелые γ -цепи IgG могут отличаться по G-маркеру (вместо аспарагина и глутамина в участке их цепи имеются глутамин и метионин).

Изотипы – классы и субклассы иммуноглобулинов, отличающиеся константными доменами цепей: например различия классов Ig по тяжелым цепям или изотипы каппа и лямбда легких цепей.

Переключение изотипа – изменение класса синтезируемого В-клетками иммуноглобулина в процессе иммунного ответа и созревания плазматической клетки (с IgM на IgA и IgG).

У пожилых здоровых людей уровни иммуноглобулинов существенно не изменяются, а возникшие сдвиги обусловлены заболеваниями.

3.4. Fc-рецепторы для иммуноглобулинов-антител

Fc-рецепторы для иммуноглобулинов – важная группа молекул, находящихся на поверхности различных клеток, особенно лейкоцитов. Они связывают Fc-фрагменты иммуноглобулинов различных изотипов (классов). Их разновидности обозначаются греческими буквами соответственно обозначениям тяжелых цепей иммуноглобулинов, которые они связывают: Fc γ R связывает IgG, Fc μ R связывает IgM, Fc α R – IgA, Fc δ R – IgD, Fc ϵ R – IgE. Субтипы этих рецепторов обозначают прописными цифрами – Fc γ RI (CD64) Fc γ RII (CD32) и Fc γ RIII (CD16), Fc ϵ RI и Fc ϵ RII (CD23). В скобках указано, каким CD-молекулам они соответствуют при выявлении моноклональными антителами. Каждый FcR состоит из нескольких субъединиц (α , β , γ) и иногда переходит с мембраны в растворимую форму. Клетка, связавшая иммуноглобулин-антитело своим Fc-рецептором, может специфично взаимодействовать с соответствующим антигеном и выделять после этого медиаторы и ферменты.

Значительная часть иммуноглобулинов связана с Fc-рецепторами лейкоцитов и других клеток, тогда как несвязанные циркулируют в сыворотке крови, где их можно определить. При болезнях экспрессия Fc-рецепторов на клетках, как и концентрация иммуноглобулинов в крови, меняется; взаимоотношение «Fc-рецептор-иммуноглобулин» определяет их уровень в крови и на клетках, и от этого зависит развитие патологического процесса.

Резкие колебания уровней иммуноглобулинов и их субклассов в крови, не только при заболеваниях, но и стрессах, тяжелой физической нагрузке у спорт-

сменов, могут быть обусловлены повышением экспрессии FcR на лейкоцитах и эндотелии и «вылавливанием» части Ig.

Наличие связанных Fc-рецепторами иммуноглобулинов-антител на мембранах позволяет несущим их клеткам специфично взаимодействовать с антигенами. Этот феномен давно известен в аллергологии: базофилы, связавшие IgE-антитела, выделяют медиаторы (гистамин и др.) при взаимодействии с аллергенами (см. «Аллергия»). Однако оказалось, что феномен представлен широко: любые клетки могут экспрессировать Fc-рецепторы (особенно после воздействия цитокинов), связывать антитела и взаимодействовать с соответствующими антигенами. Эндотелий, связавший антитела, будет реагировать на аллергены пищи и микроорганизмов, что в итоге приведет к стенокардии, инфаркту.

Следовательно, **«Fc-рецепторная сеть»** организма, представленная на клетках и изменяющаяся под влиянием стрессов, гормонов, цитокинов – *уникальная реагирующая структура, сопоставимая с системой нервных рецепторов, так как высокое разнообразие экспрессируемых Fc-рецепторов для иммуноглобулинов усиливается тонкой специфичностью связанных иммуноглобулинов-антител, что обеспечивает реакцию на конкретные вещества и антигены.*

3.5. Антитела

Имуноглобулины любого из 5 классов, специфично взаимодействующие с определенным антигеном, называют *антителами* (АТ).

Идиотипы – варианты антител, отличающиеся по V-доменам и активным центрам, которые отражают их специфичность к антигену.

Популяция В-лимфоцитов состоит из большого числа отличающихся клонов, каждый из которых синтезирует антитела определенной специфичности. Поэтому существует несколько миллиардов вариантов антител разной специфичности. Такое разнообразие обусловлено генетическими рекомбинациями, мутациями V-региона и вариантами транспозиции генов иммуноглобулинов. В предшественниках В-лимфоцитов гены, кодирующие разные области (домены) пептидных цепей антител, расположены не рядом друг с другом. Так, кластеры генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов находятся в различных хромосомах.

При дифференцировке лимфоцитов наблюдается перенос генов (транспозиция) и их объединение. Три группы генов в хромосоме 2 образуют участок, ответственный за синтез *легкой каппа-цепи* Ig: 1) около 250 зародышевых V-генов, каждый из которых кодирует 94-95 аминокислотных остатков; 2) 5 J-(joint-соединение)-мини-генов, один из которых неактивный – псевдоген; остальные кодируют фрагменты из 12-14 остатков аминокислот; 3) C_κ-ген кодирует постоянный фрагмент каппа-цепи. Рекомбинация начинается с объединения одного из V_κ-гена с одним J-мини-геном. Это происходит путем «делеции» – удаления тех нуклеотидов, которые находятся между ними, с помощью ферментов – эндонуклеаз, детерминируемых генами RAG1 и RAG2. В результате формируется V_κ-локус, состоящий из трех экзонов. Возможное число вариантов к-цепи – 250×5=1225. Для лямбда-легких цепей (гены в хромосоме 22) известны два локуса, в каждом из них есть один V_κ-ген и по два J- и C-гена. Однако рекомбинация сходна.

Структурная организация генов для *тяжелых цепей* иммуноглобулинов аналогична. Варибельный участок тяжелой (H) цепи синтезируется под контролем трех случайно объединенных генов V, D (diversity) и J, каждый из которых существует в виде многих аллелей (V_H - около 500, D до 20, J до 6). Вначале объединяются D- и J-сегменты (мини-гены), а затем DJ с V-геном (эта перестройка контролируется особыми генами рекомбинации – RAG1 и RAG2). После этого VDJ-генный комплекс на ранних этапах созревания В-лимфоцита сливается с геном, контролирующим постоянную область C_μ . В результате может образоваться приблизительно – $500 \times 20 \times 6 = 60000$ вариантов тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Разные тяжелые и легкие цепи тоже соединяются случайно, поэтому число вариантов иммуноглобулинов связывающих разные антигены, т.е. антител увеличивается до 2×10^8 и более. Их разнообразие формируется за счет:

- исходной множественности V-генов и их гипермутабельности (в V_H -гене – 2–4%);
- комбинаций V-генов с различными J и D сегментами;
- использования разных рамок считывания и вставок;
- комбинаций V-доменов легких и тяжелых полипептидных цепей.

Сформировавшиеся комплексы генов VJ легкой и VDJ тяжелых цепей иммуноглобулинов на ранних этапах дифференцировки В-лимфоцита определяют его потенциальную специфичность к антигену. Однако при антигенной стимуляции и пролиферации В-клеток возникают очень частые *соматические мутации* в их V-генах (процесс гипермутации). В результате те В-клетки, которые образуют антитела с большим сродством к антигену, стимулируются, подвергаются селекции и поэтому увеличивается *аффинность* (сродство, сила связывания) антител – «*созревание аффинности*». Процесс мутаций приводит к увеличению специфичности и разнообразия антител, их варибельность в итоге достигает 10^{17} вариантов.

При созревании В-лимфоцитов под влиянием антигена синтез IgM переключается на другие классы Ig. Для этого VDJ-ген объединяется с C_H -генами других классов Ig. Возможно объединение разных VDJ-генов с одинаковым C_H -геном, что формирует разные специфичности антител.

3.6. Виды антител

Различают *естественные* и *иммунные* антитела. Естественные АТ находятся в организме без предварительного введения антигена (иммунизации). Примером таких АТ являются α - и β -изогемагглютинины сыворотки крови человека I группы, направленные против А и В антигенов эритроцитов людей других групп крови (II–IV) – это чаще антитела класса IgM. У человека есть также IgM-антитела против эритроцитов животных. Встречаются естественные антитела против микробов, которые служат факторами естественного и видового иммунитета. Такие IgM-антитела образует В-1 субпопуляция лимфоцитов.

В небольшом количестве в крови имеются «нормальные АТ», способные взаимодействовать с собственными антигенами организма (аутологичные АТ), они стимулируют дифференцировку клеток.

Иммунные АТ накапливаются и выявляются в сыворотке крови после предварительной иммунизации антигенами. Они связываются с нативными антигенами. Различают несколько видов таких АТ. *Противоинфекционные АТ* об-

разуются после попадания в организм антигенов микробов, вирусов, простейших, грибов, токсинов. Соответственно различают антибактериальные, антитоксические, антивирусные и другие АТ.

Неинфекционные антигены тоже вызывают появление в организме антител. Среди таких антител различают *ксеногенные* (антивидовые – против АГ другого вида), *аллогенные* (внутривидовые – против изоантигенов одного вида) и *аутоантитела* (к собственным антигенам организма).

Каждое антитело может связывать разные антигены.

В зависимости от оптимальной температуры взаимодействия с антигеном различают *холодовые* (реакция от 0 до 18°C) и *тепловые* (37°C) антитела.

Холодовые антитела проявляют цитотоксическую активность при 3–15°C в присутствии комплемента. Чаще это IgM, реагирующие с аллогенными лимфоцитами (изолимфоцитотоксины), или аутолимфоцитотоксины, которые выявляются при аутоаллергических заболеваниях. Холодовые аутолимфоцитотоксины могут разрушать лимфоциты при переохлаждении организма и в условиях гипотермии и тем самым подавлять иммунитет (*феномен простуды*).

3.7. Механизмы действия антител

Различают 6 основных механизмов действия антител:

- нейтрализация активных центров токсинов (токсиннейтрализующий эффект);
- образование комплекса антиген-антитело, который активирует комплемент с последующим лизисом клетки (литический эффект при участии комплемента);
- опсонизация объектов фагоцитоза (усиление фагоцитоза);
- связывание с Fc-рецепторами лейкоцитов, которые приобретают способность специфично взаимодействовать с антигенами («вооружающий» эффект антител);
- антирецепторные антитела, связываясь с соответствующим рецептором, блокируют или стимулируют функцию клетки (блокирующие и стимулирующие эффекты);
- антитела обладают собственной ферментативной активностью и могут расщеплять (медленно) некоторые субстраты (*абзимная активность*).

