

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

П.Д. Новиков, А.А. Чиркин

ПРАКТИЧЕСКИЕ 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 Практические основы иммунологии : методические рекомендации / П.Д. Новиков, А.А. Чиркин. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. – 49 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. Иммунология инфекционного процесса.....	5
1.1. Инфекция. Инфекционные болезни	5
1.2. Иммуитет и инфекция, их взаимоотношения	6
1.3. Механизмы уклонения микроорганизмов от системы иммунологического надзора	8
1.4. Особенности антибактериального иммунитета	10
1.5. Противовирусный иммунитет	11
1.6. Противопаразитарный иммунитет	12
Глава 2. Аллергия, аллергены, механизмы аллергических реакций, псевдоаллергия	12
2.1. Аллергены	13
2.2. Стадии развития аллергических реакций	16
2.3. Классификация аллергии	17
2.4. Повышенная чувствительность немедленного типа	17
2.5. Повышенная чувствительность замедленного типа. Т-клеточные реакции	18
2.6. Псевдоаллергические реакции	18
2.7. Аллергические заболевания	19
Глава 3. Иммунопатология. Врожденные и приобретенные иммунодефициты. Иммунодиагностика	20
3.1. Иммунодефициты (ИД)	20
3.2. Первичные иммунодефициты	20
3.3. Комбинированные иммунодефициты	20
3.4. Т-клеточные иммунодефициты	21
3.5. В-клеточные иммунодефициты	21
3.6. Дефекты системы мононуклеарных фагоцитов и гранулоцитов ..	21
3.7. Недостаточность системы комплемента	22
3.8. Вторичные иммунодефициты	22
3.9. ВИЧ-инфекция	23
3.10. Иммунодефициты при других патологических состояниях	25
3.11. Иммунодиагностика. Оценка иммунного статуса	26
Глава 4. Аутоиммунные (аутоаллергические) заболевания	28
4.1. Патогенез аутоиммунных заболеваний	28
4.2. Толерантность	30
4.3. Особенности запуска аутоаллергических заболеваний	31
4.4. Примеры аутоантител и их эффекты	31
4.5. Диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний	32
4.6. Реакции трансплантационного иммунитета	33
Контрольные вопросы	34
Практикум	35
Цитируемая литература	48

ВВЕДЕНИЕ

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

В методических рекомендациях рассмотрены механизмы противоинфекционного иммунитета, механизмы уклонения микроорганизмов от системы иммунологического надзора, описаны особенности антибактериального, противовирусного, противопаразитарного иммунитета. Представлены данные об аллергии и аллергических реакциях, определены понятия повышенной чувствительности немедленного и замедленного типов. Особое внимание уделено первичным и вторичным иммунодефицитным состояниям. Даны представления о ВИЧ-инфекции. Отдельно рассмотрены вопросы иммунодиагностики и оценки иммунного статуса. Методические рекомендации завершаются описанием аутоиммунных (аутоаллергических) заболеваний.

Изучение практических основ иммунологии является необходимым компонентом общебиологической 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.

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.

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

ГЛАВА 1. Иммунология инфекционного процесса

Инфекция (инфекционный процесс) – патологический процесс в организме, возникающий вследствие взаимодействия между патогенным микроорганизмом и системой иммунитета макроорганизма, сопровождающийся размножением микроорганизма, изменением реактивности макроорганизма, повреждением тканей.

Инфекционный процесс может проявляться на всех уровнях организации биологической системы (организма человека) – молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом, органном, организменном и составляет сущность инфекционной болезни. Собственно инфекционная болезнь – это частное проявление инфекционного процесса, крайняя степень его развития.

1.1. Инфекция. Инфекционные болезни

Для возникновения инфекционного процесса необходимы три основных условия:

- патогенный возбудитель;
- проникновение его во внутренние среды организма;
- восприимчивость макроорганизма.

Причем активность инфекционного процесса, его интенсивность зависят от эффективности действия трех названных условий. Интенсивность инфекционного процесса при первом условии зависит от дозы и вирулентности возбудителя, при втором – от состояния естественных барьеров макроорганизма и места проникновения возбудителя, при третьем – от внутренних и внешних факторов. Место проникновения микроба в организм обозначается как *входные ворота инфекции*.

Инфекционные болезни – это обширная группа заболеваний человека, вызываемых патогенными вирусами, бактериями, риккетсиями и простейшими. Сущность инфекционных болезней состоит в том, что они развиваются вследствие взаимодействия двух самостоятельных биосистем макроорганизма и микроорганизма, каждый из которых обладает собственной биологической активностью. *Инфекционные болезни* – ведущая причина смертности в мире: ежегодно погибает 17 млн человек. Появились новые инфекции – ВИЧ-инфекция, лихорадка Эбола и др. Отмечается активация ранее известных болезней – туберкулеза, гепатитов, малярии и др.

Динамика инфекционного процесса: любое острое заболевание характеризуется последовательной сменой разных периодов: *инкубационный, продромальный, клинический* (разгар болезни), *реконвалесценции* (выздоровление). Каждому периоду свойственны свои особенности: продолжительность, локализация возбудителя в организме, его распространение и выделение в окружающую среду.

Инкубационный период начинается с момента проникновения микроба до появления первых симптомов заболевания. Продолжительность инкубационного периода может составлять от нескольких часов до нескольких месяцев и даже лет при отдельных инфекциях и зависит от быстроты размножения микроба, особенностей токсических продуктов, реактивности организма и других факторов. После инкубационного периода наступает **продромальный период**, когда появляются первые симптомы заболевания, после которого наступает **период**

развития основных клинических симптомов. Клинические проявления инфекционных болезней многообразны. Основными их признаками являются лихорадка, изменение картины крови, нарушение центральной и вегетативной нервной системы, функции органов дыхания, пищеварения и многих других синдромов и симптомов. В **период реконвалесценции** постепенно восстанавливаются физиологические функции макроорганизма. Этот период, как и все остальные стадии инфекционного процесса, неодинаков при различных заболеваниях и имеет различную продолжительность во времени.

Исходы болезни: выздоровление, бактерионосительство, смерть.

1.2. Иммуитет и инфекция, их взаимоотношения

Взаимодействие между человеком и паразитом может либо не иметь последствий, либо привести к колонизации человека паразитом, что проявляется широким спектром клинических вариантов инфекционного процесса:

- а) по тяжести – от субклинического течения инфекции до заболевания с выраженными симптомами, вплоть до молниеносных форм, приводящих к смерти;
- б) по течению – от abortивного до хронического.

Факторы, определяющие форму и течение инфекционного процесса, зависят от микроорганизмов (доза, патогенность, вирулентность и т.д.) и от состояния макроорганизма (возраст, общее состояние здоровья, состояние иммунокомпетентных систем и т.д.).

В основном, способность организма человека противостоять различным микроорганизмам обусловлена двумя механизмами:

- *развитием специфического иммунитета* к отдельным антигенам различных микроорганизмов на основе гуморальных и клеточных факторов;
- *неспецифической противоинфекционной резистентностью*, которая сразу направлена на множество инфекционных агентов.

Неспецифическая резистентность организма к инфекции начинается с физических барьеров: кожи и слизистых оболочек, которые без повреждения непреодолимы для многих, но не для всех, микроорганизмов. Кроме механического барьера, кожа обладает значительными бактерицидными свойствами, которые связаны с выделением молочной и жирных кислот, ферментов, пота, сального секрета и т.д. Слизистые оболочки конъюнктивы глаза, носоглотки, дыхательного, желудочно-кишечного и мочеполового трактов, несмотря на менее прочные механические свойства по сравнению с кожей, обладают не менее выраженными защитными свойствами за счет наличия таких «анатомических ловушек», как носовая полость, которая очищается механически благодаря ресничкам и обильного выделения секрета. Слезы и секреты, выделяемые слизистыми, слюнными и пищеварительными железами, не только смывают микроорганизмы с поверхности слизистых оболочек, но и оказывают существенное бактерицидное действие за счет содержащихся в них лизоцима, различных ферментов, кислой рН желудочного содержимого, нормальной микрофлоры организма и др. Большое значение в неспецифической защите организма от патогенных микроорганизмов имеет фагоцитоз. Важную роль для обеспечения функционирования неспецифических защитных механизмов играют сбалансированное питание и витаминная обеспеченность организма. Существенное влияние оказывают неблагоприятные

воздействия на организм: переутомление, физические и психические травмы, хроническая алкогольная интоксикация и т.п. Неспецифическая защита организма в значительной мере контролируется генетическими механизмами, которые обеспечивают видовой иммунитет – невосприимчивость организмов одного вида к инфекционным заболеваниям другого вида, вследствие исключения возможности размножения возбудителей. Имеются данные о генетически наследуемой невосприимчивости в отдельных популяциях людей к ряду инфекционных заболеваний (малярия, туберкулез, корь, полиомиелит и др.).

Другим важнейшим компонентом в защите макроорганизма от инфекционных агентов является *специфический иммунитет*. Защита от инфекций – одна из важнейших функций иммунной системы. Иммунный ответ определяет варианты течения того или иного инфекционного заболевания.

Специфический иммунный ответ развивается в макроорганизме против антигенов возбудителя, его токсинов и других продуктов жизнедеятельности или против антигенов вакцин и анатоксинов. В результате такого взаимодействия иммунокомпетентные клетки макроорганизма, в первую очередь макрофаги, распознают чужеродные антигены уже в местах первичного внедрения и запускают сложный механизм формирования специфически реагирующих клонов эффекторных Т- и ЕК-клеток, а также В-лимфоцитов и плазматических клеток, синтезирующих специфические эффекторные иммуноглобулины (антитела) вначале класса М, затем G, А, Е и др. В зависимости от химической природы антигенов возбудителя, внутри- или внеклеточной его локализации и других факторов, механизм санации макроорганизма может происходить с преобладанием клеточного (Т) или гуморального (В) компонентов иммунитета. После элиминации возбудителя клоны эффекторных и секретирующих иммуноглобулины клеток под воздействием супрессорных Т-лимфоцитов уменьшаются до некоего минимального количества и вместе с долгоживущими клетками памяти составляют морфологический субстрат длительного, а при отдельных инфекциях пожизненного иммунитета.

При *повторной* встрече макроорганизм за счет даже небольшого количества циркулирующих антител и эффекторных клеток, а также способности быстрого их увеличения с привлечением *клеток памяти* способен нейтрализовать возбудителя. Феномен *развития иммунологической памяти* после первичной встречи с антигенами возбудителя лежит в основе применения вакцин и анатоксинов, а феномен усиления иммунологической памяти после повторных встреч с антигенами используется при *ревакцинации* – повторном введении вакцин с целью поддержания достаточно напряженного иммунитета в течение длительного времени.

Наличие специфического иммунитета у части компактно проживающего населения (коллектива) называется *иммунологической прослойкой населения* и составляет основу **коллективного иммунитета**. Считается, что иммунологическая прослойка 80% достаточна для прекращения эпидемического распространения самых контагиозных инфекционных заболеваний. Однако в связи с тем, что не все вакцинированные отвечают достаточным иммунитетом, на практике для прекращения эпидемического процесса при различных инфекциях требуется прививать 95 и более процентов населения. Для объективного контроля за индивидуальным и коллективным иммунитетом используют определение титров протективных антител.

1.3. Механизмы уклонения микроорганизмов от системы иммунологического надзора

Все микроорганизмы различаются по своей способности вызывать инфекционный процесс у человека или животных, т.е. по патогенности.

Патогенность или **болезнетворность** является видовым признаком и представляет собой потенциальную возможность микроорганизма вызывать заболевание в чувствительном к нему макроорганизме. Патогенность специфична по проявлениям инфекционного процесса, закреплена генетически и обуславливается способностью микроорганизмов образовывать токсины, ферменты агрессии и рецепторы к клеткам-мишеням.

Вирулентность – степень патогенности, является индивидуальным фенотипическим признаком каждого отдельного штамма патогенного микроорганизма и измеряется минимальными смертельными дозами (DLM или LD 50). Высоковирулентные микроорганизмы даже в малых дозах могут вызывать заболевания со смертельным исходом у иммунологически здоровых индивидуумов, а условно-патогенные – лишь при иммуносупрессивных состояниях и большой дозе инфекта. Вирулентность патогенных микроорганизмов связана со способностью избирательно прикрепляться к чувствительным клеткам хозяина (*адгезия*), размножаться на их поверхности (*колонизация*), проникать в эти клетки (*пенетрация*) или подлежащие ткани (*инвазия*), преодолевать неспецифические и специфические факторы иммунитета (*агрессия*), а также со способностью образовывать экзотоксины (*токсигенность*).

Первые этапы инфекционного процесса – феномены *адгезии* и *колонизации* обусловлены рядом неспецифических (гидрофобность микробных клеток) и специфических факторов (наличие специфических детерминант на поверхности микроорганизмов и рецепторов к ним на клетках-мишенях). Специфичность взаимодействия микроорганизмов с рецепторами на поверхности клеток обуславливает тропность отдельных возбудителей к определенным органам и тканям. Она определяет основные пути проникновения (входные ворота) и механизм передачи инфекции. Так широкий ряд бактерий и вирусов имеет специфические *адгезины* к рецепторам эпителия дыхательных путей и могут распространяться только с помощью аэрогенного механизма передачи (респираторная группа инфекций).

По основным путям проникновения или механизму передачи возбудителей инфекционные заболевания можно разделить на четыре основные группы:

- желудочно-кишечные;
- дыхательных путей;
- наружных покровов (кожи и слизистых);
- кровяные (трансмиссивные).

От места входных ворот зависит клиническая картина заболевания. Так, если чумный микроб проникает через кожу, развивается бубонная или кожно-бубонная форма, через дыхательные пути – легочная.

Из входных ворот возбудитель распространяется различными путями. В одних случаях он попадает в лимфатические сосуды и током лимфы разносится по органам и тканям (*лимфогенный путь распространения*). В других случаях возбудитель распространяется с током крови (*гематогенный путь распростра-*

нения). Проникновение и циркуляция микробов, вирусов, риккетсий или паразитов в крови называется соответственно: *бактеремией* (брюшной тиф), *вирусемией* (СПИД), *риккетсемией* (сыпной тиф) или *паразитемией* (малярия). Микроорганизмы могут оставаться на месте входных ворот и действовать на макроорганизм посредством продуцируемых ими экзотоксинов (дифтерия, столбняк, ботулизм и др.).

Многие возбудители инфекционных заболеваний размножаются внутриклеточно и способны распространяться в межклеточном пространстве различных органов, в связи с чем очень важными компонентами вирулентности являются *пенетрация* и *инвазия*, которые, как правило, связаны со способностью микроорганизмов продуцировать ферменты, вызывающие повреждение стенки живых клеток и волокон тканей: гиалуронидазу, нейраминидазу, протеазы и др.

Собирательный фактор вирулентности – *агрессия* определяется способностью микроорганизмов подавлять неспецифическую и иммунную защиту организма с помощью специальных веществ различной природы, встроенных в поверхностные структуры стенки (белок А стафилококка, белок М гемолитического стрептококка, липополисахариды грамотрицательных бактерий, корд-фактор возбудителя туберкулеза, H-, O- и Vi-антигены энтеробактерий и др.), а также специальных ферментов или токсических метаболитов, которые разрушают и инактивируют иммуноглобулины, комплемент, лизоцим, интерфероны и другие гуморальные и клеточные компоненты иммунитета или усиливают первичное действие микробов, способствуя дальнейшему развитию инфекционного процесса (коагулаза, свертывающая плазму крови, фибринолизин, способствующий растворению сгустков фибрина и др.).

Токсическое действие микробов обусловлено синтезом ими *экзо- и эндотоксинов*.

