

Иммунология – наука, изучающая реакции системы иммунитета организма в ответ на нарушения постоянства его внутренней среды

Центральные понятия иммунологии:

- ❑ антигены
- ❑ антитела
- ❑ рецепторы
- ❑ цитокины

□ **Антигены** – любые вещества, чаще белки или гликопротеиды, которые, попадая в организм, вызывают образование специфических антител и/или Т-клеточных рецепторов

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

□ **Рецепторы** – макромолекулы на клетках, специфически связывающие различные биологически активные вещества (*лиганды*)

□ **Цитокины** – медиаторы межклеточных взаимодействий, обеспечивающие взаимосвязь клеток внутри системы иммунитета и с другими системами макроорганизма

Иммунитет – эволюционно

обусловленная совокупность реакций взаимодействия между системой иммунитета и биологически активными агентами (антигенами)

Эти реакции направлены на сохранение гомеостаза и результатом их могут быть различные феномены и реакции иммунитета

Полезные феномены:

- **Противоинфекционный иммунитет** – невосприимчивость организма к конкретным инфекционным агентам возбудителям заболеваний (микробам, вирусам)
- **Толерантность** – терпимость, неотвечаемость системы иммунитета на эндогенные или экзогенные антигены

Патологические феномены:

- *Гиперчувствительность* – повышенная реакция СИ на антигены-аллергены – приводит к развитию двух видов патологии: *аллергии и аутоиммунных процессов*
- *Анергия*, т.е. отсутствие реакции на антигены (вариант толерантности), обусловлена недостаточностью различных видов иммунитета

Основой всех реакций иммунитета является ***иммунологическая память***: клетки системы иммунитета "помнят" о тех чужеродных веществах, с которыми они встречались и на которые реагировали

Виды иммунитета

Видовой иммунитет
(конституциональный,
наследственный) – вариант
неспецифической резистентности
организма, генетически обусловленный
особенностями обмена веществ данного
вида, **не является истинным иммунитетом**, так
как не осуществляется системой иммунитета

Естественный врожденный иммунитет

(неспецифические естественные факторы иммунитета):

Гуморальные факторы:

- ❑ система комплемента, С-реактивный белок, фермент лизоцим, интерфероны, цитокины и др.
- ❑ естественные, предсуществующие антитела, исходно имеются в организме в небольшом количестве против многих бактерий и вирусов

Клеточные факторы:

- ❑ фагоциты (моноциты, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты), которые проявляют свою активность во всех тканях, полостях, могут выходить на поверхность слизистых оболочек и там выполнять защитную функцию

Приобретенный (адаптивный) иммунитет

возникает в течение жизни каждого индивида, может быть противоинфекционный и неинфекционный

Противоинфекционный: антимикробный (стерильный, нестерильный), антивирусный, антитоксический, антипротозойный

- ❑ **Естественный активный иммунитет** появляется в результате контакта с возбудителем (после перенесенного заболевания или после скрытого контакта без проявления симптомов болезни)
- ❑ **Естественный пассивный иммунитет** возникает в результате передачи от матери к плоду через плаценту (трансплацентарный) или с молоком готовых защитных факторов – лимфоцитов, антител, цитокинов и т.п.

□ ***Искусственный активный иммунитет***

возникает после введения в организм вакцин и анатоксинов, которые содержат микроорганизмы или их субстанции – антигены

□ ***Искусственный пассивный иммунитет***

создается после введения в организм ГОТОВЫХ АНТИТЕЛ или ИММУННЫХ КЛЕТОК

Виды неинфекционного иммунитета:

- **Трансплантационный** иммунитет возникает при пересадке органов и тканей от донора к реципиенту, в случаях переливания крови и иммунизации лейкоцитами. Эти реакции связаны с наличием индивидуальных наборов молекул на поверхности лейкоцитов — человеческих лейкоцитарных антигенов — HLA. Набор этих молекул идентичен только у однояйцовых близнецов

- **Репродуктивный** иммунитет в системе "мать-плод". Это совокупность реакций матери на антигены плода, так как он отличается по ним за счет продуктов генов, полученных от отца
- Толерантность матери поддерживается за счет местной системы иммунитета плаценты, которая формирует иммуносупрессивные факторы

Выживаемость плода обеспечивают:

- особая организация тканей между матерью и плодом (трофобласт и др.)
- защитное влияние АТ против АГ плода
- блокирующее действие комплексов АГ-АТ
- супрессивное влияние на клетки СИ плацентарных белков и гормонов, возникших при беременности
- супрессивное действие лимфоцитов плода
- блокирующие АТ у беременных против HLA-DR-антигенов

Противоопухолевый иммунитет

направлен против антигенов опухолевых клеток и включает:

1. естественный неспецифический иммунитет

- естественные киллеры
- активированные макрофаги и гранулоциты
- ФНО α , γ -интерферон
- тромбоциты (медиаторы и цитотоксин)

приобретенный специфический противоопухолевый иммунитет

- ❑ лизис компонентом опухолевых клеток, покрытых антителами (в основном в крови)
- ❑ лизис лейкоцитами опухолевых клеток, покрытых антителами (антителозависимая цитотоксичность), а также их фагоцитоз
- ❑ Лизис специфичными Т-клетками-киллерами
- ❑ антипролиферативное действие специфичных В-лимфоцитов

Факторы неэффективности противоопухолевого иммунитета

- скорость размножения опухолевых клеток выше, чем формирование эффекторов иммунитета
- лейкоциты, связавшие противоопухолевые антитела, взаимодействуют не с мембранами опухолевых клеток, а с растворимыми опухолевыми антигенами

- ❑ **Опухоль** выделяет цитокины, подавляющие иммунный ответ, экспрессию НЛА молекул, блокирующие активность цитотоксических лимфоцитов
- ❑ постоянно секретирует толерогенные дозы антигенов
- ❑ экспрессирует молекулы, индуцирующие апоптоз лимфоцитов
- ❑ связывает иммуноглобулины антитела через Fc-рецепторы

Аутоиммунитет («аутоаллергия») –

реакции системы иммунитета на собственные антигены (белки, липопротеиды, гликопротеиды).

Это обусловлено нарушением распознавания «своих» молекул, когда они воспринимаются системой иммунитета как «чужие» и разрушаются

Система иммунитета (СИ) – совокупность молекул, клеток, тканей и органов, осуществляющих иммунные реакции

- **Лимфоидная система** включает Т- и В-лимфоциты, которые образуют специфические факторы иммунитета (антитела и Т-клеточные рецепторы к антигену)
- **Система естественных киллерных клеток (ЕКК)**
- **Система антигенпредставляющих клеток (АПК)** включает дендритные клетки, клетки Лангерганса, интердигитирующие клетки и др.

- *Система гранулоцитов* объединяет нейтрофильные лейкоциты, базофильные лейкоциты/тучные клетки, эозинофильные лейкоциты
- *Система мононуклеарных фагоцитов* (моноциты, макрофаги тканей и органов)
- *Гуморальные факторы неспецифического естественного иммунитета:* лизоцим, С-реактивный белок (СРБ), интерфероны, фибронектин, β -лизины, лектины и др.
- *Система комплемента*
- *Система тромбоцитов*

К **центральному органам** системы иммунитета относятся красный костный мозг и тимус

К **периферическим** – циркулирующие лимфоциты крови, лимфатические узлы, селезенка, миндалины, лимфоидная ткань кишечника (пейеровы бляшки, солитарные фолликулы, лимфоидные образования аппендикса и др.), бронхоассоциированная лимфоидная ткань (в области бифуркации трахеи), лимфоидные образования кожи, печени

Цитокины и интерлейкины

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

Цитокины — медиаторы межклеточного взаимодействия, активируют все звенья самой СИ и влияют на различные органы и ткани

Общие свойства цитокинов

- Гликопротеины с молекулярной массой 15-25 кД.
- Действуют *ауто-* и *паракринно* (т.е. на саму клетку и на ее ближайшее окружение), это короткодистантные молекулы
- Действуют в минимальных концентрациях
- Имеют соответствующие им специфические рецепторы на поверхности клеток
- Механизм действия цитокинов заключается в передаче сигнала после взаимодействия с рецептором с мембраны клетки на ее генетический аппарат. При этом изменяется экспрессия клеточных белков с изменением функции клетки (например, выделяются другие цитокины)

Классификация цитокинов

- ❑ Интерлейкины (ИЛ)
- ❑ Интерфероны
- ❑ Группа факторов некроза опухоли (ФНО)
- ❑ Группа колониестимулирующих факторов (например, *гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор – ГМ-КСФ*)
- ❑ Группа факторов роста (эндотелиальный фактор роста, фактор роста нервов и т.д.)
- ❑ Хемокины

Интерлейкины

Цитокины, выделяемые преимущественно клетками системы иммунитета, получили название **интерлейкинов (ИЛ)** – факторов межклеточного взаимодействия

- **ИЛ-1** выделяется макрофагами, является *пирогеном* (вызывает повышение температуры), стимулирует и активирует стволовые клетки, Т-лимфоциты, нейтрофилы, участвует в развитии воспаления

- **ИЛ-2** выделяется Т-хелперами (преимущественно *Tx1*) и стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, моноцитов
- **ИЛ-3** основной гемопоэтический фактор, стимулирует пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников гемопоэза
- **ИЛ-4** – фактор роста В-лимфоцитов, стимулирует их пролиферацию на раннем этапе дифференцировки, выделяется Т-хелперами 2-го типа