Бивалентные АТ (обычно класса Ig G), имеющие 2 активных центра, получили название *полных АТ*. Наряду с ними существуют моновалентные *неполные АТ*, у которых действует один связывающий активный центр из-за пространственной блокировки второго центра.

Сила связывания (сродство) одного активного центра АТ с эпитопом антигена получила название *аффинности (аффинитета)*. *Прочность* связывания всей иммуноглобулиновой молекулы с антигеном называется *авидностью (авидитетом)*. Обычно она прогрессивно увеличивается с увеличением количества активных центров в иммуноглобулиновой молекуле. Отсюда наибольшей авидностью обладают IgM.

При иммунизации антигеном в сыворотке крови появляется широкий спектр АТ с различной аффинностью. Это обусловлено тем, что антиген стимулирует большое количество клонов В-клеток. Получаемые таким образом поликлональные иммунные антитела и сыворотки представляют смесь иммуноглобулиновых молекул различных классов.

Иммунные комплексы образуются при взаимодействии активных центров (паратопов) антител и детерминант (эпитопов) антигенов в нейтральной среде

(рН 7,2–7,3) за счет связей Ван-дер-Ваальса (нековалентная связь – наименьший энергетически выгодный радиус между атомами), водородных (атомы водорода в составе функциональных групп), электростатических и гидрофобных взаимодействий. При изменении рН среды в кислую (менее 6,0) или щелочную (более 8,0) стороны иммунный комплекс распадается на свободные антиген и антитело.

Взаимодействия антител и антигенов вызывают феномены *агглютинации*, *преципитации* и *лизиса*. Иммунные комплексы активируют комплемент по классическому пути, связывая его C1q компонент CН₂ доменом Fc-фрагмента IgG или IgM. Если эти Ig-антитела направлены против антигенов мембраны клетки, то она при этом лизируется.

При обычном иммунном ответе иммунные комплексы (ИК) связываются CR-1-рецепторами эритроцитов и утилизируются в селезенке, а также Fc-рецепторами лейкоцитов (нейтрофилов, макрофагов), фагоцитируются и расщепляются. При их патологическом накоплении возникают «иммунокомплексные реакции».

Моноклональные антитела разработаны на основе соматической гибридной технологии. Такие АТ моноспецифичны, направлены к одному эпитопу АГ. Для их получения мышей иммунизируют изучаемым антигеном (в клеточной или растворимой форме). Из селезенки иммунизированных животных получают суспензию клеток, среди которых есть антителообразующие. Затем проводят слияние этих антителообразующих В-клеток, которые долго не живут, с В-клетками мышинной опухоли – плазмцитомы (делятся непрерывно, «бессмертные» клетки). Сама плазмцитомы к синтезу АТ не способна. Слияние геномов этих клеток под одной клеточной мембраной (с помощью полиэтиленгликоля) приводит к появлению гибридных клеток. Они приобретают способность к синтезу специфических антител (от иммунных В-лимфоцитов) и становятся долгоживущими, непрерывно делящимися (как плазмцитомы). Чтобы их выявить, взвесь клеток культивируют в специальной среде, в которой не растут обычные негибридные клетки.

Из выращенной смеси гибридных клеток выделяют по 1 клетке и помещают в одну лунку с жидкой питательной средой и размножают (клонировать). После роста клонов в их надосадочной жидкости ищут антитела к изучаемому антигену. После их обнаружения в одной из лунок соответствующий клон отбирают и размножают. Накопившийся клон клеток продуцирует моноклональные АТ, специфичные к единственному эпитопу изучаемого антигена.

Моноклональные АТ оказались исключительно удобным диагностическим средством. С их помощью выявляют антигены бактерий и вирусов, маркеры клеточных популяций, гормоны, медиаторы и т.д.

Для лечения их используют реже, так как после введения человеку они вызывают выработку АТ к иммуноглобулинам мыши и аллергические реакции.

Химерные антитела – искусственные антитела, в которых постоянная часть цепей синтезирована генами человека, а переменная – генами мышинной гибридомы (мАТ). Они менее антигенны при лечении больных. Другим вариантом этих антител являются «замещенные», в которых только контактирующие с антигеном участки переменных доменов («минимально узнающие пептиды») являются мышинными, а остальная часть молекулы человеческая.

ГЛАВА 4. Неинфекционная иммунология

Неинфекционный иммунитет – совокупность реакций системы иммунитета, направленных на неинфекционные биологически активные агенты- антигены.

К неинфекционным антигенам относятся АГ растений, лекарственные препараты, химические, природные и синтетические вещества, антигены клеток животных и человека.

Аллогенные антигены (изоантигены) – молекулы-антигены, отличающие одного индивидуума от другого. К аллоантигенам относятся АГ эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и аллоантигенные варианты иммуноглобулинов I_{nv} и G_m .

4.1. Антигены эритроцитов

На поверхности эритроцитов имеется более 194 антигенов, относящихся к 23 системам. Наиболее важными являются гликопротеины – изогемагглютиногены системы АВ0 групп крови, обнаруженные в 1900 г. К. Ландштейнером. По наличию А и В антигенов и соответствующих им естественных антител (α и β) различают 4 группы крови у человека: 0(I) – нет антигенов, есть α и β -антитела, А(II) – присутствует только А антиген и β -антитела, В(III) – есть В-АГ и α -антитела, АВ(IV) – есть оба АГ, нет антител.

Группоспецифические антигены – 0, А, В контролируются генами, находящимися на 9 хромосоме. Возможны шесть комбинаций антигенов: 00, А0, АА, В0, ВВ, АВ в связи с передачей одного из трех аллельных генов от матери, и другого – от отца. Так как серологически нет различий между А0 и АА и В0 и ВВ, то различают *четыре основные группы крови*.

Антитела против антигенов АВ0 класса IgM являются полными изогемагглютинидами и встречаются у здоровых лиц в титрах 1:16 – 1:128. Группы крови АВ0 определяют, выявляя антигены эритроцитов с помощью известных антител и стандартных эритроцитов в реакциях агглютинации.

Людам, имеющим антитела против антигенов А и В, нельзя переливать кровь тех, эритроциты которых несут соответствующие антигены. Так, реципиентам I группы крови (антитела альфа и бета) нельзя переливать эритроциты любой из остальных групп, так как наступит агглютинация и лизис этих эритроцитов. Однако, доноры I группы крови являются «универсальными», так как их кровь можно переливать реципиентам других групп, но в небольшом количестве (есть антитела), или только эритроцитарную массу. В ряде случаев, особенно у больных с гематологическими заболеваниями, необходимо учитывать совместимость по другим антигенам: резус, Lu, Le, Kell, Даффи и др.

Система Rhesus. У 85% людей на эритроцитах есть резус-АГ (Rh+), обнаруженный впервые у обезьян вида макака-резус Левином и Стетсоном в 1939 г. Этот антиген отсутствует у 15% людей. При наличии у резус-отрицательной женщины плода, на эритроцитах которого есть Rh антиген (за счет генов отца), происходит иммунизация матери, и ее IgG-антитела, проникшие через плаценту, могут разрушать эритроциты плода, особенно при повторной беременности. В итоге возникает резус-конфликт – гемолитическая болезнь новорожденных. Система резус-антигенов оказалась сложной по строению. Она включает три па-

ры (сильный – слабый) генов: *Cc*, *Dd*, *Ee*, кодирующих соответствующие антигены. Наиболее иммуногенен *Rh-D*, поэтому «резус+» определяют по нему. Однако при наличии его «слабого» варианта, переливание такой крови может вызвать антитела у резус-отрицательных лиц и, наоборот, переливание эритроцитов с сильной экспрессией D-антигена тому, у кого он слабо выражен, тоже вызывает появление антител. Резус-антигены определяют на эритроцитах с помощью моноклональных антител (цоликлон «IgM-анти-D-супер») и IgG-антител анти-D в реакциях агглютинации.

Эритроцитарные антигены Келл могут быть причиной сенсibilизации при переливании крови, поэтому рекомендуют не переливать донорские эритроциты Келл +.

На эритроцитах имеются также M и N антигены: у 28% – MM, у 50% – MN и у 20% людей – NN, однако реакции на них встречаются редко.

4.2. Аллогенные антигены лейкоцитов

HLA-система антигенраспознающих молекул: в сыворотке крови больных, которым многократно переливали кровь доноров, а также у многорожавших женщин были обнаружены антитела, агглютинирующие и лизирующие лейкоциты доноров. При переливании таким лицам цельной крови или лейкоцитарной массы у них могут быть аллергические трансфузионные реакции.

На гранулоцитах (нейтрофилах) обнаружено *три группы антигенов*: NA1 (HNA-1a), NA2 (HNA-1b) и SH (HNA-1c), а также NB1, NC1, ND1, NE1, HGA-3 a, b, c, d, e. Реже выявляются GA, GB, GC, GR. При отсутствии у матери HNA-антигенов у нее появляются антитела IgG на антигены плода (отцовские), и у новорожденных возникает аллоиммунная нейтропения.

На лимфоцитах выявлена целая система *молекул лейкоцитарных АГ – HLA (Human Leucocyte Antigen)*, которая контролируется генами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ или в английском варианте MHC – Major Histocompatibility Complex). «Комплекс» включает около 4×10^6 пар нуклеотидов и состоит из множества тесно сцепленных генетических структурных единиц – локусов, представленных разными генами, каждый из которых может существовать в нескольких вариантах, называемых *аллелями*. У мышей хорошо изучен аналогичный ГКГ-локус H-2 в 17-й хромосоме. Свое название «комплекс гистосовместимости» он получил потому, что впервые был обнаружен и изучен при трансплантации тканей на мышах.