Экзотоксины продуцируются в основном *грамположительными* микробами, например возбудителями дифтерии, столбняка, ботулизма, газовой гангрены, и выделяются во внешнюю среду. По химической природе они являются белковыми веществами, обладающими ферментативными свойствами и избирательно поражающими отдельные органы и ткани, что находит отражение в клинических симптомах заболевания. Экзотоксины изменяют обмен веществ, нарушают окислительный цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), вызывают выраженные явления интоксикации, сопровождающиеся нарушением деятельности физиологических систем: нервной, эндокринной, дыхательной, сердечно-сосудистой, кроветворной и др. Например, экзотоксин возбудителя столбняка избирательно блокирует холинергические структуры двигательных центров спинного и продолговатого мозга, а холероген и некоторые энтеротоксины активируют аденилатциклазу энтероцитов, что приводит к увеличению выхода жидкости в просвет кишечника и диарее. Некоторые экзотоксины (энтеротоксины и др.) являются суперантигенами (см. выше) и вызывают поликлональную активацию лимфоцитов с выделением цитокинов. По механизму действия токсины можно разделить на четыре основных типа:

- **«цитотоксины»**, блокирующие синтез белка на субклеточном уровне и вследствие этого гибель клеток (дифтерийный гистотоксин, дермонекротоксин и др.);
- **«мембранотоксины»**, повышающие проницаемость клеточных мембран и вы-

- зывающие лизис эритроцитов (гемолизины), разрушение лейкоцитов (лейкоцидины) и т.п.;
- «**функциональные блокаторы**», блокирующие передачу нервных импульсов в клетках спинного и головного мозга (нейротоксины столбняка и ботулизма) или блокирующие отдельные ферментные системы (сибиреязвенный и чумный токсины, блокирующие аденилатциклазу);
 - «**эксфолиатины**» и «**эритрогенины**», влияющие на взаимодействие клеток между собой и с межклеточными веществами.

Многие бактерии могут синтезировать не один, а несколько разных токсинов. Большинство известных экзотоксинов, в первую очередь белковых, вызывает иммунный ответ со стороны макроорганизма и нейтрализуется соответствующими антителами (антитоксинами).

Эндотоксины тесно связаны с микробной клеткой и освобождаются только при ее разрушении. Содержатся они преимущественно в грамотрицательных микробах. По химической природе относятся к глицидолипидно-протеиновым комплексам или к липополисахаридам. Наряду с названием «эндотоксины бактерий» в качестве синонима можно использовать химическое название – *липополисахарид* (ЛПС). Липополисахаридные эндотоксины, в отличие от белковых экзотоксинов, более устойчивы к повышенной температуре и вызывают однотипную реакцию, не зависящую от того, из каких грамотрицательных бактерий они происходят. Большие дозы вызывают угнетение фагоцитоза, выраженный токсикоз вплоть до токсико-септического шока с падением сердечно-сосудистой деятельности и понижением температуры тела.

К факторам вирулентности относится также «**антигенная мимикрия**» – *наличие у возбудителей общих антигенов с антигенами человека, что приводит к уклонению отдельных паразитов от иммунологического надзора хозяина*. В процессе естественного отбора выжили макроорганизмы, способные противостоять за счет своих неспецифических и специфических средств защиты всему спектру микроорганизмов-паразитов, и микроорганизмы, способные паразитировать в организме хозяев, но не приводить к их гибели. Гибель хозяев, как правило, является биологическим тупиком для паразитирующего в нем клона микроорганизма. Тяжелое течение инфекционного процесса или фатальный для хозяина исход может наблюдаться при снижении уровня неспецифической защиты и иммунологической реактивности хозяина, большой дозе и высокой вирулентности возбудителя, а также при неестественных путях его проникновения.

Хронизация инфекционного процесса, как правило, определяется несостоятельностью иммунологического ответа к возбудителю. Обязательным условием развития инфекционных заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, является *иммуносупрессивное состояние хозяев*.

1.4. Особенности антибактериального иммунитета

При отдельных бактериальных инфекциях, где имеется продукция экзотоксинов, и они играют важное значение в патогенезе, определяющим является не антибактериальный, а антитоксический иммунитет (дифтерия, столбняк, ботулизм и др.). При этом ведущее значение в нейтрализации токсинов играют **антитела**. Молекула антитела, присоединившись вблизи активного центра токси-

на, может стереохимически блокировать его связь с субстратом. В комплексе с антителами токсин теряет способность к диффузии в тканях и может стать объектом фагоцитоза. Основным механизмом антибактериальной защиты является фагоцитоз. В иммунном организме эффективность фагоцитоза повышается за счет опсонизирующего действия специфических антител, взаимодействующих Fab-фрагментами с антигенами на поверхности бактерий и одновременно Fc-рецепторами на мембранах фагоцитов. Это приводит к окислительному взрыву и активации других бактерицидных систем фагоцитирующих клеток. Активация системы комплемента комплексами антитела-бактерии приводит к разрушению липопротеиновых оболочек грамотрицательных бактерий, а также к высвобождению анафилотоксинов, которые стимулируют дополнительный приток из плазмы крови гуморальных компонентов иммунитета и вызывают хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов, осуществляющих фагоцитоз. Некоторые бактерии уклоняются от контактов с фагоцитирующими клетками, прикрепляясь к поверхности слизистых оболочек и заселяя их. Функцию защиты слизистых оболочек выполняет секреторный IgA.

Во всех секретах IgA, связавшись с бактериями или другими микроорганизмами, предотвращает их адгезию к поверхности слизистой. Повышенной устойчивостью к гибели после фагоцитоза отличаются *внутриклеточно паразитирующие бактерии*: микобактерии туберкулеза, бруцеллы, сальмонеллы и др., а также риккетсии, хламидии и микоплазмы. Их способны убить лишь активированные лимфокинами макрофаги и цитотоксические клетки: Т-киллеры, и НК-клетки. Поэтому напряженность антибактериального иммунитета при таких инфекциях определяется не гуморальным, а клеточным иммунитетом.

1.5. Противовирусный иммунитет

Вирусные инфекции с иммунологической точки зрения отличаются от бактериальных и протозойных тем, что *генетическая информация вируса тесно связывается с геномом инфицированной клетки*. Сами вирусы могут обладать цитопатическим действием или персистировать в клетках хозяина, не повреждая их. Иммунные реакции на внедрение вирусов могут быть различными: уничтожение или инактивация самого вируса, без разрушения зараженных вирусом клеток; разрушение модифицированных вирусом клеток хозяина с тяжелыми повреждениями органов и тканей; неэффективность элиминации вируса, но повреждение органов и тканей хозяина; отсутствие реакции на латентную персистенцию вирусов. Некоторые вирусы паразитируют непосредственно в клетках иммунной системы, повреждая ее и вызывая иммуносупрессию не только относительно своих антигенов, но и относительно других возбудителей инфекционных заболеваний (цитомегаловирус, вирус иммунодефицита человека и др.). Основу противовирусного эффекта составляют клеточные компоненты иммунной системы и система интерферонов. Однако специфические антитела против вирусных антигенов, даже в низких концентрациях, способны нейтрализовать вирус на этапе проникновения его через входные ворота в кровь до фиксации на клетках-мишенях (IgG, IgM) или при первичном попадании его на эпителий слизистых (IgA).

Вирусы уклоняются от действия иммунной системы, изменяя антигенные свойства поверхностной оболочки. Точечные мутации вызывают небольшие из-

менения (антигенный дрейф), а существенные изменения, приводящие к эпидемиям, могут возникать в результате обмена генетическим материалом с другими вирусами, имеющими иных хозяев (антигенный шифт).

1.6. Противопаразитарный иммунитет

При протозойных инвазиях, когда возбудитель находится в крови (малярия, трипаносомозы), напряженность иммунитета определяют гуморальные факторы, а когда паразиты размножаются в тканях – клеточные. Однако простейшие, несмотря на значительно большую по сравнению с вирусами и бактериями величину, в процессе эволюции выработали множество механизмов уклонения от иммунологического надзора хозяина. Например, африканские трипаномы и многие другие характеризуются высокой изменчивостью поверхностных антигенов в процессе паразитирования у одного хозяина. Возбудители лейшманиоза, малярии, токсоплазмоза успешно размножаются в присутствии антител. Иммунитет при протозойных инвазиях, как правило, носит «нестерильный» характер, т.е. обеспечивается латентным персистированием паразитов. В нем участвуют эозинофилы, которые привлекаются хемотаксическими продуктами паразитов. Имея на поверхности Fc-рецепторы, эозинофилы могут связываться с антителами, опсонизирующими паразитарные антигены. При этом они выделяют цитокины (основной белок эозинофилов и др.).

Хроническая персистенция антигенов паразита на фоне иммунного ответа может вызывать повреждение тканей в результате иммунопатологических реакций, таких как нефротический синдром, обусловленный иммунными комплексами, грануломатоз печени и аутоиммунные болезни сердца. Вызываемое паразитами иммуносупрессивное состояние повышает чувствительность организма к бактериальным и вирусным инфекциям.

ГЛАВА 2. Аллергия, аллергены, механизмы аллергических реакций, псевдоаллергия

Аллергия – это специфическая повышенная вторичная иммунная реакция на аллерген, которая сопровождается повреждением тканей.

Специфичность аллергической реакции зависит от наличия в организме антител (обычно иммуноглобулинов класса E или, реже, IgG) а также иммунных T-лимфоцитов к определенному аллергену. Они появляются после первого контакта с антигеном и уровень их увеличивается при новых контактах. Аллергия развивается не сразу, а через определенный период *сенсibilизации* – это время с момента первого контакта с антигеном до момента возникновения способности организма отвечать повышенной аллергической реакцией на новый контакт с ним. *Период сенсibilизации* длится от нескольких дней до нескольких месяцев, в течение которых развивается иммунная реакция и появляются антитела и сенсibilизированные T-лимфоциты. В результате аллергической реакции выделяется большое количество биологически активных веществ – медиаторов аллергии, которые повреждают ткани и обуславливают клинические проявления аллергии.

Наследственная, генетическая предрасположенность определяет развитие аллергии на конкретный аллерген. Гены, ответственные за аллергию, локализируются в 5-й и 11-й хромосомах. Они контролируют синтез ИЛ-4 и других цитокинов, участвующих в аллергических реакциях. У аллергенов активность «проаллергических» генов повышена, что приводит к избыточной продукции цитокинов воспаления.

2.1. Аллергены

Аллергены – это антигены или гаптены, которые при повторном проникновении в сенсибилизированный организм вызывает аллергическую реакцию.

Аллергены вызывают аллергию, присутствуя в очень низких концентрациях (ниже предельно допустимых концентраций вредных веществ в промышленности). Суммарная доза аллергенной пыли, полученной больным за период цветения растения, может составлять 1 мкг.

Различают *неинфекционные* и *инфекционные* аллергены.

К *неинфекционным* относятся: вещества растений (пыльца – пыльцевая аллергия, плоды – пищевая аллергия); животных и птиц – пищевые аллергены (молоко, яйцо), эпидермальные (шерсть, перо); бытовые аллергены – домашняя пыль (постельные клещи – дерматофагоиды, библиотечная пыль, шерсть домашних животных, синтетические изделия и др.); лекарственные и медикаментозные – практически все лекарства и медикаменты; аллергены насекомых (яды и др.); профессиональные – различные химические вещества (в том числе синтетические изделия), лаки, краски, неорганическая и органическая пыль, аэрозоли веществ.

Инфекционными аллергенами могут служить антигены бактерий, грибов, вирусов и простейших.

В группу *бытовых аллергенов* обычно включают домашнюю и библиотечную пыль, перо подушек. Однако состав бытовых аллергенов очень широк и во многом зависит от особенностей каждой конкретной квартиры, ее обстановки, наличия в ней животных, птиц, аквариумных рыб, ковровых изделий, различных химических веществ, увлажнителей и кондиционеров воздуха, способствующих появлению грибов и бактерий.

Домашняя пыль – гетерогенная по составу группа аллергенов. В нее входят аллергены постельных клещей рода дерматофагоидов, вещества животного (эпидермис животных и человека, аллергены слюны и секретов животных) и растительного происхождения (хлопковые волокна, библиотечная пыль), продукты жизнедеятельности и гибели насекомых, бактерий, грибов и др. Важнейшей составной частью домашней пыли являются экскременты и продукты распада постельных клещей – дерматофагоидов (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*). Количество клещей определяют микроскопически и по уровню гуанина – продукта их жизнедеятельности. В домашней пыли выявлено более 35 видов клещей, а в 1 г ее может содержаться несколько тысяч особей. Это микроскопические клещи размером 0,1–0,3 мм, образующие колонии преимущественно в старых матрасах. Оптимальная температура для жизнедеятельности 25°C, относительная влажность – 70–80%. Пика численность клещей достигает в сентябре-октябре, количество живых особей уменьшается зимой, а в марте-апреле снова увеличивается.

Периоды обострения респираторных аллергических заболеваний нередко совпадают с пиками вегетации клещей. Их аллергены индуцируют не только астму, риниты, но и атопические дерматиты, крапивницу.

Эпидермальные аллергены животных – нередкая составная часть домашней пыли. Они имеют самостоятельное значение и могут быть профессиональными аллергенами. Причиной заболевания служит контакт с животными, содержащимися в квартире (кошки, собаки и др.), или уход за домашними (коровы, лошади, овцы, кролики и др.) и лабораторными (мыши, крысы) животными. Аллергенами являются шерсть и перхоть животных. Шерсть овцы попадает в домашнюю пыль из ковров, изделий из шерсти, обивки мебели.

Перья домашних птиц вызывают аллергию как бытовой аллерген (подушки, комнатные птицы) и как профессиональный – у рабочих птицефабрик. Активные фракции стойки к действию трипсина, в составе их могут быть аллергены клещей.

Аллергенами *растительного происхождения* могут быть пыльца растений, их семена, листья, стебли и корни, используемые для различных нужд.

Пыльцевые аллергены являются основной причиной поллиноза. Составные части растений нередко выступают как пищевые, производственные или бытовые аллергены. Высокоаллергенен фиалковый корень, зеленые водоросли, используемые в косметике и парфюмерной промышленности (пудры, духи, кремы и др.). Сильные аллергены – семена хлопка, льна, клещевины обыкновенной и продукты их переработки, входящие в состав пищевых продуктов, а также применяемые в промышленности масла, краски, чай, линолеум и т.д. Стебли и листья растений содержат ряд веществ (лактонов), вызывающих контактные аллергические реакции (крапивницу, дерматит).

Химические аллергены широко распространены в окружающей среде, на производстве и в быту. Это могут быть простые, но высокоактивные вещества, выступающие в роли гаптенных, или более сложные макромолекулы, способные индуцировать иммунный ответ. Не являясь полноценными антигенами, гаптены соединяются с биологическими молекулами (белками, аминокислотами и др.) и создают полноценные аллергены. Механизм действия химических соединений включает токсические, аллергические, псевдоаллергические и метаболические эффекты, а также их сочетания.

В этиологической значимости аллергических заболеваний отмечена большая роль медикаментозных аллергенов, особенно у медработников, фармацевтов, рабочих заводов медпрепаратов. Практически *любой медикаментозный препарат* может стать причинно значимым аллергеном. Наиболее часто провоцируют формирование астмы антибиотики, производные йода, салициловой кислоты, другие противовоспалительные препараты, витамины.

Инсектные аллергены содержатся в яде, слюне и теле насекомых, поэтому они могут вызывать реакции различными путями: 1) ядом при ужалении перепончатокрылыми (отряд *Hymenoptera*); 2) слюной при укусах двукрылыми (отряд *Diptera*) и клопами (отряд *Hemiptera*); 3) при контакте с выделениями и частями тела особей отрядов чешуекрылых (*Zepdoptera*), ручейников (*Trichoptera*); 4) при ингаляции частиц и веществ погибших насекомых (отряд *Diptera*, *Hymenoptera* и др.). Наиболее распространена аллергия к яду перепончатокрылых, частота которой среди населения составляет 0,4–4 %.

Сила реакции зависит от степени сенсibilизации и пути поступления аллергена. *Различают местные и системные реакции.* В месте ужаления возникают, отек и гиперемия кожи диаметром не менее 10 см, которые держатся более 24 часов, сопровождаясь выраженным зудом. Опасным является прогрессивно нарастающий отек в полости рта и горла. Системные аллергические реакции бывают легкими, средней тяжести и тяжелыми, в том числе возможно развитие анафилактического шока.