- **ИЛ-5** стимулирует созревание эозинофилов, базофилов и синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитами, вырабатывается Т-лимфоцитами под влиянием антигенов
- **ИЛ-6** – выделяется Т-лимфоцитами, макрофагами и многими клетками вне системы иммунитета, стимулирует созревание В-лимфоцитов в плазматические клетки (второй фактор роста В-лимфоцитов), активирует воспаление
- **ИЛ-7** – лимфопоэтический фактор, активирует пролиферацию предшественников лимфоцитов
- **ИЛ-8** – регулятор хемотаксиса нейтрофилов и Т-клеток (*хемокин*); секретируется Т-клетками, моноцитами, эндотелием

- **ИЛ-10** – выделяется Т-лимфоцитами (Тх2 и регуляторными Т-хелперами – Tr). Подавляет выделение провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО α и др.)
- **ИЛ-12, ИЛ-18** – продуцируются моноцитами и макрофагами, стимулируют Тх 1 и продукцию ими гамма-интерферона

Провоспалительные цитокины (ИЛ-1 α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ИНФ- γ , ФНО α и др.)

Противоспалительные цитокины (ИЛ4, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-25 и др.)

Регуляторы гемопоэза — дифференцировочные цитокины (ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-11, колониестимулирующие факторы, факторы роста)

Молекулы дифференцировки клеток системы иммунитета – *CD-антигены*

В процессе дифференцировки на мембранах клеток системы иммунитета появляются макромолекулы, соответствующие определенной стадии развития клеток.

Они получили название ***CD-антигены*** (от англ. – *clusters of differentiation* – кластеры дифференцировки)

- **CD1** – является общим антигеном тимоцитов
- **CD2** – общий маркер всех Т-клеток, обладает способностью связывать эритроциты барана
- **CD3** – представлен на мембранах всех зрелых Т-лимфоцитов, обеспечивает передачу сигнала от Т-клеточного антигенспецифического рецептора (ТКР) в цитоплазму
- **CD4** – маркер Т-хелперов, рецептор для ВИЧ, участвует в распознавании антигенов, ассоциированных с молекулами HLA II класса

- **CD8** – маркер Т-цитотоксических лимфоцитов (Т-киллеров)/Т-супрессоров, участвует в распознавании антигенов, ассоциированных с молекулами HLA I класса
- **CD14** – имеют моноциты-макрофаги, гранулоциты, это рецептор для комплексов ЛПС с ЛПС-связывающим белком
- Активация фагоцитов через CD14 в итоге приводит к интенсивному выделению провоспалительных цитокинов

- **CD16** – несут нейтрофилы, ЕК, моноциты
- **CD19-22** – маркеры В-лимфоцитов
- **CD34** – имеют все предшественники гемопоэза и эндотелий
- **CD95** (Fas/Apo-рецептор) – есть на тимоцитах, активированных Т-л и В-л, рецептор **апоптоза** клеток

Toll-like рецепторы

Распознают типовые структурные компоненты или *«Молекулярные образы патогенов»*, которые сходны у больших групп патогенных и непатогенных микробов

□ ***TLR-1*** связывает липопептиды различных групп бактерий

□ ***TLR-2*** взаимодействует с *липотейхоевыми кислотами* большинства грамположительных бактерий, *липопротеинами* боррелий, трепонем, микобактерий туберкулеза, *компонентами клеточных стенок* нейссерий, листерий, грибов

- ***TLR-3*** связывается с ***двухцепочечной РНК***, что является важным для эффективного противовирусного иммунитета
- ***TLR-4*** реагирует с ***ЛПС*** грамотрицательных бактерий, а также с белками теплового шока
- ***TLR-5*** взаимодействует с бактериальным ***флагеллином*** (Н антигеном бактерий)
- ***TLR-9*** связывается с ***бактериальными ДНК***

Функции системы TLR

□ *Усиление экспрессии костимуляторных молекул на АПК*

Без костимуляции Т-лимфоциты переходят в состояние неответчаемости (*анергии*) к данному антигену

□ *Перенаправлению иммунного ответа* либо по клеточному, либо по гуморальному пути, т.к. активация АПК через разные TLR ведет к продукции разных цитокинов

- Разный цитокиновый профиль стимулирует превращение T_H0 либо в T_H1 , либо в T_H2
- Активация T_H1 приводит к развитию клеточного воспаления
- Активация T_H2 направляет иммунный ответ по гуморальному пути, обеспечивая синтез антител

Дифференцировка Т-лимфоцитов

- ГСК → ЛСК → про Тл (CD34, CD7)