У человека продукты этих HLA-генов – HLA-молекулы (антигены) – белки клеточных мембран. Их набор у каждого человека индивидуален, и только у однояйцевых близнецов он одинаков. Основные функции HLA-молекул (антигенов):

- участвуют в распознавании экзогенных антигенов;
- участвуют в межклеточных взаимодействиях и развитии иммунного ответа;
- определяют предрасположенность к заболеваниям;
- являются маркерами «своего»;
- вызывают реакцию отторжения антиген-несовместимых трансплантатов тканей донора и только тогда они и являются антигенами.

Гены главного комплекса гистосовместимости (у человека – гены HLA системы и соответствующие им HLA-молекулы) определяют силу и специфичность

иммунного ответа. По существу обычное название – «HLA-антигены» неверно, так как эти молекулы служат антигенами лишь при попадании в другой организм (пересадка тканей, переливание лейкоцитов). Аутологичные HLA-молекулы неантигенны для организма и, более того, *служат рецепторами для первичного распознавания* антигенов. В этом – их важнейшая физиологическая роль.

Поэтому иммуногенетика, изучающая структуру, взаимодействия HLA-молекул и генетический контроль иммунитета стала определяющей в развитии медицины.

Гены HLA-системы, контролирующие синтез HLA-молекул, локализованы в 6-й паре аутосомных хромосом. Они занимают обширный генетический район, равный 1,6 сантиморгана, и делятся на 5 классов. Важнейшее значение в иммунорегуляции имеют гены I и II классов гистосовместимости. Локусы генов I класса локализуются в периферическом плече хромосомы, II класса – ближе к центromере.

Кластер генов I класса *HLA* находится наиболее дистально на коротком плече 6 аутосомной хромосомы и включает в себя около 4 млн пар оснований. Этот кластер состоит из трех генных локусов: *A*, *B*, *C*. Кроме них, к I классу относятся еще гены локусов *HLA-E*, *F*, *G* (псевдогены и гены транскрипции). Ближе к центromере расположен локус *HLA-B*, а в сторону теломеры находятся локусы *HLA-C* и *HLA-A*.

Молекулы HLA I класса, продукты генов, являются гетеродимерами и состоят из двух различных цепей. Одна из них тяжелая, с молекулярной массой 45 kDa, вторая легкая, с молекулярной массой 12 kDa, нековалентно связана с первой. Она представляет собой β 2-микроглобулин. Тяжелая цепь имеет три домена (α 1, α 2, α 3), выступающих на поверхности клетки, гидрофобный участок, фиксирующий цепь в мембране, и концевой участок в цитоплазме.

Домены α 1 и α 2 тяжелой цепи молекул HLA I класса образуют *антигенсвязывающую бороздку* в виде желоба с закрытыми концами. В ней связываются пептиды длиной 9–11 аминокислотных остатков. Эти пептиды получают из молекул антигена, предварительно расщепленного (процессированного) внутри клетки и экспрессированного в виде пептидов на ее поверхности уже в полостях молекул HLA I класса. *HLA-молекулы – продукты разных генных аллелей у людей связывают строго определенные пептиды, отсюда возникает специфичность связывания антигена.* На этом первом этапе распознавания антигена специфичность невысока, но «полость» и «пептид» приспособляются друг к другу.

HLA-АГ I класса имеются на всех ядросодержащих клетках: на лимфоцитах, в меньшей степени – на клетках печени, легких, почек, очень редко на клетках мозга и скелетных мышц. Антигены I класса контролируются генными локусами *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* и другими. В каждом локусе существует много аллелей, ответственных за синтез соответствующего варианта специфичности (эпитопа) и обозначаемых цифрами. С применением цепной полимеразной реакции для анализа генов ДНК количество выявленных аллелей резко увеличилось. В локусе *HLA-A* обнаружено 124 специфичности, *HLA-B* - 258, *HLA-C* – 74; *HLA-E* – 5, *HLA-G* -14 специфичностей. Эти аллели определяют неоднородность HLA-антигенов у разных людей, т.е. их антигенную несовместимость.

Их обозначения включают: название системы – HLA, гена (локуса) – например, A, номера антигенной специфичности 2, ее аллеля – 12; итог – HLA-A0212; HLA-B1531 (локус – B, специфичность B15, аллель 31). Антигенные специфичности определяют с помощью антител, а аллели – ДНК-типированием. Гены *HLA* обозначаются так же, как АГ, но названия пишутся курсивом, а антиген обычным шрифтом.

Гены отца и матери кодоминантны – экспрессируются по одному каждого A, B, C локуса на хромосомах – отца и матери, т.е. всего шесть.

Антигены I класса занимают примерно 1% клеточной поверхности на лимфоцитах, их почти нет на эритроцитах и клетках трофобласта. Они регулируют и ограничивают взаимодействие между Т-киллерами и клетками-мишенями. Отсюда их основная биологическая роль: АГ I класса являются маркерами «своего». Клетки, несущие эти молекулы, не атакуются собственными Т-киллерами в связи с тем, что в эмбриогенезе аутореактивные Т-киллеры, распознающие их на собственных структурах, подвергаются апоптозу или супрессируются.

Гены *HLA II* класса представлены многими вариантами. По ДНК-типированию выявлено более 270 аллелей *HLA-DR* (серологически определяемых – 23). *DQ* локус содержит, как и *DR*, по две пары генов *A* и *B*, причем *DQA* имеет 19, а *DQB* – 39 аллелей (серологически – 9). *DP* локус представлен двумя генами *DPA1* (38 аллелей) и *DPB1* (62 аллелей). Ко II классу относятся также локусы *HLA – DOB*, *HLA-DNA* и *HLA-DM*.

Не все HLA-антигены II класса определяются серологически, поэтому для их выявления и оценки совместимости применяют смешанную культуру лимфоцитов: стимулирующие лимфоциты (например, донора) обрабатывают ингибитором пролиферации (митомизин С) и добавляют к отвечающим (реципиентским), учитывая пролиферативный ответ.

Молекулы II класса системы HLA состоят из двух полипептидных цепей: α (молекулярная масса 34 kDa) и β (молекулярная масса 28 kDa). Обе цепи имеют по два домена ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\beta 1$, $\beta 2$), закрепленных в клеточной мембране дополнительным участком. HLA-АГ II класса экспрессированы на В-лимфоцитах, ДК, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах, а также появляются на эндотелиальных и эпителиальных клетках после стимуляции их γ -интерфероном. HLA-АГ II класса антигенпредставляющих клеток участвуют в распознавании чужеродных антигенов – пептидов размером до 30 остатков аминокислот, возникших после расщепления в протеосомах поглощенных крупных его молекул. Антигенсвязывающая бороздка HLA-молекул II класса открыта с обоих концов, что позволяет связываться и более длинным пептидам. Комплекс HLA-II-пептид затем экспрессируется на мембране – представляется Т-хелперам.

Гены (соответственно – антигены) системы HLA наследуются по кодоминантному типу, т.е. экспрессируются оба гена (антигена) отцовской и материнской хромосом. У индивидуума может быть не более 12 аллелей всех локусов (минимум по 2 из каждого локуса). Совокупность всех аллелей на одной хромосоме (гаплотип) наследуется целиком. Поэтому гены одного локуса, полученные от отца и матери, могут быть одинаковыми, а могут и различаться.

Частота встречаемости отдельных HLA-антигенов различна у разных рас. У европеоидов часты HLA-A1, A3, B8 и др.; у негроидов – A23, A28, DR3;

у монголоидов – A11, A24, DR4. У этих рас одни и те же заболевания ассоциируются с различными HLA-антигенами.

Гены *HLA* класса III расположены на хромосоме между генами класса I и II, причем *C4* (*C4A* и *C4B*) кодируют 4 компонента, а ген *B* (*Bf*) – фактор В системы комплемента; гены *LMP*, кодирующие протеасомы, гены белков теплового шока HSP70, участвующих во внутриклеточном транспорте антигенов и др.

Определение *HLA*-антигенов необходимо в различных ситуациях:

1. При типировании тканей с целью подбора донора реципиенту. Наибольшее значение имеет совместимость по антигенам локуса HLA-DR.
2. Для установления связи экспрессии определенных антигенов и предрасположенности к тому или иному заболеванию. Наиболее сильная корреляция выявлена между наличием HLA-B27 и болезнью Бехтерева (анкилозирующий спондилоартроз): 95% больных имеют этот антиген.
3. При оценке иммунного статуса, когда используется выявление активированных Т-клеток, несущих HLA-DR антигены, и определение HLA-DR экспрессирующих мононуклеаров, участвующих в распознавании антигенов.

4.3. Эндогенные (аутологичные) антигены

В норме существуют аутоантитела к аутоантигенам в низкой концентрации. При патологии ситуация меняется.

Под **эндогенными антигенами** понимают собственные аутологичные молекулы (аутоантигены) или их сложные комплексы, вызывающие в силу разных причин активацию системы иммунитета. Чаще всего это связано с нарушением аутоотолерантности. При этом может происходить изменение конформации собственных молекул, а также нарушение механизмов супрессии аутоиммунной реакции. В результате накапливаются антитела и иммунные Т-клетки, специфично взаимодействующие с аутоантигеном и при участии вспомогательных систем вызывающие повреждение органов и тканей, в состав которых входит данный аутоантиген.

Вариантом аутоантигенов являются «патологические» антигены, возникающие в результате ожогов, действия радиоактивного излучения и других воздействий. Экзогенные антигены могут участвовать в формировании аутоантигенов, изменяя структуру макромолекул организма. Различают:

- естественные первичные АГ (нормальная ткань хрусталика глаза, нервная ткань и др.);
- приобретенные вторичные – продукты повреждения тканей микробами, вирусами или комплексы микробный антиген + антиген ткани, ожоговые, лучевые, холодовые АГ.
- Кроме того, по тканевой и клеточной принадлежности можно выделить следующие виды органоспецифических и тканеспецифических веществ, которые могут быть антигенами:
 - стромальные (антигены эластических, коллагеновых и других волокон);
 - клеточные (мембранные, цитоплазматические, ядерные и т.д.);
 - внеклеточные аутоантигены (антигены межтканевой жидкости, антигены жидких сред и др.).

4.4. Молекулы поверхности лейкоцитов, кластеры дифференцировки

Для всех интерлейкинов на клетках имеются связывающие их рецепторы. В процессе дифференцировки на мембранах клеток системы иммунитета появляются макромолекулы – маркеры, соответствующие определенной стадии развития. Они получили название **CD-антигенов** (от английского – clusters of differentiation – кластер дифференцировки). В настоящее время их известно более 250.