К наиболее распространенным *пищевым аллергенам* относят молоко, рыбу и рыбные продукты, яйца, мясо различных животных и птиц, злаки, бобовые, орехи, овощи и фрукты. Наряду с аллергическими реакциями на пищу, возможно, развитие *псевдоаллергических реакций*. Наиболее часто такие реакции развиваются после употребления продуктов, богатых гистамином (ферментированные сыры, вина, квашеная капуста, ветчина, свиная печень, филе сельди), тирамином (сыры: рокфор, камамбер, чеддер, плавленый и др., пивные дрожжи, маринованная сельдь), гистаминолибераторами.

Нередко причиной развития реакции является не сам продукт, а *пищевые добавки* – химические вещества, вносимые для улучшения вкуса, запаха, цвета и др., увеличивающие сроки хранения продуктов. Пищевые добавки включают: красители, консерванты, ароматизаторы, эмульгаторы, ферменты, бактериостатические вещества, консерванты и др.

Группу *аллергенов инфекционного происхождения* составляют бактериальные, грибковые и вирусные продукты. К ним относят и паразитарные аллергены. Особенность этой группы экзогенных аллергенов заключается в том, что сенсibilизация к ним может возникать как вследствие инфекционного процесса, так и без него, в результате проникновения в организм сапрофитных форм микробов, спор грибов, их фрагментов. Поэтому сенсibilизация к этой группе аллергенов может быть следствием двух разных процессов: инфекционного, при котором нередко необходима стимулирующая иммунотерапия, и «чистого», инфекционно-аллергического, по существу близкого атопическому механизму. Различия между ними в том, что инфекционно-зависимые процессы, как правило, обусловлены истинными иммунодефицитными состояниями, тогда как инфекционно-аллергический отражает обычную аллергию.

Другая особенность сенсibilизации к данной группе аллергенов заключается в том, что она встречается без клинических проявлений даже у здоровых лиц как следствие поствакцинальной аллергии или перенесенных ранее инфекционных заболеваний. Примерно у 1/3 здоровых людей наблюдаются положительные кожные реакции на аллергены условно-патогенных микроорганизмов. Возникает проблема диагностической значимости такой сенсibilизации и правомерности применения диагностических провокационных проб. Отличить поствакцинальную аллергию от «истинной» патологической, клинически манифестной, трудно, особенно при сочетании той и другой. Бактериальная аллергия, возникающая на фоне хронической инфекции, индуцируемой условно-патогенными микроорганизмами, тесно связана с иммунодефицитом, так как рецидивирование такой инфекции уже предусматривает в качестве необходимого условия недостаточность иммунореактивности.

Аллергены *грибов* широко распространены и являются причиной микотической аллергии. Грибы могут аллергизировать организм двумя, путями:

1) в связи с микотическими поражениями кожи и органов, 2) как сапрофиты, наиболее часто при вдыхании их спор или при поступлении в ЖКТ с пищей. Спорами из воздуха чаще сенсibilизируют альтернария, пенициллы, аспергиллы, мукор, ризопус, кандиды. Высоко-сенсibilизирующими свойствами обладают плесневые грибы, которые нередко обсеменяют растения. Кроме того, споры грибов могут встречаться в домашней пыли. Нередко вегетация грибов сопровождает различные технологические и микробиологические процессы, в частности белково-витаминное производство, когда дрожжеподобные грибы могут вызывать сенсibilизацию рабочих. Спор грибов много в воздухе мукомольных (аспергиллы, альтернарии и др.), текстильных (аспергиллы, пенициллиум, фузариум) и кожевенных (мукор, пенициллиум) предприятий.

Бактериальная и грибковая сенсibilизация нередко сочетаются, причем и та и другая проявляются немедленными и замедленными реакциями. Реакции немедленного типа, возможно, чаще индуцируют полисахаридные комплексы грибов, а замедленные – преимущественно белковые аллергены.

Аллергены гельминтов. При паразитировании в организме гельминты выделяют вещества, вызывающие аллергические реакции немедленного и замедленного типа. Сенсibilизация организма хозяина зависит от стадии развития паразита, массивности заражения, локализации очага инвазии. Повторное поступление антигенов паразитов индуцирует аллергические реакции в виде сыпей или эозинофильных инфильтратов, в том числе легочных (синдром Леффлера). Характерна высокая эозинофилия крови. Более аллергенны продукты личинок, чем взрослых особей, так как личинки в процессе гибели выделяют много алергизирующих веществ, обычно белково-полисахаридных комплексов. Введение небольшого количества водного экстракта гельминта стимулирует образование антител класса IgE, и у зараженных их уровень в несколько раз выше, чем в норме.

Аллергены вирусов. Реакции ПЧНТ и ПЧЗТ развиваются на вирусы, их ферменты и на комплексные антигены – модифицированные вирусом тканевые компоненты, в частности белки клеточных мембран. Вирусные инфекции сопровождаются комплементзависимым лизисом и освобождением внутренних вирусных антигенов, участвующих в образовании иммунных комплексов. Вирусы могут индуцировать «дыхательный взрыв» в нейтрофилах, ферменты которых повреждают ткани.

2.2. Стадии развития аллергических реакций

Иммунологическая, при которой происходит специфическое взаимодействие аллергена с антителами или сенсibilизированными Т-лимфоцитами.

Патохимическая, медиаторная – сопровождается выделением медиаторов аллергии.

Патофизиологическая, в которой медиаторы повреждают органы и ткани и наблюдаются клинические проявления аллергии.

Основными участниками аллергических реакций являются лейкоциты (Т- и В-лимфоциты, моноциты-макрофаги, гранулоциты), система комплемента, другие клетки и гуморальные факторы.

2.3. Классификация аллергии

По механизму развития аллергические реакции делятся на два вида: *немедленные аллергические реакции* и *замедленные аллергические реакции*.

Немедленные аллергические реакции зависят от наличия антител различных классов к аллергену, развиваются быстро: от нескольких секунд (анафилактический шок) до 3–12 часов (крапивница), а чаще всего через 30 минут – 2 часа. Это повышенная чувствительность немедленного типа (ПЧНТ). К реакциям немедленного типа относятся *анафилактические, цитотоксические, иммунокомплексные реакции*.

Реакции, развивающиеся через 8–24 часов после контакта с аллергеном, называют отсроченными, «поздними».

Замедленные аллергические реакции развиваются через 24–72 часа и обусловлены взаимодействием аллергена с сенсibilизированными Т-лимфоцитами – это повышенная чувствительность замедленного типа (ПЧЗТ).

2.4. Повышенная чувствительность немедленного типа

I тип: анафилактические реакции (реагиновые, IgE-зависимые).

На этапе сенсibilизации под влиянием аллергена образуются специфические IgE-антитела, которые фиксируются своими Fc-фрагментами на мембранах базофилов. При повторном попадании аллерген взаимодействует с Fab-фрагментами двух расположенных рядом молекул IgE (*иммунологическая стадия*). В результате происходит активация базофила. Гранулы базофила передвигаются по направлению к периферии клетки и покидают ее через поры мембраны. Процесс дегрануляции не сопровождается разрушением мембраны и базофил сохраняет свою жизнеспособность. После этого начинается *патохимическая стадия*. Из гранул базофила освобождается гистамин, лейкотриены, тромбоцитарноактивирующий фактор, серотонин, факторы хемотаксиса эозинофилов и нейтрофилов. Эти клетки в свою очередь выделяют вторичные медиаторы. Выделившиеся медиаторы приводят к сокращению гладкой мускулатуры, усилению секреции бронхиальной слизи, увеличению сосудистой проницаемости (*патофизиологическая стадия*). *Клиническая картина* может сопровождаться анафилактическим шоком, приступом бронхиальной астмы, ринитом, конъюнктивитом, крапивницей и др.

II тип. Цитотоксические реакции.

Эти реакции возникают при взаимодействии антител класса IgG или IgM с антигеном или гаптеном, которые связаны с мембраной клетки. Так как антитела взаимодействуют с антигенами на клетках своими Fab-фрагментами, то Fc-фрагменты остаются свободными и активируют систему комплемента. В процессе активации комплемента образуется цитотоксический мембраноатакующий комплекс, разрушающий клетку-мишень. Антигенами могут быть лекарственные препараты, химические вещества, бактериальные, вирусные антигены, аутоантигены.

Помимо комплементзависимых, существуют цитотоксические реакции без участия комплемента. Лизис клетки, покрытой антителами, могут вызывать льюбые лейкоциты, которые несут соответствующий Fc-рецептор, связывающийся с Fc-фрагментом антитела.

Цитотоксический тип реакции играет важную роль в иммунитете при защите организма человека от *бактерий, вирусов, опухолевых клеток*. Примером патологии, протекающей по данному типу реакции, могут быть гемолитическая анемия, при этом *антигеном-аллергеном* становятся молекулы-адгезины мембраны эритроцита, связанные с гаптенем. При развитии лекарственной аллергии по цитотоксическому типу отмечаются тромбоцитопения, лейкоцитопения.

III Тип. Иммунокомплексные реакции.

Образование иммунных комплексов антиген-антитело происходит при нормальном иммунном ответе. Тем не менее, часто образуется много иммунных комплексов с необычными размерами (при избытке антигена). Это нарушает их фагоцитоз, затрудняет элиминацию из организма и приводит к активации комплемента. Комплексы, содержащие IgG и IgM, активируют систему комплемента по классическому пути, а иммунные комплексы, содержащие IgA, могут активировать комплемент по альтернативному пути.

Циркулирующие иммунные комплексы начинают откладываться в тканях, прежде всего под базальной мембраной эпителия и субэндотелиально в сосудах, активируют комплемент. Продукты активации комплемента повышают проницаемость сосудов, вызывают их расширение, привлекают гранулоциты и макрофаги, которые высвобождают вторичные медиаторы и повреждают ткани. Основными клиническими проявлениями этих реакций являются *васкулиты*. В первую очередь повреждаются органы, богатые капиллярами (почки, легкие, кожа), а также соединительная ткань. По этому механизму развиваются такие заболевания как гломерулонефрит, диффузные болезни соединительной ткани (в первую очередь – системная красная волчанка и ревматоидный артрит), ревматизм.

2.5. Повышенная чувствительность замедленного типа.

Т-клеточные реакции

Данная форма гиперчувствительности наблюдается при многих аллергических, аутоиммунных заболеваниях, при реакции отторжения трансплантата и т.д. Главную роль в развитии этой формы иммунопатологии играют Т-лимфоциты, несущие специфические рецепторы к антигену. При таком типе реакций сенсibilизированные Т-лимфоциты при взаимодействии с антигеном превращаются в Т-бласты, которые выделяют лимфокины: лимфотоксин, повреждающий клетки, хемотаксический фактор, γ -интерферон, фактор, угнетающий миграцию лейкоцитов. Эти лимфокины привлекают и активируют макрофаги и гранулоциты, формируют клеточный инфильтрат, создают очаг воспаления. Выделение лимфокинов может привести также к пролиферации и дифференцировке клеток-киллеров, что, в свою очередь, ведет к прямому повреждению тканей.

Наиболее характерным примером такого рода реакций является туберкулиновая проба Манту на аллерген туберкулин, полученный из *M. tuberculosis*. Она проявляется через несколько часов и достигает максимума через 1–2 суток. В месте воспаления развивается мононуклеарная инфильтрация, которая затем дополняется полиморфноядерной.

2.6. Псевдоаллергические реакции

Эти реакции *неспецифические*: отсутствует иммунологическая стадия аллергии, нет антител и иммунных Т-клеток.

Реакции включаются сразу с патохимической стадии. Они обусловлены выделением медиаторов (гистамина, лейкотриенов, серотонина и др.) из лейкоцитов под влиянием *различных неспецифических воздействий*: физических факторов (холод, физическая нагрузка), продуктов бактерий, их токсинов, химических и токсических веществ, психоэмоциональных факторов. Типичный пример этих реакций – *холодовая аллергия*. У людей с повышенной чувствительностью к этому фактору охлаждение вызывает гиперемию и отек кожи открытых участков тела. Выделившиеся медиаторы вызывают повреждение клеток и тканей, такие же по клинике как аллергические заболевания.

Эти же реакции могут возникнуть в результате *активации комплемента* по альтернативному пути, что происходит при многократных внутривенных инъекциях больным кровезамещающих жидкостей, некоторых лекарств.

2.7. Аллергические заболевания

Основной чертой аллергических заболеваний является повышенная чувствительность к аллергенам экзогенного (неинфекционного и инфекционного) происхождения.

Отмечается рост частоты аллергических заболеваний. Им свойственны общие механизмы возникновения и развития:

- 1) генетическая наследственная предрасположенность к атопическим реакциям у больного и кровных родственников;
- 2) наличие экзогенных индукторов-аллергенов, удаление, элиминация которых обычно ведет к частичному или полному выздоровлению;
- 3) гиперергический характер иммунных (немедленных или замедленных) реакций на аллергены.

Главным патогенетическим механизмом данной группы заболевания является повышенная иммунологическая реактивность (*гиперчувствительность*), выражающаяся в гиперпродукции отдельных факторов СИ: антител определенных классов (нередко IgE), сенсibilизированных лимфоцитов, интерлейкинов и других медиаторов, выделяемых лейкоцитами.

Для аллергических заболеваний характерна цикличность течения: периоды относительной или полной ремиссии сменяются регулярными обострениями. Это во многих случаях обусловлено контактами с соответствующими индукторами заболевания – *аллергенами*.

Лечение отличается в период ремиссии и обострения. В острый период аллергического заболевания оно направлено на ликвидацию клинических проявлений, предотвращение прогрессирования процесса. Так как состояние больного может быть тяжелым, а часто – угрожаемым жизни, то используется комплекс средств неотложной терапии. Это неспецифические патогенетические и симптоматические препараты, которые призваны подавить аллергическую реакцию и восстановить нарушенные функции органов и систем.

Уже в острый период *элиминационная терапия* – удаление индуктора аллергической реакции имеет большое значение. Исключение контакта больного с различными аллергенами: бытовыми, пищевыми, лекарственными, химическими и др., от которых зависит поддержание патологического процесса, позволяет быстро улучшить его состояние, достичь ремиссии. От полноты элиминации зави-

сит как эффективность терапии в острый период, так и противорецидивная профилактика.

В период ремиссии аллергического заболевания основной задачей является предотвращение его рецидива, т.е. профилактика.

ГЛАВА 3. Иммунопатология. Врожденные и приобретенные иммунодефициты. Иммунодиагностика

Иммунопатология включает заболевания, в основе которых лежат нарушения в системе иммунитета.

Различают 3 основных вида иммунопатологии:

- заболевания, связанные с угнетением реакций иммунитета (иммунодефициты);
- заболевания, связанные с усилением реакций иммунитета (аллергия и аутоиммунные заболевания);
- болезни с нарушением пролиферации клеток СИ и синтеза иммуноглобулинов (лейкозы, парапротеинемии).

3.1. Иммунодефициты (ИД)

По происхождению иммунодефициты делят на:

1. **Первичные** – врожденные, часто генетически обусловленные. Они могут быть связаны с отсутствием или снижением активности генов, контролирующих созревание иммунокомпетентных клеток или с патологией в процессе внутриутробного развития.
2. **Вторичные** – приобретенные, возникают под влиянием неблагоприятных эндо- и экзогенных факторов после рождения.

По локализации различают:

1. **ИД лимфоидной системы** – связаны с нарушением созревания Т- и В-лимфоцитов на любом этапе их развития и дифференцировки.
2. **ИД в системе фагоцитов** и гранулоцитов.
3. **ИД в системе комплемента**, возникающие при нарушении синтеза различных компонентов комплемента.

3.2. Первичные иммунодефициты

При **тяжелом комбинированном ИД (ТКИД)** страдает дифференцировка различных клеток, включая стволовые. Существует несколько вариантов ТКИД. Ретикулярный дисгенез проявляется отсутствием всех элементов, образующих лейкоциты. «Швейцарский тип» ТКИД сопровождается полным нарушением дифференцировки Т- и В-лимфоцитов (тимус остается в стадии эмбрионального развития, имеется дефицит тимоцитов, селезенка и лимфоузлы недоразвиты). Иногда клинические проявления ТКИД возникают при дефиците ферментов аденозиндезаминазы и пуриноклеозидфосфоорилазы.

3.3. Комбинированные иммунодефициты

Иммунодефицит с атаксией-телеангиоэктазией (синдром Луи-Бар) характеризуется смешанной недостаточностью Т- и В-лимфоцитов, неврологиче-

скими (поражения мозжечка), сосудистыми (телеангиоэктазии) и др. нарушениями.

Синдром Вискотта-Олдрича характеризуется клинической триадой – экзема, тромбоцитопения, склонность к инфекциям. Предполагается, что при данном заболевании страдает антигенпрезентирующая функция макрофагов.

3.4. Т-клеточные иммунодефициты

При этих состояниях происходит преимущественное поражение Т-звена системы иммунитета.

Гипоплазия тимуса – синдром *Ди-Джорджи*. Характеризуется гипо- или аплазией тимуса и аплазией паращитовидных желез в сочетании с недоразвитием нижней челюсти. Одновременно наблюдаются пороки развития дуги аорты, сердца, грудины и т.д. Иммунологически синдром проявляется отсутствием или резким снижением количества Т-лимфоцитов.

Синдром Незелофа – характеризуется гипоплазией тимуса, нарушением нормального созревания Т-лимфоцитов, их дефицитом в Т-зависимых зонах иммунной системы. Резко угнетены функции Т-клеток, общее количество лимфоцитов уменьшено, синтез ИГ нормален или снижен, антителообразование угнетено.

3.5. В-клеточные иммунодефициты

В этом случае происходит преимущественное поражение В-звена системы иммунитета.

Агаммаглобулинемия, сцепленная с X-хромосомой (болезнь Брутона), – болеют только мальчики. В сыворотке крови отсутствуют либо резко снижены иммуноглобулины. Плазматические клетки в лимфоидной ткани отсутствуют. В настоящее время при проведении заместительной терапии иммуноглобулинами больные могут дожить до 20–35 лет.

Дисиммуноглобулинемии характеризуются недостаточностью одного или нескольких классов иммуноглобулинов. Наиболее частым из них является селективный дефицит иммуноглобулина А (1:70–1:100). Этот дефект может быть бессимптомным, однако с ним нередко связаны рецидивы заболеваний органов дыхания и пищеварения.

Селективные дефициты IgM или IgG встречаются редко. Больные с дефицитом IgM обычно погибают от сепсиса. Дефицит IgG может проявляться различными симптомами в зависимости от отсутствующих субклассов IgG (чаще IgG2). Дефицита иммуноглобулинов класса Е не встречается, однако существует IgE-гипергаммаглобулинемия, которая характеризуется различными аллергическими проявлениями, а также хроническими бактериальными инфекциями.

3.6. Дефекты системы мононуклеарных фагоцитов и гранулоцитов

По механизму такие ИД можно разделить на *четыре группы*. В первую группу входят ИД, связанные с недостаточной активностью ферментов, результатом чего является нарушение переваривания поглощенного объекта. Ко второй группе относятся ИД, обусловленные нарушением хемотаксиса фагоцитов. Третья группа ИД связана с недостаточностью опсонизирующих факторов сыворот-

ки крови (антител и комплемента). Четвертая группа характеризуется недостаточной экспрессией рецепторов на поверхности макрофагов (для С3-компонента комплемента, для Fc-фрагментов ИГ и др.). Проявлением таких ИД является *хроническая гранулематозная болезнь*. Она характеризуется тем, что фагоциты поглощают микроорганизмы, но не переваривают их. В результате этого микробы размножаются в фагоцитах и обуславливают образование гранулем.

Синдром Чедиака-Хигаси связан с нарушением дегрануляции моноцитов и нейтрофилов. У таких больных наблюдается сочетание рецидивирующих гнойных и вирусных инфекций со снижением пигментации волос, кожи и глаз.

3.7. Недостаточность системы комплемента

Дефицит в системе комплемента может наблюдаться по любому из компонентов, причем дефект какого-либо фактора блокирует активацию последующих. Это сопровождается развитием различных патологических состояний. Дефицит С1, С2, С4 и С5 проявляется синдромом, схожим с системной красной волчанкой. Дефицит С3 характеризуется возвратными гнойными инфекциями.

Кроме недостаточности основных компонентов встречаются дефициты ингибиторов системы комплемента: С1-ингибитора и С3-инактиватора. Клинически недостаточность С1-ингибитора проявляется наследственным ангионевротическим отеком. Отек возникает из-за увеличения концентрации фрагмента С2-компонента, обладающего вазоактивным действием. Обычно такие больные гетерозиготны и у них синтезируется небольшое количество ингибитора. Уровень его можно повысить, вводя анаболические стероиды, либо проводя заместительную терапию самим ингибитором.

3.8. Вторичные иммунодефициты

Вторичные ИД формируются под действием окружающей среды, встречаются гораздо чаще, чем первичные и проявляются хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями кожи, верхних дыхательных путей, легких, мочеполовой системы, желудочно-кишечного тракта, и др. органов. От преходящих (транзиторных) сдвигов в системе иммунитета они отличаются следующими признаками:

- отсутствием наследственной обусловленности;
- возникновением на фоне нормальной реактивности организма;
- связью с причинным фактором, обусловившим ИД;
- сохранением нарушений в системе иммунитета после окончания действия причинного фактора.

Причины возникновения вторичных ИД:

1. **Инфекционные факторы** – вирусные, бактериальные, паразитарные, грибковые заболевания, которые повреждают, угнетают клетки СИ, изменяют иммунный ответ. Примером может служить ВИЧ-инфекция.
2. **Неинфекционные факторы** – методы лечения, подавляющие иммунитет, нарушение питания, обмена веществ, интоксикации, любые тяжелые заболевания (рак, болезни сердца, легких, печени), стрессовые состояния (операционная травма, наркоз, тяжелая физическая нагрузка), ожоги, неблагоприятная экологическая обстановка (действие химических факторов, загрязняющих воду, воздух,

пищу, различные физические факторы – ультрафиолетовое облучение, радиация и др.).

По форме различают *компенсированные, субкомпенсированные и декомпенсированные вторичные ИД*.

Компенсированные ИД сопровождаются повышенной восприимчивостью к возбудителям инфекций, что проявляется частыми ОРВИ, пневмониями, пиодермиями.

При *субкомпенсированных ИД* развиваются рецидивирующие хронические гнойно-воспалительные заболевания различных органов.

Декомпенсированная форма вторичного ИД проявляется в виде генерализации процессов, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, грибами и паразитами.

Наиболее тяжелый вторичный иммунодефицит возникает в результате воздействия на иммунную систему вирусами иммунодефицита человека (*ВИЧ*).

3.9. ВИЧ-инфекция

Вирус иммунодефицита человека (*ВИЧ*) вызывает инфекционное заболевание, связанное с первичным поражением СИ и развитием ярко выраженного вторичного иммунодефицита, на фоне которого активируется условно-патогенная и непатогенная микрофлора. Заболевание имеет фазовое течение. Период выраженных клинических проявлений был назван синдромом приобретенного иммунодефицита (*СПИД*), хотя в настоящее время по рекомендации ВОЗ принят термин «*ВИЧ-инфекция*».

Вирус *ВИЧ* (типа I и II) относится к семейству *Retroviridae*. Он был открыт в мае 1983 г. Л. Монтанье в Париже и Р. Галло в США.

Вирус имеет палочковидную или овальную (реже круглую) форму, диаметр его 100–140 нм, содержит внешнюю липидную оболочку.

Геном *ВИЧ* представлен двумя идентичными однонитчатыми РНК и содержит 3 структурных гена: *gag, env, pol*. Первый кодирует групповые гликопротеидные АГ оболочки (*gp41* и *gp120*), 2-й – белки оболочки (*p18* и *p24*), 3-й – РНК-зависимую ДНК-полимеразу (ревертазу) – фермент, осуществляющий обратную транскрипцию – синтез ДНК по матрице РНК вируса. Эта ДНК встраивается в клеточный геном и называется провирусом.

Жизненный цикл вируса состоит из 4 основных стадий:

1. Адсорбция и проникновение вируса в клетку.
2. Высвобождение вирусной РНК, синтез двунитчатой ДНК провируса (обратная транскрипция) и интеграция провируса в геном клетки хозяина. В таком состоянии геном вируса может передаваться неопределенно долго в клеточных поколениях, обуславливая длительное латентное течение инфекции.
3. Синтез РНК, трансляция и формирование вирусных белков.
4. Сборка, созревание и высвобождение вновь образованных вирусов. Этот процесс происходит спорадически и только в некоторых зараженных клетках.

Источником инфекции служит вирусоноситель. Он выделяет вирус со всеми биологическим жидкостями. В достаточной для заражения концентрации вирус содержится в сыворотке крови, сперме, нередко в слюне. Механизм передачи требует обязательного попадания вируса в кровь. Пути передачи: половой,

особенно при гомосексуальном контакте, парентеральный через инфицированные препараты крови, загрязненные медицинские инструменты, а также – трансплацентарный. В соответствии с путями передачи различают группы риска: гомо- и бисексуалы, наркоманы, больные гемофилией, дети больных родителей, больные, которым часто переливают кровь, а также медработники.

Вирус неустойчив в окружающей среде. Он погибает при температуре 56⁰С в течение 30 мин, чувствителен ко всем дезинфектантам, однако достаточно устойчив к высушиванию.

Патогенез заболевания: одним из основных механизмов ВИЧ-инфекции является специфическое взаимодействие гликопротеина gp120 оболочки ВИЧ с белком-рецептором CD4, который имеется на поверхности Т-лимфоцитов хелперов-индукторов, а также – макрофагов, моноцитов, астроцитов.

Кроме хелперного звена поражаются и другие звенья иммунитета, продукция иммуноглобулинов В-клетками, возникает дефицит некоторых компонентов комплемента и т.д.

Разрушение Т-хелперов ведет к глубокому расстройству СИ. Снижается соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры. Оно становится меньше 1,0 (0,5–0,005) при норме 1,4–2,0. Падает и абсолютное число Т-хелперов (при клинически развернутом СПИД – менее 400 клеток/мл, (норма – 800–1000 клеток/мл).

Поражение иммунитета является причиной развития инфекций условно-патогенными микроорганизмами: *Pneumocystis carinii*, *Herpes simplex*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans* и т.д.

Клиническая классификация ВИЧ-инфекций: в течение ВИЧ-инфекции можно видеть несколько стадий, постепенно переходящих одна в другую. Первичная реакция организма на внедрение ВИЧ обычно сопровождается выработкой антител. Однако от момента заражения до выработки антител обычно проходит в среднем от трех недель до трех месяцев, у 15–25% инфицированных появление антител к ВИЧ в организме проявляется первичной манифестацией.

I. **Острая инфекция** чаще всего встречается между 6–12 неделями после инфицирования, но может появиться через 1 неделю и через 8–12 месяцев, и более. Наблюдается мононуклеозоподобный синдром (лихорадка, моноцитоз), либо эта стадия протекает в субклинической форме.

II. **Асимптомная инфекция (вирусоносительство)** характеризуется отсутствием каких-либо симптомов. Отнесение лиц к этой группе осуществляется на основании данных эпидемиологического анамнеза и лабораторных исследований. Доказательством служит наличие противовирусных антител.

III. **Персистирующая генерализованная лимфаденопатия** характеризуется наличием выраженной лимфаденопатии в течение трех и более месяцев у лиц с эпидемиологическими и лабораторными данными.

IV. **СПИД-ассоциированный симптомокомплекс (пре-СПИД)** стадия характеризуется следующими признаками: потерей массы тела 10% и более; необъяснимой лихорадкой на протяжении 3-х месяцев и более; диареей, длящейся более 1 месяца; синдромом хронической усталости; грибковыми, вирусными, бактериальными поражениями кожи и слизистых; повторным или диссеминированным опоясывающим лишаем, саркомой Капоши; повторными или стойкими вирусными, бактериальными, грибковыми, протозойными поражениями внутренних органов.

V. **СПИД** характеризуется нарастанием оппортунистических инфекций и опухолей в результате развития глубокого иммунодефицита, истощения, что приводит к смерти через 5–10 лет. В ряде случаев заболевание развивается более быстро и уже через 2–3 года переходит в терминальную стадию.

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции обычно включает исследование сыворотки крови больного для обнаружения АТ к антигенам вируса ВИЧ. Это исследование обычно проводят в 2 этапа: на первом из них определяют АТ к вирусным белкам gp24, gp120 и gp41 при помощи иммуноферментного анализа (ИФА). На втором этапе положительные сыворотки исследуют методом иммуноблоттинга, в котором выявляют антитела против индивидуальных антигенов вируса. При выявлении антител минимум к трем антигенам gp120, gp41, p24 человека считают ВИЧ-инфицированным.

Лечение ВИЧ-инфекции основано на приеме препаратов, способных замедлить репликацию ВИЧ-вирусов, ингибиторов обратной транскриптазы. Это азидотимидин (АЗТ), который в организме превращается в АЗТ-трифосфат, включается вместо тимидинтрифосфата в вирусную ДНК и синтез дальнейшей цепи прекращается. Препарат увеличивает время выживания больных с далеко зашедшим СПИДом приблизительно на год. К препарату может возникать устойчивость и тогда его чередуют с дидезоксицитидином. Перспективно, в качестве конкурентного ингибитора связывания вируса с клеткой, использование рекомбинантных рецепторов Т-хелперов – CD4 молекул.

Профилактика:

1. Выявление ВИЧ-инфицированных лиц среди угрожаемых контингентов (лица, контактные с инфицированными, проститутки, наркоманы, подозрительные больные).
2. Предупреждение инфицирования медицинского инструментария, лекарств, препаратов крови.
3. Пропаганда знаний по предупреждению заражения ВИЧ при половых контактах (исключение случайных связей, применение средств индивидуальной защиты).
4. Предупреждение заражения медработников при контакте с больными и их биологическими жидкостями (кровь, секреты, экссудаты, моча и т.д.).

Сейчас предпринимаются попытки создать вакцины на основе белка gp120 и антиидиотипические вакцины на основе АТ против CD4, однако по-прежнему главными остаются неспецифические профилактические меры.

3.10. Иммунодефициты при других патологических состояниях

Наиболее активное воздействие на иммунную систему оказывают *вирусы*. При кори, краснухе, гриппе, паротите, гепатите снижается функциональная активность Т-лимфоцитов, нарушается функция нейтрофилов. Причинами развития ИД при вирусных инфекциях являются: непосредственное воздействие вируса на клетки иммунной системы, повышение под действием вируса активности Т-супрессоров, модификация мембран лимфоцитов с изменением их функциональных свойств. Известны ИД *при опухолях*. Они обусловлены выделением опухолевыми клетками иммуномодулирующих факторов и медиаторов, подавляющих иммунитет. Характеризуются снижением количества Т-лимфоцитов,

увеличением активности Т-супрессоров. Особенно выраженные изменения возникают при распространенных опухолевых процессах с метастазированием.

Описаны ИД *при нарушении обмена веществ*. Такие иммунодефициты возникают, например, при железодефицитной анемии, при дефиците в питании цинка, так как он имеет особое значение для функционирования тимуса, при общем истощении или белковом голодании. Во всех этих случаях прежде всего страдает клеточная система иммунитета: снижается ответ лимфоцитов на митогены, обнаруживается атрофия лимфоидной ткани, снижаются кожные пробы гиперчувствительности замедленного типа, нарушается функция нейтрофилов.

Вторичные ИД *при хирургических операциях* связаны с мощной стрессовой реакцией и с действием препаратов для наркоза. Развивается временное иммунодефицитное состояние, при котором падает количество Т- и В-лимфоцитов, снижается их функциональная активность. Нарушенные показатели восстанавливаются только через месяц.

ИД *при ожогах* возникают в связи с большой потерей *иммуноглобулинов с плазмой*. Если площадь поражения кожи превышает 30%, развиваются нарушения клеточного иммунитета.

ИД *при старении организма* являются результатом иммуномодуляций, возникающих от многих причин, поэтому происходит ослабление иммунологического надзора и повышается частота злокачественных опухолей. Увеличивается также количество аутоантител.

3.11. Иммунодиагностика. Оценка иммунного статуса

Иммунодиагностика – это совокупность иммунологических методов, позволяющих выявить то или иное заболевание или определить возбудителя в исследуемом материале. Все методы иммунодиагностики делятся на 2 группы:

Общие неспецифические методы, характеризующие состояние различных звеньев системы иммунитета: лимфоцитов, гранулоцитов, макрофагов, комплемента.