- **CD1** – имеют кортикальные тимоциты
- **CD2** – маркер всех Т-клеток, он же рецептор к эритроцитам барана
- **CD3** – несут все Т-лимфоциты, участвует в формировании рецептора Т-лимфоцитов
- **CD4** – маркер Т-хелперов, рецептор к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ)
- **CD5** – имеют зрелые и незрелые Т-клетки, аутореактивные В-клетки
- **CD6** – несут зрелые Т-клетки и частично В-клетки
- **CD7** – имеют Т-клетки, ЕК (Fc μ рецептор IgM)
- **CD8** – маркер Т-супрессоров и цитотоксических лимфоцитов
- **CD9** – несут моноциты, тромбоциты, гранулоциты
- **CD10** – имеют незрелые В-клетки (GALLA- антиген лейкозных клеток)
- **CD11a,в,с** – несут все лейкоциты, это цепи интегринов комплекса лейкоцитарного функционально-активного антигена (LFA1)
- **CD14** – маркер макрофагов
- **CD16** – маркер ЕК, лейкоцитов, рецептор Fc γ для IgG
- **CD19, 21, 22, 72** – молекулы, имеющиеся на В-лимфоцитах
- **CD34** – маркер гемопоэтической стволовой клетки. Эти антигены выявляются с помощью моноклональных антител в реакции прямой или непрямой иммунофлуоресценции.
- **CD40** – рецептор на В-лимфоцитах и LCD40 - лиганд на Т-лимфоцитах, взаимодействующие при активации клеток

Глава 5. Механизмы и регуляция иммунного ответа

С самого начала развития иммунологии как науки возникла необходимость в объяснении наиболее важных особенностей иммунного ответа: наличия огромного разнообразия специфичностей антител и клеточных рецепторов, а также способности к распознаванию собственных или чужеродных для организма структур.

5.1. Разнообразие антител и рецепторов

Основные гипотезы, касающиеся механизма иммунного ответа, были предложены еще к 50–60 годам XX века. Центральной среди теорий иммунитета явилась **селекционно-клональная теория**, предложенная Ф.М. Бернетом.

Основные положения ее следующие:

– в организме исходно присутствуют клоны клеток, несущих рецепторы (антитела) ко всем возможным антигенам;

- клоны клеток, способные реагировать с собственными тканями и органами, элиминируются еще в эмбриональном периоде;
- антиген при попадании в организм связывается с наиболее соответствующим ему (комплементарным) рецептором или антителом. Если связывание достаточно прочное, то этот клон вступает в пролиферацию и дифференцировку, поддерживая дальнейший иммунный ответ.

Все вышеприведенные положения получили соответствующие экспериментальные доказательства. В дальнейшем селекционно-клональная теория подвергалась лишь модификациям и уточнениям. Так, например, оказалось, что неотвечаемость (толерантность) к собственным АГ может поддерживаться не только удалением аутореактивных клонов, но и их супрессией, подавлением активности. Единственным неясным обстоятельством оставалась *проблема громадного разнообразия антигенсвязывающих молекул иммунной системы.*

Трудно было представить возможность полного кодирования всех специфичностей антител и рецепторов еще в ДНК половых клеток отца и матери до рождения организма. Генетические исследования, разрешившие эту проблему, были проведены японским исследователем С. Тонегавой в 70–80 годах прошлого века.

1. Было выявлено, что *каждая тяжелая и легкая цепь иммуноглобулина кодируется несколькими генными фрагментами, расположенными на разных хромосомах.* В ДНК половых клеток они разобщены и объединяются непосредственно в В-лимфоцитах и плазматических клетках. Варибельные участки легких цепей кодируются V-сегментами (до нескольких сотен вариантов) и J-сегментами (4 варианта). Варибельные участки тяжелых цепей кодируются V-, D- и J- генными сегментами. Кроме того, каждый такой генный сегмент формируется из нескольких участков ДНК. Несколькими сочетаниями представлены и константные участки легких и тяжелых цепей. Суммарное количество вариантов молекул иммуноглобулинов достигает уже в этом случае нескольких миллионов.

2. При объединении фрагментов генома в единую последовательность ДНК происходят множественные рекомбинации и мутации (делеции, инверсии, дупликации) в области соединения сегментов. Это приводит к лавинообразному нарастанию возможных вариантов.

3. Разнообразие антител увеличивается и при последовательной смене (переключении) классов иммуноглобулинов (с IgM и IgD на IgG, IgA и т.д.), продуцируемых одной клеткой. Это обусловлено генетическими транслокациями.

4. Разнообразие вариантов иммуноглобулинов продолжает постоянно увеличиваться и после непосредственных контактов иммунной системы с антигеном. Это связано с наличием генетического механизма, обуславливающего постоянные соматические мутации в последовательности ДНК уже сформированных антител.

Общее разнообразие иммуноглобулинов достигает таким образом миллиардов вариантов. Аналогичным способом возникает разнообразие антигенсвязывающих участков Т-клеточных рецепторов (миллионы возможных вариантов). Все это подтвердило справедливость положения, высказанного Ф.М. Бернетом о том, что в организме исходно существуют рецепторы и антитела к любому сочетанию антигенных детерминант.

5.2. Распознавание антигенов и кооперация клеток

Основные клетки, обеспечивающие развитие иммунного ответа – макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты. Однако в зависимости от вида антигена и конкретных условий в нем активно принимают участие различные гранулоциты (эозинофилы и базофилы при аллергии, нейтрофилы при ответе на бактерии) и комплемент.

Клетки и растворимые молекулы системы иммунитета взаимодействуют путем адгезии с различными чужеродными молекулами, представляя собой «*антигенраспознающую сеть адгезинов*». Наиболее изученными из них являются изотипы иммуноглобулинов МНС или HLA I и II класса, CD1 молекулы, рецепторы Т- и В-лимфоцитов, дендритных клеток, факторы комплемента, С-реактивный белок. Наличие полиморфизма, изоморфного разнообразия этих молекул обеспечивает их динамичное, прогрессирующее взаимодействие с разными эпитопами молекул патогенов-антигенов, что и определяет развитие врожденного, а затем и адаптивного иммунного ответа путем индукции процесса многоэтапной селекции молекул и клеток («*селекционный каскад*»).

Принципы распознавания антигенов:

1. «Чужое» узнается в связи со «своим», т.е. антиген в комплексе с аутологичными молекулами HLA I или II классов (МНС - главного комплекса гистосовместимости у животных).
2. Основными первичными АПК являются дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты, но могут быть и другие клетки, несущие соответствующие HLA-молекулы после активации цитокинами, в том числе эпителиальные, эндотелиальные и Т-лимфоциты.
3. Антигенспецифические рецепторы – ТКР (TCR) на Т-лимфоцитах и мембранные на В-лимфоцитах генетически предопределены и имеются еще до контакта с антигеном. Большое разнообразие этих рецепторов позволяет антигену «находить» связывающий рецептор и активировать несущую его клетку, т.е. антиген осуществляет селекцию антигенспецифических клонов клеток.

5.3. Динамика иммунного ответа

Противобактериальный иммунный ответ развивается в несколько этапов:

I. Представление антигена. Если антиген корпускулярный (микроб или другая частица), то он захватывается макрофагами и переваривается в фагосоме. Небольшие пептиды (9-13 аминокислотных остатков) снова экспрессируются на мембране и в комплексе с HLA-DR антигеном II класса представляется Т-хелперам (*I сигнал*). Одновременно макрофаг активируется и выделяет фактор (ИЛ-1), который также стимулирует Т-хелперы (*II сигнал*).

II. Индуктивная фаза. Т-хелперы, получив 2 сигнала от макрофагов, выделяют ИЛ-2, который стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Причем активируются В-лимфоциты, имеющие мономерный IgM в качестве рецептора, который соответствует этому антигену, т.е. наступает *селекция и избирательная стимуляция В-лимфоцитов*.

III. Эффекторная стадия. В-лимфоциты превращаются в *плазматические клетки*, которые синтезируют антитела, причем специфичность их увеличивает у потомков делящихся клеток. Параллельно возникают Т-эффекторы, которые

имеют на своей поверхности рецепторы к данному антигену (антителоподобные рецепторы). В итоге под влиянием антигенов в организме образуются антитела и иммунные Т-клетки.

Одновременно с активацией Т-хелперов стимулируются *Т-супрессоры*, тормозящие иммунный ответ. Поэтому через определенное время в норме иммунная реакция затихает. В организме остается иммунологическая память: *клетки памяти*.

Против вирусов и некоторых внутриклеточных бактерий (хламидии, риккетсии) иммунитет развивается иначе. Антиген активирует Т-лимфоциты, которые имеют к нему подходящий по сродству рецептор. Причем Т-лимфоцит узнает такой антиген лишь в комплексе с молекулами HLA-I класса, которые есть на всех ядросодержащих клетках. По существу Т-лимфоцит узнает измененные антигеном собственные HLA молекулы I класса. После контакта с этим комплексом Т-лимфоцит активируется, делится, возникают зрелые Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки эффекторы, а также клетки памяти. Сродство их рецепторов к антигену увеличивается. Т-цитотоксические эффекторы лизируют клетки, несущие вирусный или другой антиген на поверхности, и выделяют γ -интерферон. Последний препятствует репликации вирусов и активирует естественные киллеры, которые тоже разрушают вирус-инфицированные клетки.

5.4. Первичный и вторичный иммунный ответ

Антигены проникают в организм через кожу и слизистые оболочки. В эпидермисе имеются белые отростчатые эпидермоциты (клетки Лангерганса), которые связывают антигены и через лимфу мигрируют в паракортикальные зоны регионарных лимфоузлов, где представляют процессированные антигенные пептиды Т-лимфоцитам в комплексе с HLA молекулами II класса. В коже неактивированные ДК не экспрессируют HLA-молекулы II класса и не активируют Т-лимфоциты, но могут это осуществлять при заболеваниях кожи, например, при атопическом дерматите.