Специфические методы, позволяющие выявить антитела, иммунные Т-лимфоциты, антигены в организме человека или антигены возбудителя во внешней среде.

Неспецифические показатели иммунного статуса

Характеристика лимфоидной системы.

1) Определяют общее количество лимфоцитов при подсчете формулы крови. В норме их 20-26% от других лейкоцитов (около 2000 клеток в 1 мм^3 крови).

2) Определяют процент и количество *Т-лимфоцитов*. Среди лимфоцитов крови в норме их 50-70% (1000-1400 клеток в 1 мм^3 крови).

Определяют также функциональные показатели Т-лимфоцитов: пролиферативную активность, цитотоксическую активность. Показатели Т-лимфоцитов снижаются при Т-клеточных иммунодефицитах.

Характеристика В-лимфоцитов

1. Общее количество В-лимфоцитов можно определить с помощью моноклональных антител к антигенам CD19–CD22, CD72. Используют также антитела к иммуноглобулинам, которые находятся на поверхности В-лимфоцитов. В-лимфоциты составляют 20–25% всех лимфоцитов (600-800 клеток в 1 мм^3 крови).

2. Функциональные продукты В-лимфоцитов – иммуноглобулины G, M, A классов в сыворотке крови и различных биологических жидкостях определяют с помощью реакции преципитации по Манчини другими методами (турбидиметрия, нефелометрия, ИФА).

Характеристика системы макрофагов и гранулоцитов

1) Определяют количество лейкоцитов в крови и соотношение их видов (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты).

2) Оценивают поглотительную и переваривающую активность фагоцитов: к взвеси лейкоцитов или капле крови добавлять взвесь отмытой суточной культуры стафилококков или кишечной палочки.

Определяют фагоцитарный индекс и фагоцитарное число.

Фагоцитарный индекс – это среднее количество частиц или микроорганизмов в одном фагоците (норма 3–8).

Фагоцитарное число – это количество фагоцитов, участвующих в фагоцитозе (норма 60–80%).

Оценка показателей через разные промежутки времени позволяет оценить динамику фагоцитоза. В норме через 90 мин фагоцитарный индекс должен быть ниже, чем через 45 мин и 60 мин, в связи с перевариванием микробов. При нарушении переваривания он не меняется.

Характеристика системы комплемента.

1) Определяют гемолитическую активность комплемента в реакции гемолиза с использованием гемолитической системы. Определение комплемента основано на способности продуктов его активации вызывать лизис эритроцитов, покрытых антителами. По степени гемолиза судят о гемолитической активности комплемента.

2) Выявляют продукты активации C4a, C3a, C5a и др.

3) Оценивают количество компонентов комплемента (норма в сыворотке крови в мг/л: C1q-190, C1s-120, C2-30, C4-430, C3-1300, C5-75, C6-60, C7-55, C8-60, C9-160, пропердин-25, фактор В-240, C1-ингибитор-180).

4) С помощью антител выявляют отложения комплемента с иммунными комплексами в биоптатах тканей.

5) Определяют комплементсвязывающие рецепторы на лейкоцитах.

Эти методы используют для оценки иммунного статуса человека, т.е. для характеристики состояния иммунной системы.

Для оценки *специфических показателей* используют 3 группы методов:

1. Методы определения антител различных иммуноглобулиновых классов (G, M, A, E, D) к определенным антигенам.

2. Методы выявления иммунных Т-лимфоцитов, несущих рецепторы к определенному антигену.

3. Методы обнаружения антигенов.

Эти методы основаны на иммунных реакциях, которые ставят в лабораторных условиях. Есть 2 группы реакций: серологические (основаны на взаимодействии антигенов и антител) и клеточные, базирующиеся на взаимодействии антигенов с Т-клетками.

ГЛАВА 4. Аутоиммунные (аутоаллергические) заболевания

Основой *аутоаллергических (аутоиммунных) заболеваний (АЗ)* служат повышенные иммунные реакции на молекулярные компоненты *собственных тканей и органов*, которые выступают в роли *антигенов*. Эти реакции возникают и поддерживаются путем нарушения распознавания «своих» молекул клетками системы иммунитета, поэтому АЗ имеют длительное, хроническое течение.

4.1. Патогенез аутоиммунных заболеваний

Причины и механизмы развития АЗ разнообразны. По происхождению различают первичные, генетически обусловленные АЗ и вторичные, возникшие в результате вирусных инфекций, воздействий лекарств и других факторов.

Аутоаллергические (аутоиммунные) реакции развиваются по закономерностям, сходным с экзогенной аллергией и включают *немедленные (повышенная чувствительность немедленного типа – ПЧНТ)* и *замедленные (повышенная чувствительность замедленного типа – ПЧЗТ)* реакции всех типов.

Анафилактические, IgE-зависимые реакции для АЗ не характерны.

Цитотоксические реакции обычно сопровождаются аутоантителами против мембран клеток крови, которые разрушаются при участии комплемента. Такой тип реакций наблюдается при аутоиммунных анемиях, нейтропениях, системной красной волчанке (лимфопения).

Иммунокомплексные реакции приводят к поражению сосудистой сети – *васкулитам*. Обычно они развиваются, когда образуется много иммунных комплексов мелких размеров (с низкоафинными антителами). Эти комплексы слабо элиминируются из кровотока, чему способствует недостаточность CR1-рецепторов эритроцитов, связывающих C3b-компонент комплемента в иммунном комплексе, а также снижение активности фагоцитов, особенно в селезенке. Иммунные комплексы откладываются в стенке сосудов (капилляров). Органная локализация (суставы, почки, легкие) их отложений обычно зависит от вида антигена, входящего в их состав. Мелкие комплексы проникают через базальную мембрану и откладываются субэпителиально (поражения почек больше), а крупные – под базальной мембраной эпителия и субэндотелиально (прогноз лучше, поражение почек меньше).

Антирецепторные реакции обусловлены связыванием антител с функционально активными клеточными рецепторами. Патология возникает из-за возникшего усиления или снижения функций соответствующих клеток мишеней: тиротоксикоз, миастения, инсулинзависимый диабет, пернициозная анемия, идиопатическая крапивница.

Гиперчувствительность замедленного типа (Т-клеточные реакции) лежит в основе многих АЗ. Причем преобладает ее туберкулиновый вариант с инфильтрацией пораженной ткани или органа мононуклеарами. Нередко этот вариант с преобладанием в инфильтратах CD4 1 типа и CD8-лимфоцитов наблюдается в поздние фазы аутоаллергического процесса, когда разрушаются островки поджелудочной железы при диабете, фолликулы щитовидной железы при тиреоидитах и структуры других органов.

Из-за общности механизмов их развития и сущности процессов аутоим-

мунные реакции правильнее обозначать как *аутоаллергические* (по А.Д. Адо, 1978; E. Urbach, 1946).

Для развития АЗ необходим ряд условий:

- генетическая предрасположенность, ассоциированная с генами, HLA-системы и соответствующим фенотипом, реализуемая через взаимодействие клеток СИ, клеток-мишеней и тропных к ним агентов (вирусов, веществ и др.);
- наличие неблагоприятных химических, физических и биологических факторов, стимулирующих аутоаллергию;
- воздействие тропных к клеткам-мишеням агентов (например, вирусов, имеющих общие эпитопы с аутологичными органоспецифическими молекулами – гормонами, ферментами, цитокинами и др.);
- генетически обусловленное наличие достаточно аффинных вариантов вариабельных цепей (и активных центров) рецепторов на Т- и В-лимфоцитах к органоспецифическим молекулам, а поэтому потенциальная способность лимфоцитов образовывать клоны аутореактивных клеток.

Генетическая обусловленность АЗ четко видна у некоторых линий животных и птиц, у которых закономерно развиваются эти заболевания. У кур линии OS (Obese Strain) спонтанно возникает аутоиммунный тиреоидит с антителами против клеток щитовидной железы и тироглобулину, а затем развивается гипотиреоз. Крысы линии BB предрасположены к диабету, мыши-гибриды (NZB/NZW) F_1 к системной красной волчанке (с гломерулонефритом и анти-ДНК-антителами), а линии NOD – к сахарному диабету. Мутации гена Aire у мышей ассоциированы с аутоиммунным синдромом полигландулярной эндокринопатии.

У людей АЗ ассоциированы с определенными HLA-гаплотипами, и нередко бывают семейными. При органоспецифических заболеваниях часто встречается гаплотип B8, DR3. Существует ассоциация пузырчатки с молекулой HLA-DR4 (DRB1*0402), которая, будучи на АПК, в отличие от других субтипов DR4, осуществляет презентацию пептида десмоглеина-3 Т-хелперам. Они индуцируют синтез В-клетками IgG4-антител против этого пептида десмосом (кадгерина), участвующего в формировании контактов между клетками эпидермиса. В итоге эти антитела нарушают адгезию клеток.

При *анкилозирующем спондилоартрите* у больных часто встречается HLA-B27.

В норме в организме против клеток всех тканей имеются в небольшом количестве естественные аутоантитела класса IgM, синтезируемые CD5⁺B1-лимфоцитами, которые не вызывают патологических процессов, а стимулируют регенерацию этих тканей. Для аутоаллергических, повышенных реакций, необходимо не только увеличение их количества, но и появление антител класса IgG, усиление их специфичности, авидности против определенных структур. Например, при тиротоксикозе – это антитела против тироглобулиновых рецепторов тироцитов, стимулирующие синтез гормонов щитовидной железы. При аутоиммунной гемолитической анемии – антитела против эритроцитов, при нейтропении – против нейтрофилов и т.д.

Клетки эндокринных органов служат примером структур («забарьерные органы»), у которых отсутствовал контакт с клетками системы иммунитета

в эмбриональном периоде, когда формируется естественная толерантность. Поэтому к ним и их молекулам легко образуются антитела в случае повреждения любым агентом – вирусами, бактериями или даже физическим, механическим воздействием. Для этого достаточно поступления молекул-антигенов поврежденного эндокринного органа в кровь или лимфу и последующего контакта с иммунокомпетентными клетками. Иммунизация животных аллогенными и даже аутологичными экстрактами или клетками эндокринных органов индуцирует против них антитела. Например, после иммунизации животных тироглобулином, экстрактами надпочечников, спермой и другими антигенами появляются антитела, взаимодействующие как с ними, так и с аутологичными клетками в связи с их антигенной общностью («мимикрией»). Такие приемы и методы применяются для получения экспериментальных моделей аутоаллергических повреждений эндокринных органов (щитовидной, поджелудочной железы и др.).

Накопление *высокоспецифичных аутореактивных клонов Т- и В-лимфоцитов в связи со стимуляцией единичных всегда персистирующих аутоспецифических клеток служит основой развития аутоаллергической реакции.* Такие Т-лимфоциты, несущие малоспецифичные рецепторы, тоже существуют в норме. Однако, даже если проникают и входят в контакт с клетками эндокринных органов, то подвергаются апоптозу (программированная клеточная смерть). Дело в том, что клетки «забарьерных органов», к которым относятся эндокринные, несут на поверхности LCD95 (лиганд для Fas-рецептора CD95), который при взаимодействии с рецептором CD95 на Т-лимфоците вызывает его апоптоз. Если клетки эндокринных органов, по какой-то причине (возможно, из-за иммуномодуляции вирусом) утрачивают LCD95 (это наблюдается при тиреоидите Хашимото), то могут разрушаться аутореактивными Т-лимфоцитами.

4.2. Толерантность

В норме *толерантность* иногда поддерживается низкой дозой потенциального антигена, как наблюдается, например, в случае с *тироглобулином щитовидной железы.* Эта низкодозная толерантность обусловлена комплексом супрессорных механизмов, в том числе наличием антиидиотипов антител и антирецепторов, направленных против немногих потенциально аутореактивных Т- и В-клеток. Толерантность также обусловлена конкурентными взаимоотношениями Тх 1 и Тх 2, цитокинами и лиганд-рецепторными взаимодействиями разных популяций клеток СИ, конечными продуктами иммунной реакции, например, IgG-антителами.

Каждая субпопуляция клеток оказывает стимулирующее и/или ингибирующее влияние на другую. Нарушение в этой сети взаимодействий – причина прогрессирующего иммунного ответа и развития АЗ.

Фоном, на котором возникают аутоаллергические реакции, нередко служат скрытые или явные иммунодефициты. Инфекты (вирусы, бактерии) могут вызывать апоптоз одной из оппозиционно реагирующих субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов первого или второго типа, в результате сохранившаяся субпопуляция приобретает преимущества и поликлонально гиперстимулируется антигенами, запуская преимущественно гуморальные (Тх 2) или клеточные

(Тх 1) реакции, а в итоге воспаление, вовлекающее другие лейкоциты. Т-лимфоциты, инфильтрирующие синовиальную оболочку при ревматоидном артрите, устойчивы к апоптозу возможно за счет стимуляции ее антигенами модифицированными вирусами. Описан дефект в гене Fas-рецептора, что приводит к лимфопролиферативному синдрому с аутоиммунными реакциями.

4.3. Особенности запуска аутоаллергических заболеваний

Вирусы, бактерии (их токсины), экологически вредные агенты могут запускать аутоаллергические заболевания несколькими путями:

- 1) повреждая клетки и вызывая выход «забарьерных» антигенов в лимфу и кровь, которые прямо стимулируют аутоаллергическую реакцию;
- 2) активируя те Т- и В-лимфоциты, рецепторы которых перекрестно реагируют с клетками тканей и органов, несущих эпитопы, общие с инфекционными агентами (антигенная мимикрия);
- 3) действуя как суперантигены и вызывая поликлональную активацию лимфоцитов, т.е. связываясь с V β -цепью Т-клеточного рецептора и активируя до 30% Т-лимфоцитов, выделяющих при этом цитокины воспаления (характерно для токсинов бактерий);
- 4) вызывая, в связи с аллергией к инфекционным антигенам, активацию Т- и В-лимфоцитов с образованием антител различной специфичности и широкого спектра цитокинов, запускающих воспаление, и/или приводящих к стойкой иммуномодуляции (гамма-интерферон, индуцируемый вирусом, приводит к появлению на β -клетках поджелудочной железы HLA-антигенов II класса);
- 5) индуцируя мутации и/или активацию генов цитокинов, участвующих в воспалении и повреждении клеток;
- 6) индуцируя изменение хоминга Т-лимфоцитов в связи с подавлением или стимуляцией молекул адгезии и хемокиновых рецепторов;
- 7) вызывая или ингибируя апоптоз определенных субпопуляций клеток СИ и/или клеток-мишеней;
- 8) нарушая регуляцию идиотип-антиидиотипической сети;
- 9) стимулируя образование В-лимфоцитами абзимов – антител с ферментативной активностью, повреждающих клеточные мембраны.

Следует отметить, что многие из перечисленных механизмов могут реализоваться путем индукции апоптоза паренхиматозных клеток органов, что приводит к поступлению органоспецифических антигенов в лимфу и кровь. Некроз их чаще возникает из-за различных видов гипоксии, которая в итоге тоже может приводить к аутоаллергическому воспалению на поврежденную ткань.

4.4. Примеры аутоантител и их эффекты

- *Системная красная волчанка* – антиядерные и анти-ДНК, клеточный лизис и образование иммунных комплексов, активация комплемента, повреждение клеток.
- *Ревматоидный артрит* – IgM антитела против аутологичного IgG (изменение его конформации, избыток агалактогликоформ), образование иммунных комплексов.
- *Вульгарная пузырьчатка IgG4* – антитела к десмоглеину-3 (кадгерину) эпидермиса, отслойка эпидермиса.