При попадании антигенов в организм в первые сутки наблюдается *антигенемия* (циркуляция антигенов в крови). Основное количество антигена исчезает из крови через сутки и накапливается в лимфоузлах. В случаях бактериемии или вирусемии количество антигена может снова увеличиваться.

Иммунный ответ – это реакция СИ на инфекционный или неинфекционный антиген, которая заканчивается накоплением антител и иммунных Т-лимфоцитов (с ТКР) и формированием иммунологической памяти. Однако эта реакция может быть abortивной, неполной, если антиген слабый, а клетки и гуморальные факторы неспецифического иммунитета (макрофаги, ЕК, комплекс) обеспечивают достаточную и быструю его элиминацию. Естественная стимуляция антигенами персистирующих на коже и слизистых оболочках условно-патогенных микроорганизмов поддерживает «тонус» клеток СИ, которые постоянно «фоново» пролиферируют, а В-клетки могут секретировать незначительные количества антител – иммуноглобулины. Только сильная антигенная стимуляция вызывает видимый морфологически и функционально иммунный ответ, включающий все эти этапы взаимодействия клеток СИ – от распознавания антигенов до синтеза антител.

Первичный иммунный ответ развивается после латентного периода (2–3 дней). Первыми синтезируются IgM, а затем IgG (они могут сохраняться в течение всей жизни). Может быть небольшое увеличение уровня IgA, E, D. Одновременно нарастает количество уровень иммунных Т-лимфоцитов, образуются комплексы антиген-антитело. В зависимости от вида антигена преобладают или иммунные Т-лимфоциты или антитела.

При вторичном иммунном ответе за счет клеток памяти стимуляция синтеза антител и иммунных Т-клеток наступает быстро (через 1–3 дня), количество антител резко увеличивается. При этом сразу синтезируются IgG, титры которых во много раз больше, чем при первичном ответе. Часть антител связывается с Fc-рецепторами лейкоцитов.

Чем больше контактов с антигенами, тем выше уровень антител. Это явление используют при иммунизации (многократном введении антигена животным) с целью получения антисывороток, которые применяют для диагностики и лечения.

Антигены, активирующие клетки иммунной системы через посредство Т-лимфоцитов, получили название Т-зависимых антигенов.

Существуют также Т-независимые АГ, запускающие бласттрансформацию и синтез АТ В-лимфоцитами без прямого участия Т-хелперов в этом процессе. Обычно эти АГ являются высокомолекулярными чужеродными структурами, имеющими выраженный заряд. Такие антигены способны связать перекрестно не менее 2-х молекул специфического иммуноглобулинового рецептора на поверхности В-лимфоцита. Это является необходимым условием последующей бластной трансформации.

Необходимо отметить, что молекулярные механизмы, обеспечивающие бласттрансформацию, являются сходными как у В-, так и у Т-лимфоцитов.

Основные этапы активации клеток иммунной системы сводятся к следующему. Поливалентный АГ взаимодействует с 2-мя и более молекулами соответствующего рецептора на иммунной клетке (антителом или Т-клеточным рецептором). При этом происходит перекрестная сшивка данного рецептора. Затем возникают изменения физико-химических свойств мембраны клетки с активацией мембранных регуляторных белков и ферментов (аденилатциклазы, фосфолипазы С и др.). При этом образуются вторичные внутриклеточные посредники (например - цАМФ, цГМФ, инозитолтрифосфат, диацилглицеролы, ионы Ca), активирующие системы протеинкиназ и Ca-связывающих белков (кальмодулин). Далее сигнал передается на геном клетки.

Регуляция иммунного ответа может осуществляться также и по механизму идиотип-антиидиотипической сети, предложенному Н.К. Ерне. Сущность его заключается в следующем. К одному и тому же АГ антитела синтезируются различными клонами лимфоцитов. Такие АТ (или, что равнозначно – Т-клеточные рецепторы) будут несколько отличаться по строению друг от друга. В активном центре таких АТ или рецепторов находятся уникальные антигенные детерминанты, присущие только данному клону лимфоцитов и отличающие его от любых других. Они получили название *идиотопов*. Сам АГ-связывающий участок АТ был назван *паратопом*. Совокупность всех *идиотопов* данного антитела получила название *идиотиопина*. При развертывании иммунного ответа первоначально синтезируются АТ первого поколения, направленные к данному АГ. Они по-

лучили название *идиотипических антител* (несущих идиотип). К их активным центрам, в свою очередь, впоследствии вырабатываются АТ второго поколения – *антиидиотипические*. Они блокируют синтез идиотипических АТ. Так осуществляется естественное затухание иммунного ответа, снижающее вероятность развития аутоиммунных процессов. До следующей встречи с АГ информация о нем будет находиться в долгоживущих клонах клеток памяти.

Нервная и эндокринная системы осуществляют регуляцию функций СИ. Гормоны и медиаторы эндокринной и вегетативной нервной системы взаимодействуют с соответствующими рецепторами клеток СИ и усиливают или угнетают их функции. На клетках СИ широко представлены рецепторы для гормонов, медиаторов, нейропептидов.

Кортизол, адренокортикотропный гормон, адреналин, андрогены, эстрогены индуцируют апоптоз и подавляют пролиферацию лимфоцитов и иммунный ответ.

Кортикостероиды угнетают преимущественно продукцию цитокинов Тх 1 типа (больше чем Тх 2) и усиливают образование ТФРβ, ингибирующего пролиферацию лимфоцитов.

Соматотропин, тироксин, инсулин усиливают пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов. Однако эффекты часто зависят от конкретных условий и могут быть противоположными. С другой стороны, цитокины ИЛ-1 и ФНОα оказывают влияние на гипоталамус, индуцируя лихорадку. Центральная нервная система оказывает влияние на СИ в том числе путем условно-рефлекторной стимуляции или угнетения ее активности.

5.5. Иммунологическая толерантность

В некоторых случаях возможна ситуация, когда макроорганизм не способен по той или иной причине отвечать на определенные АГ. Такая неответаемость получила название иммунологической толерантности (толерантность – терпимость, неответаемость). Это явление было открыто П. Медавара на мышах. Оказалось, что если эмбрионам белых мышей ввести клетки селезенки других линий мышей (черных), то взрослые белые особи, выросшие из этих эмбрионов, не отторгали трансплантаты кожи черных мышей, т.е. становились к ним толерантными. Обычные мыши отторгали такие аллогенные трансплантаты. Аналогичные опыты провел М. Гашек на разных породах кур. В результате экспериментов оказалось, что врожденная толерантность к антигену (*толерогену*) возникает, когда происходит внутриутробный контакт организма с этим антигеном. В этом случае организм после рождения будет воспринимать данный АГ как «свое». В настоящее время такая толерантность объясняется тем, что в эмбриогенезе происходит гибель клонов-предшественников Т-лимфоцитов, способных взаимодействовать с толерогеном.

Кроме врожденной, существует также и приобретенная толерантность. Чаще всего это обратимый процесс. Приобретенная толерантность бывает 2-х видов: высокодозовая и низкодозовая.

Высокодозовая толерантность возникает при попадании в организм больших доз толерогена, особенно введенного на фоне подавления иммунитета (облучение, применение иммунодепрессантов). Такое большое количество АГ вызывает гибель реактивных к нему лимфоцитов.

Низкодозовая толерантность возникает при введении малых доз определенных АГ. Считается, что в данном случае она опосредована активацией клеток-супрессоров, подавляющих иммунную реакцию. В целом же в настоящее время оба механизма поддержания толерантности (делеция клонов и их супрессия) рассматриваются как взаимодополняющие.

Полезные виды толерантности: ауто толерантность, толерантность матери к антигенам плода и полученная к аллергенам при иммунотерапии. Патологический вид – это анергия, неответность на вирулентные микроорганизмы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Иммуитет: определение, феномены иммуитета.
2. Виды иммуитета.
3. Факторы неспецифической резистентности.
4. Видовой иммуитет.
5. Интерфероны. Интерлейкины.
6. Приобретенный иммуитет.
7. Противоинфекционный иммуитет.
8. Неинфекционный иммуитет.
9. Система иммуитета и ее подсистемы.
10. Антигены: определение, свойства. Гаптены.
11. Виды антигенов.
12. Антигены бактерий и вирусов.
13. Суперантигены.
14. Классы иммуноглобулинов: свойства, функции.
15. Антитела.
16. Механизмы действия антител.
17. Аллогенные антигены.
18. Антигены эритроцитов и лейкоцитов.
19. HLA-система.
20. Эндоантигены.
21. Молекулы поверхности лейкоцитов, кластеры дифференцировки.
22. Разнообразие антител и рецепторов.
23. Механизм иммунного ответа.
24. Первичный и вторичный ответ иммунный ответ.
25. Иммунологическая толерантность.

ПРАКТИКУМ

Работа 1. Получение моноклональных антител

Лимфоциты для гибридизации получают из селезенки или лимфоузлов, предварительно иммунизированных целевым антигеном мышей (чаще всего – линии Balb/c). В качестве опухолевых клеток-партнеров используют специально выведенные для получения гибридом мутантные клетки мышинной миеломы

(иногда ее же называют плазмцитомой). «Мутантность» миеломных клеток необходима для метаболической селекции клеток гибридом от неслившихся с лимфоцитами клеток миеломы. Эта «мутантность» состоит в *отсутствии в миеломных клетках действующего гена, кодирующего фермент ГГФРТ* (гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза). Данный фермент катализирует синтез гуанина дГТФ, входящего в состав ДНК.

Методика: 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 - полиэтиленгликоль. 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 целевыми клетками являются только гибриды «лимфоцит-миелома»), отмывают и разводят в рассчитанном объеме селективной среды НАТ. НАТ означает «Нурохантине-Аминоптерин Тимидин». Указанные 3 компонента в известных концентрациях вводят в полную культуральную среду. 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, избирательно блокирующего ферменты биосинтеза пиримидиновых оснований *de novo* из N_5N_{10} -метилтен-тетрагидрофолата; биосинтез пуриновых оснований из гипоксантина в этих клетках также невозможен в связи с отсутствием ГГФРТ;

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.