- *Синдром Гудпасчера* – антитела к II типу коллагена базальных мембран, эпителия, почек и легких, повреждение этих мембран.
- *Пернициозная анемия* – антитела против внутреннего фактора Кастла, блокируют связывание витамина В₁₂, индуцируют анемию.
- *Гипертироидизм* (тиротоксикоз – болезнь Гревса-Базедова) – антитела к рецептору для тиротропного гормона стимулируют продукцию гормонов щитовидной железы – синдром тиротоксикоза (тахикардия, пучеглазие и др.).
- *Миастения гравис* – антитела к ацетилхолиновому рецептору, блокируют передачу нервных импульсов на мышцу – атрофия, слабость мышц.
- *Тромбоцитопеническая пурпура* – антитела к рецептору для фибриногена, интегрину GrPb/IIIa – разрушение тромбоцитов.
- *Инсулинзависимый диабет I типа* – антитела к β-клеткам поджелудочной железы, их ферментам – повреждение клеток.
- *Инсулинзависимый диабет II типа* – антитела против рецепторов для инсулина – нарушение обмена.
- *Хроническая идиопатическая крапивница* – антитела к Fcε I типа (высокоафинный рецептор для IgE на базофилах) – дегрануляция базофилов – сыпи.
- *Аутоиммунная гемолитическая анемия* – антиэритроцитарные антитела – лизис эритроцитов.

Аутоаллергические (аутоиммунные) заболевания подразделяются на 5 классов: **A, B, C, D, E**.

По распространенности процесса заболевания класса A делят на *органоспецифические, системные и промежуточные*.

Класс A – первичные АЗ с генетической предрасположенностью и без нее. К органоспецифическим заболеваниям класса A относятся: тиреоидит Хашимото, первичная микседема, тиротоксикоз, атрофический гастрит, иммунное бесплодие, инсулинзависимый диабет, пернициозная анемия и др. Системные заболевания класса A: системная красная волчанка, ревматоидный артрит, системная склеродермия, узелковый периартериит, миастения гравис.

Промежуточные АЗ класса A: первичный билиарный цирроз, хронический активный гепатит, язвенный колит, бронхиальная астма (аутоиммунная форма).

Класс B – вторичные АЗ с генетической предрасположенностью и без нее – ревматизм, лекарственные аутоиммунные реакции, увеит и др.

К классу C относятся генетические дефекты комплемента, которые проявляются в виде ангионевротического отека, волчаночно-подобных синдромов.

В класс D включены АЗ, в этиологии которых лежат медленные вирусные инфекции – рассеянный склероз, поствакцинальные реакции.

К классу E относят сочетания болезней классов A-D.

4.5. Диагностика и лечение аутоиммунных заболеваний

Диагностика АЗ основывается на клинических и лабораторных признаках.

Для АЗ характерны следующие иммунологические критерии:

– *антитела в сыворотке крови и в жидкостях*, полученных с поверхности клеток пораженной ткани, способные в присутствии комплемента повреждать соответствующие клетки-мишени или индуцировать выброс биологически активных веществ и ферментов из лейкоцитов в присутствии антигенов соответствующей ткани;

- выявление лимфоцитов, сенсibilизированных против антигенов ткани, в которых локализован аутоаллергический процесс; способность этих лимфоцитов *in vitro* выделять медиаторы, пролиферировать под влиянием соответствующих антигенов, оказывать цитотоксическое действие на клетки-мишени;
- наличие в сыворотке крови или очаге поражения иммунных комплексов, связь их концентрации с динамикой клинической картины;
- циркуляция в крови антигенов пораженной ткани, их присутствие в иммунных комплексах;
- иммуноморфологические проявления реакций повышенной чувствительности немедленного и замедленного типа в пораженных органах (моноклеарная инфильтрация, иммунные комплексы, антитела, сенсibilизированные лимфоциты, моноциты и др.);
- присутствие свободных медиаторов повышенной чувствительности замедленного и немедленного типов в крови или очагах поражения, появление их в крови при внутрикожном введении соответствующего антигена;
- положительный клинический эффект от лечения иммуномодуляторами и иммуносупрессорами.

Для лечения АЗ используют противовоспалительные средства (салицилаты, индометацин, ибупрофен и др.), а также глюкокортикостероиды. В тяжелых случаях к ним добавляют иммунодепрессанты: азотиоприн, циклофосфамид, метотрексат и особенно циклоспорин А или препарат FK-506 (такролимус), которые обладают меньшей токсичностью. Испытываются антитела против ФНО α , молекул адгезии и других иммуноактивных молекул. Пероральные вакцины, приготовленные из коллагена кур, были эффективны при ревматоидном артрите.

4.6. Реакции трансплантационного иммунитета

Аутотрансплантат – собственная ткань (например, кожа), пересаженная в другое место организма, приживает, если обеспечено ее нормальное кровоснабжение.

При *ксенотрансплантации* – пересадках клеток, тканей и органов от одного вида организмов другому – клетки СИ реципиента узнают чужеродные клетки и быстро разрушают их. Этот процесс отторжения осуществляется образующимися цитотоксическими антителами и компонентами активированного компонента. Весь процесс разрушения такого трансплантата осуществляется за 3–7 дней (в зависимости от степени чужеродности).

При *аллогенной трансплантации* клеток и органов от человека человеку набор HLA-антигенов донора, как правило, отличается от набора HLA-антигенов реципиента (только у однояйцевых близнецов он одинаков). Основная роль в отторжении аллотрансплантатов принадлежит Т-лимфоцитам. У бестимусных мышей аллотрансплантаты не отторгаются. Аллогенный трансплантат донора несет много иных антигенов и на них могут реагировать до 10% Т-лимфоцитов реципиента. Антигены донора могут представляться как собственными клетками, так и прямо донорскими лейкоцитами, что ускоряет иммунную реакцию. Поэтому при наличии лейкоцитов-пассажира в аллотрансплантате он разрушается быстрее. В разрушении трансплантата участвуют Тх 2 и 1 типа, а также особые иммунные CD28-киллеры, которые осуществляют прямой киллинг клеток доно-

ра. Цитокины, выделяемые Тх, вызывают воспаление и повреждение сосудов трансплантата.

Антитела и комплемент имеют меньшее значение и участвуют в реакции при вторичной трансплантации от того же донора.

Основное правило трансплантации гласит: трансплантат приживается, если не отличается по антигенам от реципиента, отторгается – если есть отличие. HLA-DR антигены более иммуногенны, чем HLA-B, а последние сильнее HLA-A. Поэтому наиболее важна совместимость по HLA-DR антигенам.

Для уменьшения реакции отторжения проводится подбор *донора* для *реципиента*, наиболее совместимого по *HLA-антигенам*.

При пересадках органов и тканей учитывают прежде всего совместимость по четырем HLA-локусам: *HLA-A, HLA-B, HLA-DR* и *HLA-DQ*. Для этого проводят тканевое типирование - определение HLA-антигенов с помощью панели антител против них. HLA-антигены выявляют на В-лимфоцитах донора и реципиента в микроцитотоксическом тесте (антитела + лимфоциты + комплемент). Повреждение клеток указывает на наличие соответствующего антигена. HLA-DR антигены определяют в реакции смешанной культуры лимфоцитов, где лимфоциты реципиента (неизвестный HLA фенотип) стимулируют лимфоцитами с известным HLA-фенотипом.

После подбора *донора* по основным HLA-антигенам возникает слабая реакция отторжения на другие антигены, которую подавляют с помощью кортикостероидов и иммунодепрессантов. Эти средства используются в практике аллотрансплантации различных органов (почек, сердца, печени и др.). Однако при пересадках аллогенного костного мозга необходима полная антигенная совместимость донора и реципиента, так как помимо обычного отторжения, в данной ситуации может возникнуть *«реакция трансплантат против хозяина»*. Сущность ее в том, что несовместимые Т-лимфоциты доноров «отторгают» антигены реципиента, находящегося в состоянии иммунодепрессии. Для получения совместимого костного мозга существуют «регистры типированных доноров». В файле «Всемирный донор» представлены данные на более 6 млн типированных доноров разных стран. Однако, необходимо не менее 10 млн типированных доноров, чтобы среди них найти совместимого с конкретным реципиентом.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Инфекция.
2. Динамика инфекционного процесса.
3. Экзотоксины, эндотоксины.
4. Особенности антибактериального, противовирусного иммунитета.
5. Аллергия. Определение, стадии развития.
6. Классификация аллергии.
7. Повышенная чувствительность немедленного типа.
8. Повышенная чувствительность замедленного типа.
9. Псевдоаллергические реакции.
10. Виды иммунопатологии.

11. Классификация иммунодефицитов, первичные иммунодефициты.
12. Вторичные иммунодефицитные заболевания.
13. ВИЧ-инфекция.
14. Специфическая и неспецифическая иммунодиагностика.
15. Неспецифические показатели иммунного статуса.
16. Специфические показатели иммунного статуса.
17. Причины и механизмы развития аутоиммунных заболеваний.
18. Аутоантитела и их эффекты.
19. Реакции трансплантационного иммунитета.

ПРАКТИКУМ

Работа 1. Методы разделения клеток

Для изучения функциональной активности лимфоцитов и других клеток крови необходимы эффективные способы их разделения (рис. 1).



Рис. 1. Основные методы разделения клеток.

Среди разнообразных способов разделения клеток крови наибольшее распространение получили гравитационные, основанные на различной удельной плотности клеток крови, которые различаются между собой следующим образом: эритроциты > нейтрофилы и эозинофилы > лимфоциты и моноциты > тромбоциты.

Выделение лейкоцитов

Принцип метода. Для осаждения эритроцитов из периферической крови применяют растворы декстрана, желатины и др. Гепаринизированную кровь смешивают с 6% раствором декстрана или 0,3% раствором желатины в соотношении 1:5. Смесь в пробирке отстаивают 30-40 мин под углом 45° в термостате при температуре 37 °С до осаждения эритроцитов. Плазму, обогащенную лейкоцитами, отбирают, примесь эритроцитов лизируют. Выделенные клетки отмывают центрифугированием в растворе Хенкса или культуральной среде 199 при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Выделение мононуклеарных клеток

Мононуклеарные клетки выделяют из периферической крови человека по методу, основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина. Фиколл в данной смеси выступает как агент, агрегирующий эритроциты, а изопак (или урографин) нужен для создания изотоничности и плотности $1,077 \text{ г/см}^3$.

Принцип метода. Гепаринизированную кровь разводят в 3 раза культуральной средой и аккуратно наслаивают на градиент фиколлурографина. Кровь задерживается над фиколлом и не смешивается с ним. Постепенно **эритроциты** склеиваются фиколлом и опускаются на дно пробирки. **Гранулоциты**, имеющие плотность большую, чем седиментирующий раствор, оседают вместе с эритроцитами. **Лимфоциты вместе с моноцитами** остаются в интерфазе, их собирают, переносят в другую пробирку и отмывают центрифугированием. Метод не дает выхода более 90% клеток.

Ход работы:

1. 10 мл гепаринизированной крови человека (20-25 ЕД гепарина на 1 мл крови) разводят в 3 раза (1 часть крови и 2 части питательной среды 199).
2. Разведенную кровь наслаивают на раствор фиколл-урографина (плотность $1,077 \text{ г/см}^3$) в соотношении 1:3 (1 часть фиколла и 3 части разведенной крови). Кровь остается над раствором фиколла и не смешивается с ним.
3. Проводят центрифугирование при комнатной температуре в течение 45 мин на центрифуге с горизонтальным ротором при 400 g .

Следует иметь в виду, что для определения необходимого числа оборотов в конкретных условиях центрифугирования или получения соответствующего центростремительного ускорения одну из необходимых величин (ускорение или число оборотов) находят по формуле:

$$g = 1,1 \times n^2 \times r \times 10^5,$$

где g – центростремительное ускорение; n – число оборотов в минуту; r – радиус от центра оси до границы разделяемых сред.

4. После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, **содержащее мононуклеарные клетки**, в отдельную пробирку. Эритроциты склеиваются фиколлом и оседают на дно пробирки вместе с гранулоцитами (рис. 2).

5. Суспензию мононуклеарных клеток трижды отмывают средой 199, центрифугируя по 10 мин при 200 g .

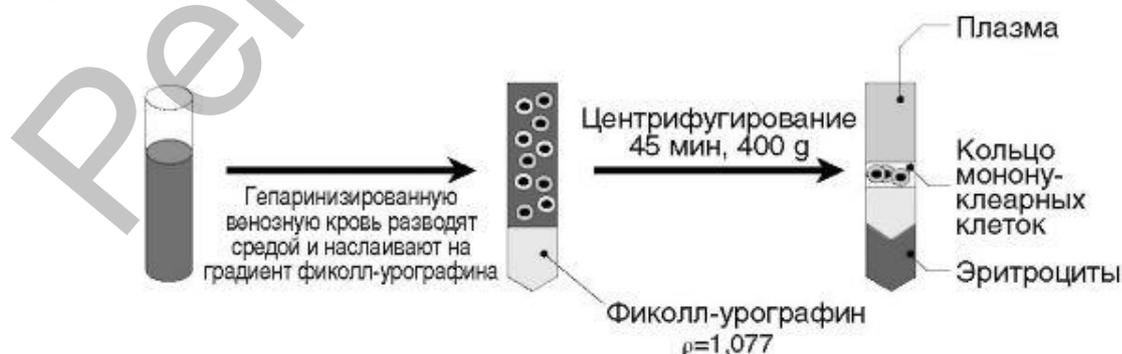


Рис. 2. Выделение мононуклеарных клеток в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина.

6. Клетки ресуспендируют в 1 мл культуральной среды. Подсчет клеток осуществляют в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяют с помощью 0,1% раствора трипанового синего. Необходимо подсчитать процент выхода жизнеспособности клеток (более 90%). Для этого подсчитывают начальное количество клеток и количество выделенных клеток:

$$\text{Процент выхода лимфоцитов} = \frac{\text{Количество выделенных клеток}}{\text{Исходное количество клеток}} \times 100\%$$

Выделение моноцитов

Лабораторные методы выделения моноцитов разнообразны, но основные методические приемы преимущественно связаны с фракционированием моноцитов по способности прилипать к стеклу или пластиковой поверхности или по способности при центрифугировании к локализации в определенных зонах ступенчатого градиента.

Выделение моноцитов по способности прилипать к стеклу или пластику

Принцип метода. Для получения моноцитов мононуклеарные клетки, выделенные в одноступенчатом градиенте фиколлюрографина, разделяют на прилипающие клетки (ПК) и неприлипающие клетки (НПК), используя способность клеток моноцитарно-макрофагального ряда прилипать к стеклу и пластику. Для этого суспензию мононуклеаров в концентрации 2×10^6 кл/мл культивируют в среде 199, содержащей 20% сыворотку эмбриона коровы (СЭК), при 37 °С в пластиковых чашках Петри. Через 40 мин собирают НПК, а ПК снимают со дна чашки охлажденным (4-6 °С) раствором Версена, который заливают по 1 мл в чашку сразу после удаления надосадочной жидкости. Через 1-2 мин собирают ПК, помещают в силиконированные центрифужные пробирки и центрифугируют при 200 g в течение 10 мин. Удаляют надосадочную жидкость и ПК ресуспендируют в среде 199 с 10% СЭК.

Выделение нейтрофилов в двойном градиенте плотности фиколлюрографина

Принцип метода. Для предотвращения активации нейтрофилов во время выделения рекомендуется проводить все манипуляции при 4 °С. Используют фиколлюрографин $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$. Вначале создают двойной градиент фиколлюрографина: первым в пробирку вносят раствор фиколлюрографина, имеющий плотность $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, затем на него аккуратно наслаивают раствор фиколля с плотностью $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$. Гепаринизированную кровь наслаивают на двойной градиент фиколлюрографина, центрифугируют 45 мин при 400 g. После центрифугирования получают кольца мононуклеарных клеток (верхнее) и нейтрофилов (нижнее), а в осадке находятся эритроциты (рис. 3). Полученное кольцо мононуклеарных клеток в зависимости от характера эксперимента удаляют или отбирают в чистую центрифужную пробирку и отмывают культуральной средой. Нейтрофильное кольцо отбирают и переносят в чистую пробирку, содержащую среду, свободную от ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . Клетки дважды отмывают, центрифугируя 10 мин при 200 g. Присутствующие эритроциты можно лизировать.