Стабильные культуры гибридом способны продуцировать в неограниченном количестве моноклональные антитела. Применение монАТ позволяет определять и разделять субпопуляции клеток, различать отдельные стадии развития клеток, более точно типировать ткани, более точно идентифицировать микроорганизмы, а также более надежно определять иммунологическими методами биологически важные макромолекулы.

Работа 2. Оценка пролиферативной активности лимфоцитов

Лимфоциты – единственный тип клеток крови, для которых пролиферация в периферических тканях является физиологической нормой и **обязательным этапом** в развитии иммунного ответа. Поэтому количественная оценка пролиферативной активности лимфоцитов в спланированных экспериментальных условиях может служить мерой реактивности лимфоцитов на тот или иной внеш-

ний стимул. Если такой внешний стимул – специфический антиген, то уровень пролиферативного ответа лимфоцитов допустимо расценить как *показатель иммуногенности препарата*, содержащего антиген (способности вызывать на себя иммунный ответ), или *численности клон(ов)*, реагирующих на данный антиген лимфоцитов. Существуют вещества, которые называют **митогенами** за их способность вызывать деление клеток: 1. Лектин **фитогемагглютинин (ФГА)** из обыкновенной фасоли *Phaseolus vulgaris*, способный агглютинировать эритроциты только определенного серологического типа. ФГА - сильный митоген, индуцирующий переход клеток из стадии G2 в митоз. В результате появился новый метод оценки пролиферативной активности лимфоцитов человека и экспериментальных животных, получивший название *бласттрансформация*. Оказалось, *ФГА вызывает митотическое деление преимущественно Т-лимфоцитов*.

2. Митогенное действие в отношении Т-лимфоцитов оказывает лектин **конканавалин А**, выделенный из растений семейства бобовых *Canavalia ensiforme*.

3. Митоген (**pokeweed mitogen**) из корня растения лаконоса *Phytolacca americana* стимулирует пролиферацию и В- и Т-лимфоцитов, а кроме того вызывает поликлональную продукцию иммуноглобулинов В-лимфоцитами.

4. Пролиферацию преимущественно В-лимфоцитов вызывают препараты **липолисахаридов (ЛПС)** эндотоксинов из грамотрицательных бактерий.

Методы оценки пролиферативной активности лимфоцитов в культуре *in vitro* рассчитаны на выявление и измерение уникального для клеточного деления процесса – удвоения ДНК в S-фазе митоза. Методов существует несколько:

1. Исторически первый метод – микроскопический (морфологический). Клетки, прошедшие S-фазу, но еще не прошедшие митоз, имеют двойное количество ДНК и остальных компонентов хромосом. Соответственно вся клетка *больше по размеру*, чем неделящиеся клетки, что хорошо видно на препаратах мазков или даже в живой культуре под световым микроскопом. Микроскопический метод детекции клеток в S-фазе называют *«реакцией бласттрансформации»* и в настоящее время используют по крайней мере для *демонстрации бластных и других форм лимфоцитов*. В лабораторной генетике реакцию бласттрансформации лимфоцитов применяют с целью визуализации хромосом и анализа кариотипа человека. Для остановки клеточного цикла на стадии митоза используют **колхицин**.

2. Колориметрический метод. Он основан на использовании *внутриклеточных прижизненных красителей*, включаемых в цепи ДНК. Это, например, МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид.

3. Микроцитометрический метод (FACS). Он основан на использовании *флуоресцентных красителей*, включаемых в цепи ДНК, с оценкой на проточном цитометре.

4. Радиоизотопный метод. Он основан на использовании *меченых нуклеотидов*, включаемых в состав только ДНК, в частности тимидина ($^3\text{H-Td}$) – β -излучатель, уридина $^{14}\text{C-Td}$ – γ -излучатель или ^{131}I -дезоксимуридина – γ -излучатель. «Золотым стандартом» для оценки пролиферации является последний метод - радиоизотопный, поскольку с его помощью подсчитывают не только клетки, находящиеся в данный момент в S-фазе, но и уже поделившиеся дочерние клетки, которые другие названные методы уже «не видят». Опишем кратко **метод оценки пролиферации по включению ^3H -тимидина**:

4.1. Создают экспериментальную систему стимуляции лимфоцитов *in vitro*: это может быть внесение антигена, митогена или других стимулирующих агентов (цитокины, антитела против поверхностных антигенов и др.). Время культивирования лимфоцитов зависит от стимулятора: для митогенов – обычно 72 ч, для антигена – до 6–7 сут.

4.2. За 4–24 ч до остановки эксперимента *in vitro* вводят меченый тимидин. Чаще всего используют метил- ^3H -тимидин. Удельная радиоактивность препарата – около 1–2 Кю/мкмоль. Если удельная активность коммерческого препарата выше, то его разводят «холодным» (т.е. нерадиоактивным) тимидином до заданной величины, чтобы избежать «тимидинового самоубийства» живых клеток. Готовят матричный раствор тимидина в культуральной среде: как правило, его концентрация составляет 20 мКю/мл. Если эксперимент проводят *in vitro* в лунках с объемом 200 мкл, то в каждую лунку вносят по 25 мкл матричного раствора ^3H -тимидина, что создает его рабочую концентрацию 0,5 мКю на лунку. Количество клеток в лунке при этом, как правило, составляет $1\text{--}5 \times 10^5$.

4.3. По завершении культивирования в присутствии ^3H -тимидина клетки удаляют из лунок прибором харвестером на непроницаемые для клеток микропористые фильтры, геометрически соответствующие формату лунок культуральных плашек. Фильтры промывают от неключившегося в клеточную ДНК ^3H -тимидина, после чего сушат при 60–80 °С под инфракрасной лампой или феном.

4.4. Каждый фильтр помещают в индивидуальный флакон с сцинтилляционной жидкостью и в специальном счетчике β -частиц просчитывают число импульсов в минуту (срт) и определяют *индекс стимуляции*. Его значение и является количественным показателем уровня пролиферации исследуемых клеток. Показатели экспериментальных лунок сравнивают с контрольными и рассчитывают статистическую достоверность различий.

Работа 3. Оценка клеточной цитотоксичности

Классический феномен **цитотоксичности** – способность Т-лимфоцитов распознавать клеточные элементы, несущие признаки генетической чужеродности (в частности, клетки, модифицированные вирусом, опухолевые клетки, аллогенные и ксеногенные клетки), и уничтожать их. Основные клетки, обладающие цитотоксичностью, – антигенспецифические цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ), НК (естественные киллеры), а также клетки миелоидного ряда (макрофаги, нейтрофилы). НК-клетки, в отличие от Т-лимфоцитов, распознают как чужеродные клетки организма, утратившие антигены главного комплекса гистосовместимости (молекулы МНС). Другие клетки (например, В-лимфоциты, моноцитарно-макрофагальные клетки, эозинофилы, нейтрофилы и т.п.) также способны к цитотоксичности, но эта функция связана с привлечением антител против клетки-мишени – КМ (антителозависимая клеточная цитотоксичность), цитокинов (ФНО α) и иных агентов. В физиологических условиях, т.е. в норме, цитотоксичность клеток иммунной системы направлена на разрушение и элиминацию стареющих и поврежденных клеток, таким образом обеспечивая клиренс многоклеточного организма от отживших клеток и продуктов их распада.

Цитотоксическая активность клеток-киллеров реализуется при непосредственном синаптическом контакте лимфоцита (клетки-эффектора – КЭ) с КМ. При этом в КМ индуцируется апоптоз. В зрелом дифференцированном цитотоксиче-

ском лимфоците формируются гранулы, содержащие перфорин и гранзимы. После образования синапса между КЭ и КМ гранулы концентрируются в области контакта и затем освобождаются в направлении КМ. Перфорин при контакте с мембраной КМ полимеризуется и встраивается в мембрану, формируя в ней пору диаметром около 100 Å. В эту пору проникают гранзимы – ферменты, инициирующие апоптоз КМ. Индукция апоптоза в КМ также может происходить через CD95 молекулы (другое название Fas), содержащие домен смерти. Лигандом CD95 служит молекула FasL (CD178), экспрессируемая на ЦТЛ, НК-клетках. В некоторых случаях КЭ сами становятся «жертвой» Fas-опосредованного апоптоза. Экспрессируя Fas-молекулы, они могут проконтактировать с клетками, несущими Fas-лиганд, например, при попытке преодолеть гематоэнцефалический барьер. В системе *in vitro* степень разрушения КМ приближается к лизису. Методов оценки функциональной активности ЦТЛ существует несколько, однако «золотым стандартом» до сих пор считается «хромовый тест». Под «хромом» имеют в виду соль хромата натрия, содержащую радиоактивный изотоп хрома – $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, которую используют для мечения КМ. Такую метку подобрали опытным путем как относительно удовлетворяющую следующим критериям: свободно проникать в живые клетки и не выходить оттуда, пока клетка жива. Метка не вступает в прочные соединения с внутриклеточными структурами и имеет возможность выйти во внеклеточную среду из погибающей КМ. Ход работы:

1. 1×10^6 КМ инкубируют в среде, содержащей изотоп $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (37×10^5 Вк или 100 мкКю, специфическая активность 5 мкКю/моль), при 37 °С в течение 1–1,5 ч, после чего тщательно отмывают от не вошедшего в клетки изотопа.

2. КМ подсчитывают и раскапывают в подобранной дозе в лунки культуральных круглодонных микропланшетов.

3. В те же лунки вносят КЭ. Соотношение КМ и КЭ обычно составляет от 1:10 до 1:500 в пользу КЭ.

4. Плашки подвергают мягкому центрифугированию – 150 g в течение 1 мин, после чего помещают в CO_2 -инкубатор при 37 °С на 4–6 ч.

5. По завершении культивирования плашки центрифугируют при 250 g в течение 5 мин для плотного осаждения клеток.

6. Супернатанты собирают в специальные пробирки, в которых радиоактивность подсчитывают в γ-счетчике.

7. В качестве контроля используют:

- а) лунки с КМ, в которые не вносят КЭ, – это контроль спонтанного выхода метки;

- б) лунки с КМ, в которые вместо КЭ вносят детергент Triton X-100 1% (v/v), – это контроль максимально возможного высвобождения метки из КМ.

Цитотоксичность в опытных лунках рассчитывают обычно по следующей формуле:

$$\text{ЦИ} = \frac{\text{СРМ}_n}{\text{СРМ}_{\text{спонтанно}}} \times 100\%,$$

где СРМ – это число импульсов в минуту соответственно в экспериментальных лунках (СРМ_n), в лунках со спонтанным высвобождением метки ($\text{СРМ}_{\text{спонтанно}}$) и в лунках с максимально возможным высвобождением метки (СРМ_{max}).

Работа 4. Оценка функциональной активности фагоцитов

Фагоцитарные клетки – основная группа клеток системы врожденного иммунитета. Они имеют миелоидное происхождение и обладают способностью к фагоцитозу. Ведущая роль в активации фагоцитов отводится паттернраспознающим рецепторам врожденного иммунитета. Ответная реакция развивается быстро, не требует пролиферации и дифференцировки клеток.

Процесс активации обычно подразделяется на два этапа: прайминг и собственно активация. Суть прайминга заключается в том, что предварительная обработка клеток небольшим количеством стимулятора (1-й сигнал), действие которого не вызывает прямую активацию, сопровождается увеличением ответа фагоцитов на второй сигнал. В результате активированные фагоциты выполняют следующие функции: выработка активных форм кислорода (АФК); генерация окиси азота; хемотаксис; фагоцитоз; синтез и секреция цитокинов и других биологически активных медиаторных молекул (метаболитов арахидоновой кислоты, компонентов комплемента, факторов свертывания крови, белков матрикса, ферментов, противомикробных пептидов, гормонов и др.); бактерицидная активность; процессинг и презентация антигена («профессиональными» антигенпредставляющими клетками: дендритными, моноклеарными фагоцитами).

Определение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов

1. Для получения **нейтрофилов** мышам вводят внутрибрюшинно 3–4 мл 2–3% раствора пептона и через 2 ч животных умерщвляют с помощью хлороформа. Их вскрывают в асептических условиях. Из брюшной полости с помощью шприца или пастеровской пипетки отсасывают жидкость, переносят ее в силиконизированные центрифужные пробирки.

2. После центрифугирования пробирок в течение 10 мин при 1000 об/мин осадок ресуспендируют в среде 199, подсчитывают число клеток в камере Горяева и доводят до концентрации $1-2 \times 10^6$ /мл.

3. К клеткам добавляют равный объем бактерий (чаще всего *Staphylococcus aureus*, не содержащий белка А) или опсонизированного зимозана в соотношении 1:10 и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. **Опсонизация** – процесс адсорбции опсонинов на поверхности микроорганизмов и других инородных частиц, который стимулирует и облегчает фагоцитоз данных частиц. Функцию опсонинов могут выполнять антитела или комплемент.

4. Бактерии предварительно должны быть опсонизированы мышьиной сывороткой. Опсонизацию проводят в течение 10 мин при температуре 37 °С с последующим отмыванием.

5. После инкубации готовят мазок на предметном стекле, фиксируют его метанолом 20 мин и красят краской Романовского-Гимзы в течение 30–40 мин.

6. Учет результатов осуществляется микроскопически. В мазке при увеличении $\times 90$ с иммерсионной системой подсчитывают **фагоцитарный индекс** (процент фагоцитирующих нейтрофилов) и **фагоцитарное число** (количество поглощенных бактерии на 1 нейтрофил).

Для изучения фагоцитарной активности **макрофагов** на 3–4-е сутки после введения раствора пептона мышей умерщвляют (в соответствии с современными нормами биоэтики), вскрывают в асептических условиях и вводят внутрибрюшинно 5–8 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки эмбриона коровы. После

легкого массажа брюшной полости жидкость отсасывают. Полость можно промывать средой 199 несколько раз, объединяя в одну все полученные порции. Далее исследование ведется так же, как опыты с нейтрофилами.

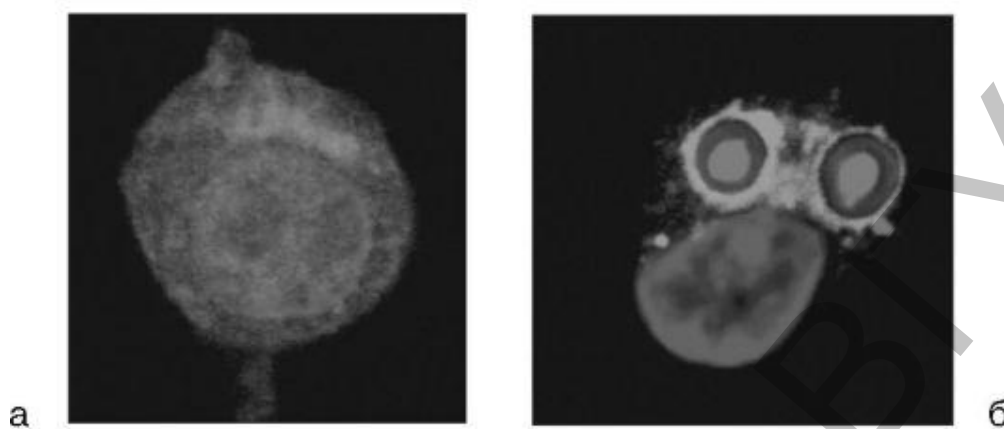


Рис. 1. Фагоцитоз зимозана макрофагом (конфокальная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия): а – интактный макрофаг; б – макрофаг, захвативший зимозан (красный).

Работа 5. **Определение выработки активных форм кислорода и оксида азота**

Исключительно важную роль как в процессах активации фагоцитов, так и в реализации их кислородзависимой бактерицидной функции играют активные формы кислорода (АФК) и оксида азота, образующиеся в процессе кислородного или дыхательного взрыва (элемент окислительного стресса).

В основе дыхательного взрыва лежит усиление потребления глюкозы и ее расщепление с участием NADPH^+ (по механизму пентозофосфатного пути обмена углеводов), сопровождающиеся накоплением NADPH . Взаимодействие NADPH с молекулой кислорода при участии NADPH -оксидазы приводит к генерации супероксидного анион-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), из которого с участием ионов водорода образуются потенциально токсичные для бактерий гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$), перекись водорода (H_2O_2) и синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). Этот процесс начинается спонтанно, после образования фагосомы и перед ее слиянием с лизосомой. Наиболее выраженный бактерицидный эффект реализуется в фаголизосомах. Образование H_2O_2 происходит спонтанно и при участии супероксиддисмутазы. Фермент миелопероксидаза обеспечивает образование гипохлорида из H_2O_2 с участием ионов галогенов. Оксид азота (NO) образуется в результате расщепления аргинина до цитруллина и катализируется NO -синтазой.

Продукцию АФК фагоцитарными клетками определяют методом хемилюминесценции (ХЛ). Как известно, ХЛ-сверхслабое свечение усиливается люминофорами: люминолом и люцигенином. Люминол позволяет идентифицировать образование перекиси водорода и гипохлорной кислоты, люцигенин – супероксидного анион-радикала. При взаимодействии с АФК люминофоры переходят в возбужденное состояние и при возвращении в исходное испускают квант света, который регистрируется хемилюминометром. Имеются данные о корреляции между выработкой АФК и киллингом бактерий фагоцитами.

В качестве объекта исследования можно использовать суспензию лейкоцитов, мононуклеарных клеток или макрофагов перитонеального экссудата экспериментальных животных. Оптимальное количество клеток для регистрации люминолзависимой ХЛ подобрано экспериментально и составляет 1 млн/мл макрофагов и мононуклеарных клеток крови и 2×10^5 /мл лейкоцитов. Для регистрации хемилюминесценции в термостатируемую кювету хемилюминометра ХЛМ-3 помещают: 1 млн клеток; 2,8 мл раствора Хенкса; 2×10^{-5} М люминола («Serva», Германия). Через 3–5 мин регистрируют спонтанную ХЛ. Затем в кювету добавляют 1,43 мкг/мл опсонизированного сывороткой крови человека зимозана («Sigma», США) и регистрируют индуцированную ХЛ.

Затем оценивают интенсивность ХЛ в милливольтках (или в относительных единицах). *Спонтанная ХЛ* показывает уровень выработки АФК клетками в организме. *Индуцированная различными стимуляторами ХЛ* отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на стимул. *Снижение индуцированной ХЛ* может служить одним из признаков нарушения бактерицидной функции фагоцитов. Например, у больных генитальным герпесом спонтанная выработка АФК выше, чем у здоровых доноров. Действие опсонизированного зимозана не стимулирует выработку АФК, она остается на уровне спонтанной выработки и значительно ниже показателей таковой у здоровых доноров, что свидетельствует о снижении противовирусного действия нейтрофилов при генитальном герпесе.

Работа 6. Определение содержания NO в супернатантах культуры фагоцитов *in vitro*

Эффекты NO принято разделять на основные и опосредованные. *Основные* включают те реакции, в которых он непосредственно взаимодействует со специфическими биологическими молекулами, например с гуанилатциклазой, цитохромом P450 и др. *Опосредованные* эффекты связаны не с самим NO, а с реактивными формами азота, образующимися при взаимодействии NO с кислородом или с супероксидным анионом-радикалом. Основные эффекты NO имеют место при низких концентрациях NO (менее 1 мкМ), тогда как побочные (включая образование радикалов) становятся возможными при более высоких концентрациях NO (более 1 мкМ). Оксид азота *in vivo* образуется с участием NO-синтазы (NOS), которая у млекопитающих существует в трех изоформах: nNOS – нейтральная (тип 1); iNOS – индуцибельная (тип 2); eNOS-синтаза – эндотелиальная (тип 3).

В макрофагальных клетках функционирует iNOS, экспрессию которой стимулируют некоторые цитокины и микробные продукты, часто действующие в синергизме. NOS типов 1 и 3 называют также cNOS – избирательная, которая присутствует в клетках и может быть активирована притоком кальция с последующим его связыванием с кальмодулином. В присутствии iNOS оксид азота вырабатывается в больших количествах и часто дает побочные эффекты, такие, как перекисное окисление липидов и гидроксилирование, образование нитрозаминов и нитротирозина.