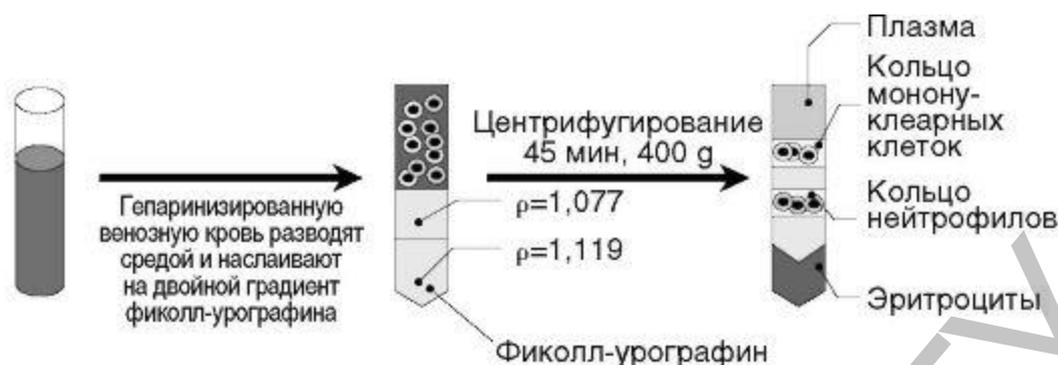


Рис. 3. Выделение нейтрофилов в двухступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина.

Работа 2. Аналитическая и препаративная цитофлуориметрия

Принцип метода проточной цитофлуориметрии. Используются проточные цитометры разных фирм. При проведении исследования клетки, окрашенные тем или иным флуоресцентным красителем, вводят с потоком буферного раствора в вибрирующую проточную камеру с форсункой. В каждой капле жидкости, выходящей из форсунки, содержится одна клетка. Источник света (чаще всего лазер) освещает отдельные клетки в проходящей через световой пучок тонкой струе жидкости. Исходный световой луч рассеивается клеткой. Это рассеяние измеряется с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Рассеяние света под малыми углами (переднее рассеяние – *forward scatter*) может быть использовано для определения размеров клетки. На основе данного параметра можно отличить жизнеспособные ядерные клетки от мертвых

Рассеяние света под углом 90° (боковое рассеяние – *side scatter*) позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы и наличии гранул в клетке. Полученные характеристики позволяют разделить анализируемые лейкоциты на лимфоциты, моноциты, нейтрофилы (рис. 4).

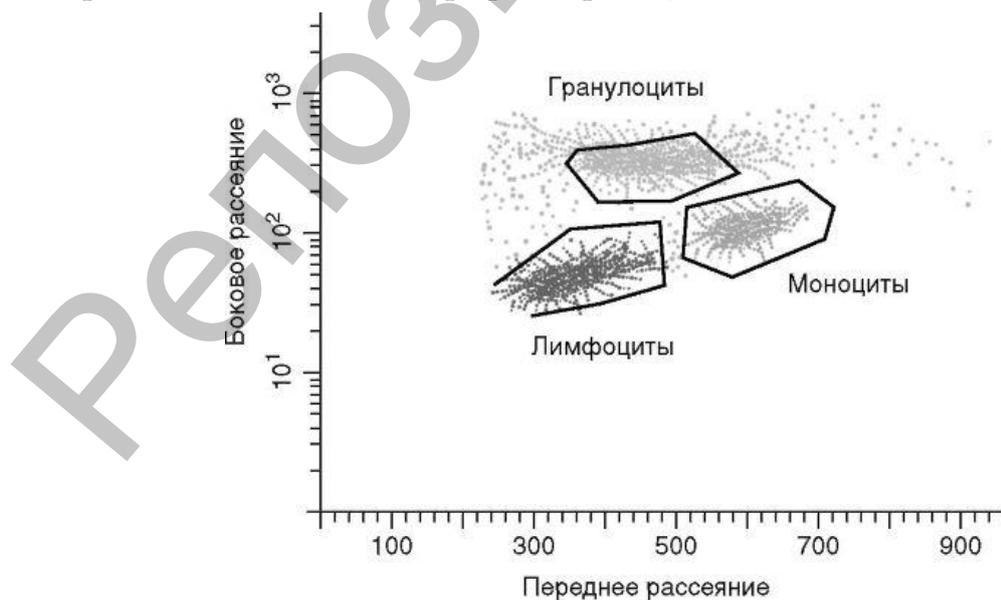


Рис. 4. Выделение окон лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов по светорассеянию.

Одновременно можно проводить анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов клеток с помощью моноклональных антител к ним, конъюгированных с различными флуоресцентными метками. Если анализируемая клетка содержит флуорохром, то он испускает излучение соответствующих параметров, при этом интенсивность флуоресценции коррелирует с плотностью антигена на клеточной поверхности, а уровень флуоресценции измеряется с помощью ФЭУ.

В практике широко используются два флуоресцентных красителя – флуоресцеин-5-изотиоционат (ФИТЦ) и R-фикоэритрин (ФЭ). Они возбуждаются аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и излучают флуоресценцию в разных диапазонах волн: ФИТЦ излучает свет в «зеленом» спектре, а ФЭ – в «оранжево-красном». Красители различаются как по специфичности их молекулярного связывания, так и по оптическим характеристикам, таким, как спектр поглощения, возбуждение флуоресценции и др. В настоящее время спектр используемых флуорохромов расширился.

Система сбора и обработки данных

Сигналы, поступающие от детекторов, усиливаются, их амплитуды измеряются и анализируются в цифровой форме для каждой клетки отдельно. Ограничения, накладываемые на регистрируемый параметр, называются окнами («gate»). Окна выделяются автоматически или вручную (рис. 4). Результаты анализа используются для построения распределений исследованных клеток по их характеристикам. Эти распределения называют гистограммами.

Современные проточные цитометры обладают высокой чувствительностью, высоким уровнем автоматизации, просты в эксплуатации, имеют небольшие размеры (рис. 5).



Рис. 5. Проточный цитофлуориметр.

Проточная цитометрия стала незаменимым методом диагностики различных иммунопатологических состояний в клинической практике.

Метод позволяет проводить иммунофенотипирование клеток – дифференцировать популяции лейкоцитов, определять субпопуляционный состав лимфоцитов.

Количественное определение субпопуляций лимфоцитов с помощью проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител

Фенотипирование лимфоцитов широко применяется в клинической иммунологии. В основе метода лежит взаимодействие моноклональных антител, меченных флуоресцентной меткой, с поверхностными антигенами лимфоцитов и последующий анализ образцов на проточном цитометре. Возможно использование одного моноклонального антитела, меченного флуорохромом, или двух различающихся по специфичности моноклональных антител, меченных разными флуорохромами (рис. 6). Определяют процент клеток, несущих на своей поверхности искомый антиген, и среднюю интенсивность свечения, которая характеризует выраженность экспрессии исследуемого антигена. Для проведения исследования можно использовать как цельную кровь, так и предварительно выделенные из периферической крови обследуемого лейкоциты или мононуклеарные клетки. Разработаны многоцветовые цитометры.

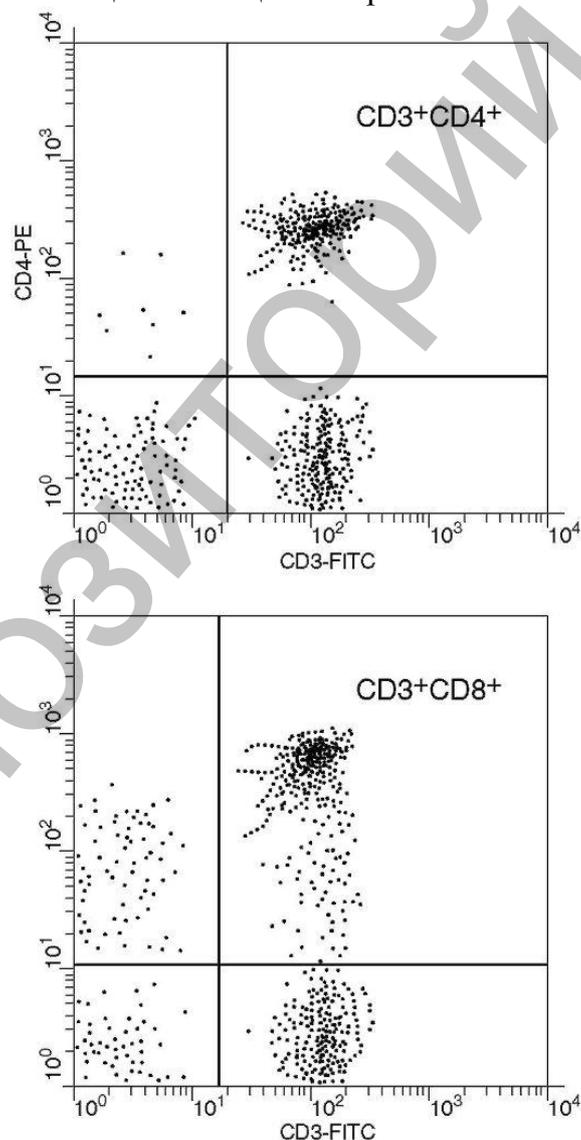


Рис. 6. Дот-анализ: двойное окрашивание по CD3 и CD4.

Выделение клеток методом проточной цитометрии

На основе параметров, измеряемых с помощью проточной цитометрии, можно проводить сепарацию клеток. Проанализированные клетки перемещаются в каплю, которой придается положительный/отрицательный заряд. Капли с флуоресцирующими клетками заряжаются положительно, а с нефлуоресцирующими – отрицательно. Капля проходит между противоположно заряженными электродами и отклоняется вправо или влево в зависимости от своего заряда. Уровень чистоты клеточных фракций, разделенных с помощью клеточного сортера, достигает до 99%.

Работа 3. Методы иммуноанализа

Термин «иммуноанализ» применяют к методам исследований, в которых ключевыми взаимодействующими субстанциями являются исходно растворимые «антиген» (или лиганд) и «антитело». В более чем 99% современных тест-систем иммуноанализов один из компонентов (либо антиген, либо антитело) сорбирован на твердой фазе, но сорбированы они из исходно растворимого состояния. Иммуноанализ используют с диагностическими целями практически во всех отраслях медицины, а также в ветеринарии и биологии.

Методы определения преципитатов антител с антигенами в геле

Встречная иммунодиффузия по Оухтерлони и Элек – методика двойной, или встречной, иммунодиффузии, т.е. диффузии антител и антигенов навстречу друг другу в геле. В методике используют физико-химические свойства агарового геля, поры которого имеют размеры, достаточные, чтобы пропустить (дать возможность диффундировать) молекулы свободных антител и многих растворимых антигенов, но задерживающие более крупные по размеру комплексы антител с антигенами. В результате в месте встречи антител с антигенами выпадает осадок; в геле он виден невооруженным глазом как полоса преципитации. Концентрацию агар-агара – 1,25–1,5%.

Ход работы:

1. Агар растворяют в физиологическом растворе при 56 °С (температура плавления агара).
2. В виде золя агар выливают на плоское стекло. При охлаждении до комнатной температуры агар застывает в гель.
3. В застывшем геле пробивают трубочкой-пробойником правильные круглые отверстия (лунки) небольшого диаметра (~2-3 мм).
4. В эти лунки вносят образцы антисыворотки и растворы антигенов.
5. Оставляют на диффузию в течение 16-24 ч, по истечении которых можно наблюдать полосы преципитации, если в исследуемых образцах присутствовали комплементарные друг другу лиганды.

Метод Оухтерлони и Элека иллюстрирует рис. 7.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини – методика радиальной иммунодиффузии (РИД) в том же агаровом геле для количественного определения содержания в крови (в сыворотке) иммуноглобулинов классов А, G и М. Температура плавления агар-агара недалеко от физиологических температур теплокровных животных, и белки (по крайней мере, иммуноглобулины) не претерпевают калечащую денатурацию при температуре плавления агара. Это позволило вве-

сти в состав золь агар, т.е. в жидкую фазу, антисыворотки против иммуноглобулинов разных изотипов, тщательно перемешать раствор перед заливанием на стеклянную пластину. Таким образом, в слое агарового геля оказываются застывшими антииммуноглобулиновые антиизотипические антитела. В таком геле пробивают круглые луночки, в которые вносят так называемые стандарты (или калибраторы, т.е. растворы иммуноглобулинов с известной концентрацией для построения калибровочной кривой) и пробы испытуемых сывороток и оставляют на свободную диффузию на 16–24 ч.

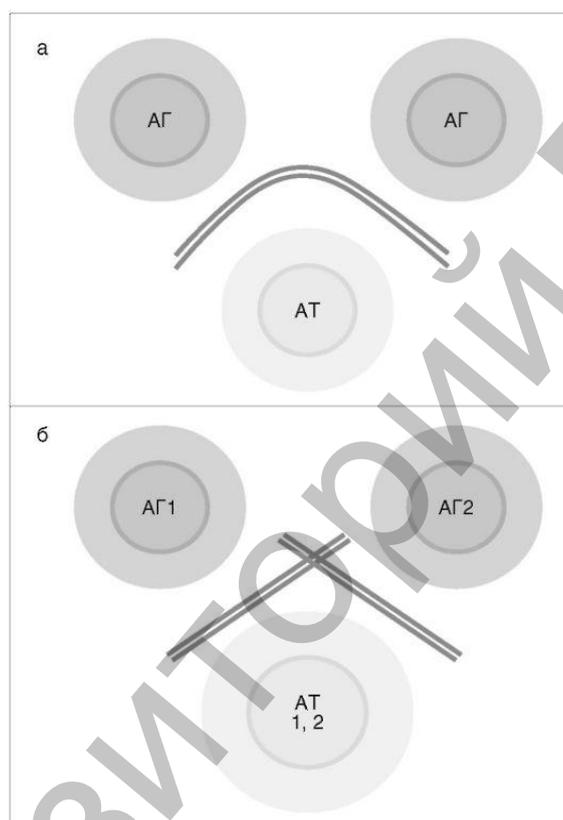


Рис. 7. Метод Оухтерлони и Элека: а – линии преципитации, при диффузии двух одинаковых антигенов (АГ) навстречу антителам (АТ), плавно сливающиеся друг с другом; б – линии преципитации, при диффузии двух разных антигенов навстречу антителам, не сливающиеся, а пересекающиеся между собой, «не замечающие» друг друга.

По истечении этого времени вокруг луночек образуются видимые невооруженным глазом кольца преципитатов. Диаметр колец преципитатов тем больше, чем выше концентрация данного изотипа иммуноглобулинов в исследуемой биопробе. Калибраторы – препараты иммуноглобулинов заданного изотипа с известной весовой концентрацией (мг/мл) – позволяют построить калибровочную кривую и с ее помощью определить концентрации иммуноглобулинов в испытуемых пробах сывороток (рис. 8).

Метод РИД применим только для названных изотипов иммуноглобулинов (М, А и G), ибо их физиологические концентрации в сыворотках крови попадают в пределы чувствительности метода (мг/мл). Изотипы IgD и IgE присутствуют

в нормальных сыворотках в таких низких концентрациях, которые метод РИД не «видит». Концентрации IgE определяют с помощью высокочувствительных вариантов иммуноферментного анализа – ИФА.

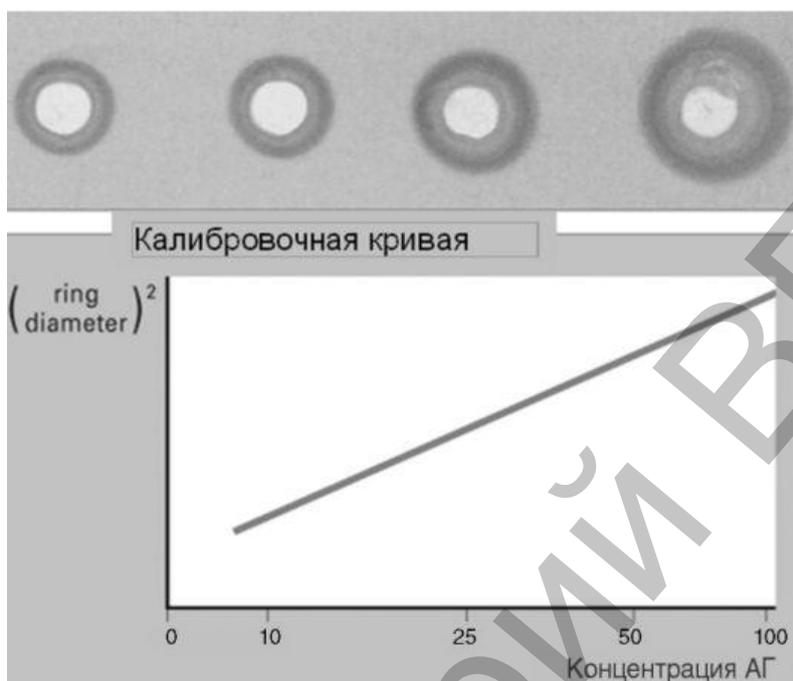


Рис. 8. Внешний вид стеклов с результатами РИД и калибровочная кривая.