Для оценки продукции NO перитонеальными макрофагами животных или моноцитами периферической крови человека определяют содержание нитрит-

аниона (NO^{2-}) в супернатанте культивируемых клеток спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса. Для этого 150 мкл культуральной среды переносят из лунки планшета в пробирку и добавляют последовательно 75 мкл 1,5% раствора сульфаниламида и 1N HCl и 75 мкл 0,15% раствора нафтилэтилендиаминдихлорида в дистиллированной воде (компоненты реактива Грисса). Затем доводят объем раствора до 1 мл. После инкубации в течение 10 мин анализируют оптическую плотность раствора на спектрофотометре (например, на СФ-46) при 540 нм, используя в качестве контроля полную среду культивирования с добавлением раствора Грисса. Продукцию NO выражают в микромолях при помощи калибровочного графика.

Работа 7. Оценка киллинга фагоцитов

Наиболее надежный метод оценки завершенности фагоцитоза – микробиологический, заключающийся в измерении числа бактерий, выживших в лейкоцитах после фагоцитоза.

Принцип метода. Для постановки метода готовят взвесь лейкоцитов и опсонизированных микроорганизмов в соответствующих соотношениях. Через определенные промежутки времени лейкоциты разрушают, делают посевы на питательный агар и через сутки подсчитывают число выросших колоний. Лейкоциты здоровых доноров убивают до 80% бактерий за 20–30 мин.

Определение активности миелопероксидазы в лейкоцитах периферической крови. Миелопероксидаза – один из ключевых ферментов фагоцитов, определяющих бактерицидность этих клеток. Сущность метода заключается в добавлении к лизату клеток периферической крови субстрата фермента ортофенилендиамина и перекиси водорода. Развившаяся цветная реакция оценивается по изменению оптической плотности при 492 нм на фотометре. Снижение уровня миелопероксидазы коррелирует с уменьшением бактерицидности нейтрофилов в отношении стафилококков. Особенно снижен уровень этого фермента при хроническом лимфогранулематозе.

Количественная оценка антителообразующих клеток (метод Йерне)

Основной принцип метода локального гемолиза состоит в том, что определенное число клеток лимфоидных тканей (селезенка, лимфатические узлы) мышей, иммунизированных эритроцитами барана, смешивают *in vitro* с эритроцитами барана и расплавленным, но не влияющим на жизнеспособность клеток агаром. Смесь помещают на чашку Петри и после инкубации при 37 °С в присутствии комплемента визуально подсчитывают число зон гемолиза («бляшек») в агаровой пластинке. В центре каждой «бляшки» находится антителообразующая клетка (АОК), представляющая собой плазматическую или лимфобластную клетку. Зная взятое для посева на агар число лимфоидных клеток, можно высчитать количество АОК на фиксированное число кариоцитов (например, на 1 млн или 10 млн) или на целый орган (селезенка).

Прямой способ (принцип описан выше) выявляет АОК, продуцирующие IgM антитела, лизирующие эритроциты в присутствии комплемента.

С помощью **непрямого способа** представляется возможность выявить АОК, продуцирующие IgG антитела (АТ). Для этих целей суспензию клеток дополнительно обрабатывают кроличьей антисывороткой, содержащей АТ против IgG

мышей, на пике выработки IgM-АТ. Антисыворотка, содержащая IgM-АТ против IgG мышей, взаимодействует *in vitro* в агаре с IgG-АТ против эритроцитов барана с присоединением комплемента. Этот комплекс способен лизировать эритроциты. Таким образом, при непрямом методе выявляется сумма АОК, продуцирующих IgM и IgG антитела.

Использование эритроцитов барана, конъюгированных с растворимыми антигенами, дает возможность изучить динамику образования АОК к некорпускулярным антигенам. Метод локального гемолиза в модификации может быть применен для анализа АОК у разных видов животных, а также у человека.

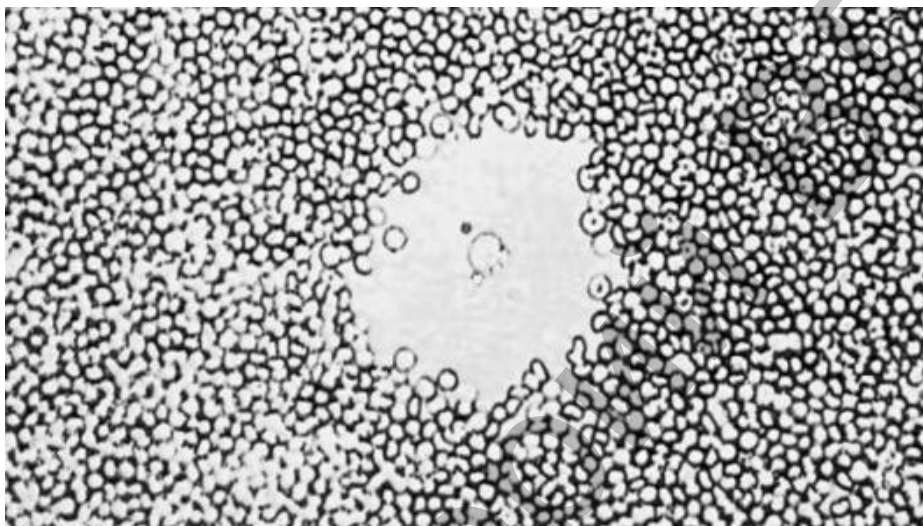


Рис. 2. Непрямой метод Йерне: видна зона гемолиза, в центре АОК.

Впервые метод Н. Йерне позволил выявить **количественные** закономерности динамики антителообразования при первичной и вторичной иммунизации животных. Перечислим указанные закономерности.

Постановка реакции выявления АОК (метод Н. Йерне):

1. Иммунизация мышей эритроцитами барана. Мышей (4 особи) иммунизируют внутривенно 0,5 мл 2% суспензии отмытых эритроцитов барана за 4–5 дней до опыта.
2. Приготовление агара (1,4% раствор). 7 г сухого агара Дифко помещают в колбу с 500 мл дистиллированной воды и расплавляют на водяной бане, постоянно помешивая. Жидкий агар разливают в лотки. После того как агар застынет, его разрезают на кубики 1×1 см, которые заворачивают в марлю и промывают проточной водой в течение 5–7 дней.
3. Перед опытом готовят 0,7% раствор агара. Для этого 10 мл предварительно расплавленного агара (1,4%) смешивают с 8 мл дистиллированной воды и добавляют 2 мл 10-кратного раствора Хэнкса и 2 капли 7,5% раствора бикарбоната натрия (рН 7,0-7,2). Получают 8–10 чашек агара.
4. Агар разливают по пробиркам по 2 мл и хранят в водяной бане при 45 °С (за час до опыта).
5. Чашки Петри помещают в сушильный шкаф (80–90 °С).
6. Готовят 10% взвесь эритроцитов барана (предварительно отмыв их 3 раза физиологическим раствором).

В 1 л *раствора Хэнкса* содержится: NaCl – 8 г, KCl – 0,4 г, CaCl₂×6H₂O – 0,14 г, MgSO₄×7H₂O, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 0,06 г, калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,06 г, MgCl₂×6H₂O – 0,1 г, D-глюкоза – 1 г, феноловый красный – 0,02 г, натрий углекислый кислый – 0,35 г, вода очищенная или вода для инъекций – до 1 л.

Непосредственная постановка реакции:

1. Забивают мышей и фиксируют их на столике.
2. Выделяют селезенку.
3. Готовят суспензию клеток в 3 мл среды 199 и подсчитывают число ядродержащих клеток в суспензии.
4. Готовят разведение клеток с концентрацией 50×10^6 и 10×10^6 в 1 мл.
5. Готовят смесь агара, эритроцитов барана и клеток селезенки. Для этого в пробирки с 2 мл агара, находящиеся в водяной бане при 45 °С, добавляют 0,1 мл 10% суспензии эритроцитов барана и 0,1 мл суспензии клеток (конечная концентрация клеток – 5×10^6 и 1×10^6).
6. Разливают смесь в чашки Петри. Смесь из пробирок выливают на теплые чашки Петри. Быстрыми круговыми движениями смесь равномерно распределяют по дну чашки. Чашки ставят на горизонтальный столик. Дают агару застыть.
7. Инкубируют чашки Петри в термостате при 37 °С в течение 60 мин.
8. Разведение комплемента: сухой комплемент морских свинок разводят средой 199 (на 1 ампулу 5 мл среды, получают 20% раствор).
9. В каждую чашку Петри аккуратно добавляют по 3 мл комплемента.
10. Инкубируют чашки Петри в течение 30 мин при 37 °С.
11. Оценивают реакцию.
12. Подсчитывают число бляшкообразующих клеток на чашку и пересчитывают на 1 млн клеток и на всю селезенку.
13. Микроскопия бляшек: находят бляшку с лизированным участком и бляшкообразующей клеткой в центре.
14. Для улучшения контрастирования бляшек производят окраску препаратов (состав красителя: 10 мл 2% раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте, 10 мл 5% H₂O₂, 80 мл дистиллированной воды).
15. Для сохранения бляшек чашку Петри заливают 10% раствором формалина.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатьева, Г.А. Методические указания к практическим занятиям по иммуноанализам / Г.А. Игнатьева [и др.]. – М., 2006. – 56 с.
2. Ковальчук, Л.В. Система цитокинов, комплемента и современные методы иммунного анализа / Л.В. Ковальчук [и др.]. – М., 2001. – 158 с.
3. Кондратьева, И.А. Практикум по иммунологии / И.А. Кондратьева, А.А. Ярилин. – М.: Academia, 2004. – 272 с.
4. Новиков, Д.К. Медицинская иммунология. – Минск: Вышэйшая школа, 2005. – 301 с.
5. Петров, Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1987. – 414 с.
6. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000. – 430 с.
7. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
8. Brown, T.A. Gen cloning and DNA analysis / Blackwell Publishing. – 2002. – 363 p.

Учебное издание

НОВИКОВ Павел Дмитриевич
ЧИРКИН Александр Александрович

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУНОЛОГИИ

Методические рекомендации

Технический редактор *Г.В. Разбоева*
Компьютерный дизайн *Т.Е. Сафранкова*

Подписано в печать . Формат 60х84¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 3,18. Тираж экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

Лицензия ЛИ № 02330/110 от 30.01.2013.

Отпечатано на ризографе учреждения образования
«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.