Иммуноэлектрофорез – методика, которая представляет собой комбинацию электрофоретического разделения белковых смесей и метода Оухтерлони и Элека. В геле с одного края пластины пробивают ряд из несколько лунок, в которые вносят исследуемые на содержание тех или иных интересующих белков растворы или сыворотки пациентов. К пластине с гелем прикладывают электрическое поле и проводят электрофорез. По завершении электрофореза в геле в центре пластины вырезают канавку, параллельную направлению движения белков в электрическом поле. В эту канавку вносят антисыворотку или смесь антител против искомым белков и оставляют на 16-24 ч для диффузии, после чего регистрируют образующиеся полосы преципитации. Число полос преципитации показывает, к какому количеству компонентов, находящихся в биопробе, в антисыворотке есть комплементарные антитела. Если при электрофорезе использовать калибраторы, т.е. известные белки в достаточных концентрациях, то сравнение полос преципитации материала из биопроб с полосами преципитации с калибровочными белками указать на наличие в испытуемом материале конкретного белка(ов) (рис. 9).

«Ракетный» иммуноэлектрофорез

Если к гелю на стеклах, полностью подготовленных для выполнения метода радиальной иммунодиффузии, приложить электрическое поле, то движение компонентов сывороток, в том числе иммуноглобулинов, из лунок в толщу геля будет происходить не в режиме спонтанной диффузии, а в принудительном режиме по силовым линиям электрического поля, что существенно ускоряет процесс. В результате преципитаты станут видны уже примерно через 1 ч, но будут иметь форму не колец, а вытянутых пиков, напоминающих летательные аппара-

ты – ракеты. Такую модификацию метода иммунодиффузии называют «ракетным» иммуноэлектрофорезом. Внешний вид результатов «ракетного» иммуноэлектрофореза показан на рис. 10.

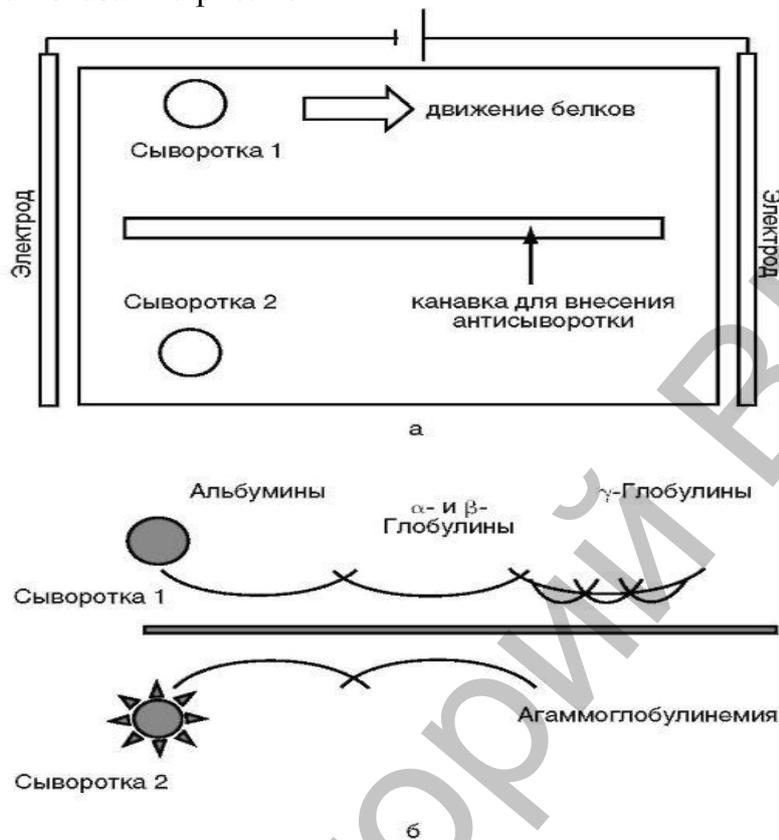


Рис. 9. Схема иммуноэлектрофореза по Грабару и Уиллиамсу: а – схема установки; б – результаты электрофореза.

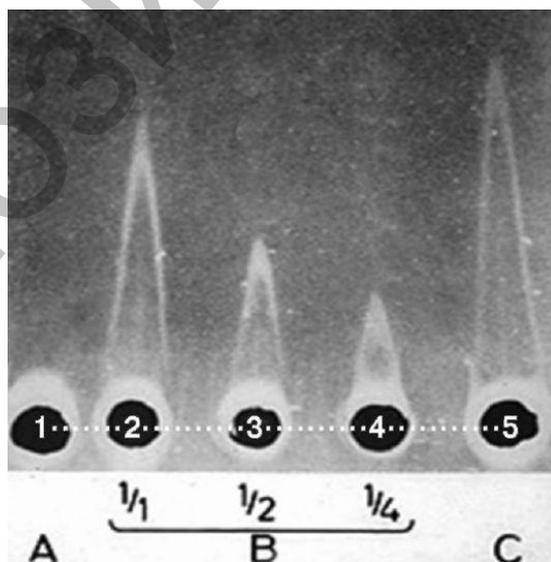


Рис. 10. «Ракетный» иммуноэлектрофорез: 1 – пациент с агаммаглобулинемией; 2, 3, 4 – калибровочные растворы иммуноглобулинов; 5 – пациент с гипергаммаглобулинемией (возможна миеломная болезнь).

Иммуноферментный и радиоиммунный анализы

В основе самых распространенных на сегодня методов иммуноанализов, базирующихся на количественном определении растворимых веществ, лежит взаимодействие антигена с антителом (т.е. иммунологическое распознавание), которое детектируется (визуализуется) с помощью специальной метки, заранее конъюгированной либо с антителом, либо с антигеном. В качестве меток используют вещества, которые при определенных условиях тот или иной прибор может «увидеть» (зарегистрировать) и измерить количество метки: 1. Радионуклид используется при радиоиммунном анализе (РИА).

2. Ферменты, катализирующие превращение *бесцветного* субстрата в *цветной* или *флюоресцирующий* продукт. В данном случае исследование называют иммуноферментным анализом (ИФА), его разновидность – анализ иммуноферментно-флюоресцентный.

3. Флюоресцирующие, люминесцирующие вещества и др.

Иммуноанализы проводят в гомогенных (без разделения компонентов в растворе) и твердофазных (сорбция антигенов или антител из раствора на носитель) вариантах. Последний вид анализов называют твердофазными, или иммуносорбентными (англ. ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay). Технологически твердофазные анализы несравнимо удобнее гомогенных тестов. В настоящее время твердофазные варианты ИФА применяют в 99,9% тест-систем. Белки хорошо сорбируются на подобранных для ИФА/РИА пластмассовых материалах. Все остальные реагенты тест-систем используют в виде растворов. Их добавляют к твердой фазе поочередно, инкубируют, после чего несвязавшиеся реагенты легко удаляют промывкой твердой фазы. В этом главное технологическое преимущество твердофазного иммуноанализа. Результат реакции «остается» на твердой фазе и регистрируется количественно. Анализ видут в специальных планшетах (рис. 11).

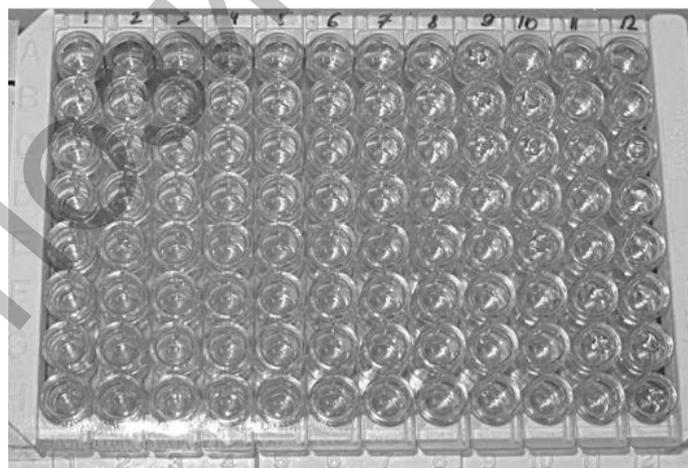


Рис. 11. Планшет с результатами ИФА.

Существует много вариантов конструкций тест-систем для иммуноанализов:

Прямыми называют анализы, в которых метку присоединяют непосредственно либо к заданному антигену, либо к антителу, специфичному против искомого антигена.

«Сэндвич»-ИФА разработан для антигенов, на которых есть не менее двух неперекрывающихся эпитопов. Против обоих эпитопов получают в качестве реагентов специфичные антитела. Антитела к одному из эпитопов сорбируют на твердой фазе. Испытуемую пробу добавляют к твердой фазе, инкубируют, отмывают. После отмывки вносят конъюгат антител ко второму эпитопу с ферментом. Ферментативная активность, остающаяся на твердой фазе, *прямо пропорциональна* содержанию антигена в пробе.

При **иммунометрическом анализе** в пробирку с испытуемой пробой, предположительно содержащей определяемый антиген, вносят заведомый избыток меченых антител. Затем к этой смеси добавляют также заведомый избыток иммобилизованного на мелкодисперсной твердой фазе антигена. После инкубации центрифугированием отделяют растворимую фракцию (супернатант) и в ней измеряют ферментативную активность (если метка – фермент). Ферментативная активность супернатанта *прямо пропорциональна* содержанию антигена в испытуемой биопробе.

Непрямым иммуноанализом называют анализ, в котором метку присоединяют не к целевому антигену и не к антителу против целевого антигена, а к так называемым вторым антителам – антивидовым антииммуноглобулиновым антителам, т.е. антителам к иммуноглобулинам того вида животных или человека, с биологическим материалом которого работают.

Таким образом, один и тот же препарат конъюгата антиглобулиновых антител с ферментом используют в качестве проявляющего стандартного реагента в разных тест-системах для определения различных конкретных антигенов или антител. Вместо антивидовых антиглобулиновых антител для конъюгации с ферментом может быть использован, например, протеин А стафилококка, который по своей природе с высокой аффинностью связывается с иммуноглобулинами класса G некоторых видов млекопитающих, включая человека. Непрямые варианты ИФА не требуют очистки искомым антигенов или антител. Чистым должен быть только препарат антивидовых антииммуноглобулиновых антител.

Твердофазный непрямоиммуноферментный анализ

1. На твердую фазу стандартных 96-луночных планшетов сорбируют заданные антигены. В большинстве тест-систем используют в качестве антигенов либо рекомбинантные белки, либо синтетические пептиды, реже – компоненты лизата натуральных вирусов. Антигены растворяют до конечной концентрации 1–10 мкг/мл или опытным путем подбирают более подходящие концентрации, чаще всего в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере при pH 9,6.

Для приготовления 1 л буферного раствора берут 0,015 М (1,59 г) Na_2CO_3 и 0,035 М, 94 г NaHCO_3 и растворяют в воде.

Раствор АГ вносят в лунки планшетов в объеме 50-100 мкл.

Существуют другие варианты посадочных буферов, например фосфатно-солевой буфер, pH 7,2 (PBS).

Для приготовления 1 л раствора PBS берут 0,0025 М дигидрофосфата натрия (0,345 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, MW 137,99); 0,0075 М гидрофосфата натрия (2,68 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, MW 358,14) и 0,145 М хлористого натрия (8,474 г NaCl , MW 58,44).

Время, отводимое на сорбцию, подбирают опытным путем. Как правило, достаточно 12-16 ч при комнатной температуре или при +4 °С.

2. Лунки планшета тщательно промывают фосфатно-солевым буфером или водой с детергентом (0,1% Tween-20) 5–10 раз. В современных лабораториях процедуры отмывки осуществляют в аппаратах типа «вошер» (англ. to wash – мыть).
3. В некоторых случаях на следующем этапе в лунки вносят 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) или иного консервативного белка, например казеина, для так называемой «забивки» не покрытых антигеном площадей на дне лунок. Инкубируют 30–60 мин, после чего отмывают.
4. В лунки вносят исследуемые образцы биопроб в тех или иных разведениях. Для каждого разведения используют 2–3 лунки («параллели»). В качестве разводящей жидкости применяют PBS. В некоторых случаях в него добавляют 1% БСА. Инкубируют 1 ч и дольше. Время либо подбирают опытным путем, либо следуют инструкции к коммерческой тест-системе.
5. Отмывают (как описано выше).
6. Вносят конъюгат антииммуноглобулиновых антител с ферментом в заранее подобранном рабочем разведении или по инструкции к тест-системе. Инкубируют 1 ч.
7. Отмывают (как описано выше).
8. Вносят в лунки раствор субстрата того фермента, который входит в состав антииммуноглобулинового конъюгата. Если фермент – пероксидаза хрена, то субстратами могут быть ортофенилендиамин и перекись водорода. Эти субстраты растворяют в 0,1 М цитрат-фосфатном буфере, pH 5: цитрат \times H₂O 0,0347 М (7,3 г/л, Mm 210,14); гидрофосфат натрия 0,0667 М (Na₂HPO₄ \times 12 H₂O 23,87 г/л, Mm 358,14). На один планшет требуется 10 мл раствора. С небольшим запасом к 12 мл субстратного буфера добавляют 8 мг ортофенилендиамина и 5 мкл 30% перекиси водорода, быстро растворяют и раскапывают по лункам.
9. Через 15–30 мин в лунках, где произошла реакция «антиген-антитело», появится желто-коричневая окраска. Другие лунки останутся бесцветными. Для остановки ферментативной реакции в лунки вносят по 50 мкл 1 М раствора серной кислоты (55,5 мл 96 серной кислоты на 900 мл воды; **строго добавлять кислоту в воду, а не наоборот!!!**).
10. Интенсивность ферментативной реакции измеряют в единицах величины оптической плотности на спектрофотометрах, приспособленных для планшетов («мультисканах»). Для ортофенилендиамина длина волны проходящего света должна быть 492 нм (для тетраметилбензидина – 450 нм). В связи с этим в мультискане устанавливают соответствующий светофильтр.
11. Современные спектрофотометры оснащены программным обеспечением, в котором предусмотрен автоматический расчет средних значений между параллелями и сравнение опытных показателей с показателями в контрольных лунках. Если такого обеспечения нет, то результаты анализируют «вручную».

Оптическую плотность (OD – optical density) в контрольных лунках принимают за некий «фон». Эти показатели умножают на 2; такую величину условно принимают за «линию раздела» – границу (cut off) между положительными и отрицательными значениями OD: значения ниже «cut off» считают отрицательными, значения выше «cut off» – положительными, значения, близкие к «cut off», – неопределенными, или «серой зоной».

Характеристика иммуноанализов

Основные характеристики тест-систем иммуноанализов:

Чувствительность иммуноанализа – это параметр, всегда привязанный к конкретной тест-системе, а не только к принципу метода.

$$\text{Диагностическая чувствительность тест-системы} = \frac{\text{N истинно позитивные}}{\text{N истинно позитивные} + \text{N ложнонегативные}} \times 100\%.$$

Специфичность диагностической тест-системы – параметр, характеризующий ее распознавательные возможности в отношении именно данного заболевания, которое она «не путает» с другими.

$$\text{Специфичность} = \frac{\text{N истинно негативные}}{\text{N истинно негативные} + \text{N ложнопозитивные}} \times 100\%.$$

Диагностическая эффективность – это параметр, характеризующий возможности данной тест-системы одновременно правильно определять позитивные пробы как позитивные, а негативные пробы – как негативные.

$$\text{Эффективность тест-системы} = \frac{\text{N истинно негативные} + \text{N истинно позитивные}}{\text{N истинно позитивные} + \text{N ложнопозитивные} + \text{N истинно негативные} + \text{N ложнопозитивные}} \times 100\%.$$

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Игнатъева, Г.А. Методические указания к практическим занятиям по иммуноанализам / Г.А. Игнатъева [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. Хайтов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хайтов, Г.А. Игнатъева, 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.