Антигеннезависимая дифференцировка

- тимус → пре Тл (CD2,) → пре Тл (ТКР, в цитоплазме – CD3)
- Незрелые двойные позитивные Тл (ТКР+ CD3 на мембране, CD4, CD8)
- апоптоз аутореактивных Тл, потеря или CD4, или CD8
- Тх CD4, Тц CD8 – миграция в периферические лимфоидные органы

Антигензависимая дифференцировка Т-лимфоцитов

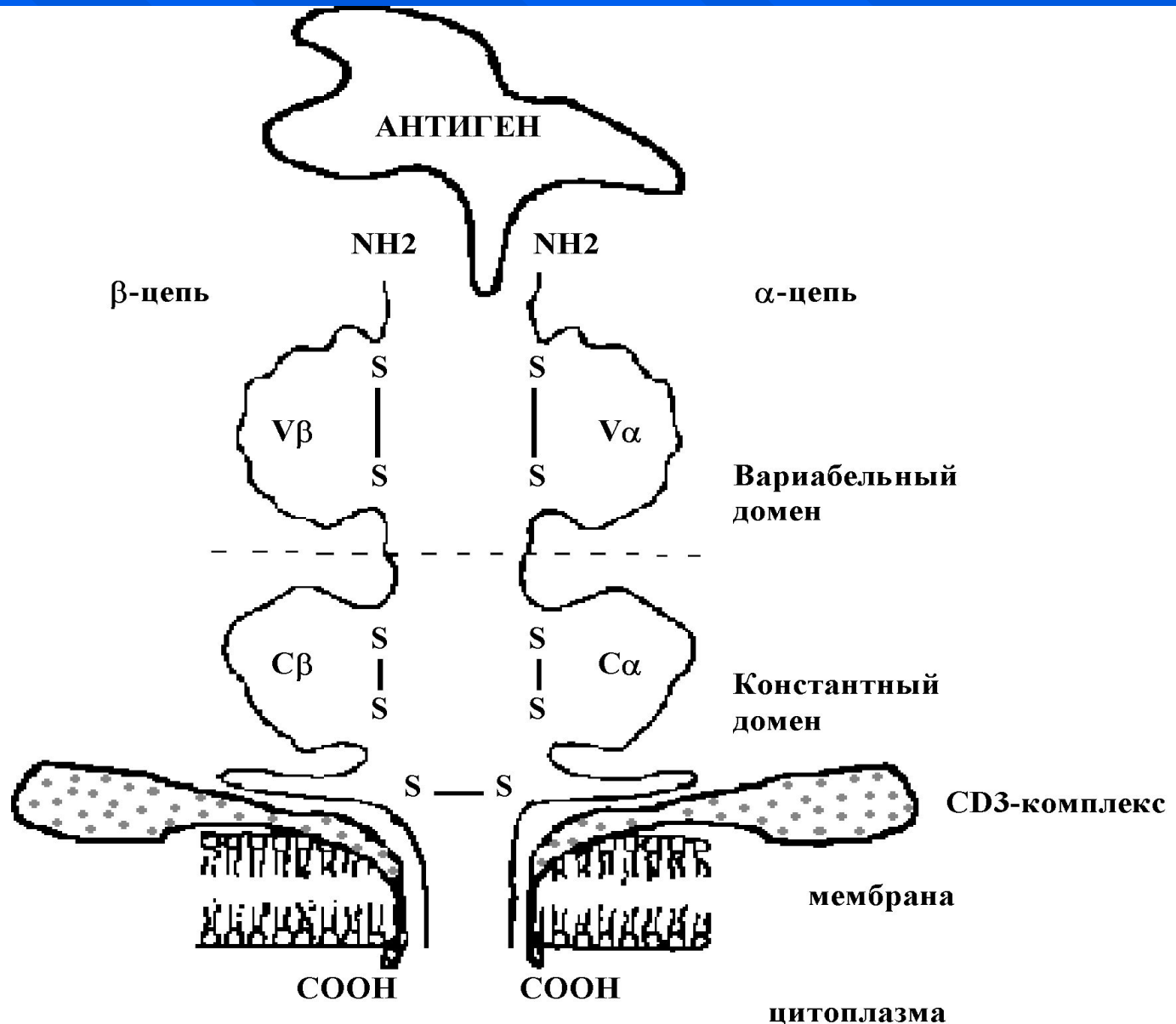
- $T_{H0} \rightarrow T_{H1}$ (ИЛ2, γ -интерферон), клеточный иммунитет
- $T_{H0} \rightarrow T_{H2}$ (ИЛ4, ИЛ5, ИЛ10, ИЛ13), гуморальный иммунитет
- T_{H3} (CD4, CD25, ИЛ10, белок скурфин) – супрессия иммунного ответа
- Тц \rightarrow Т-киллеры (перфорин)
- Т памяти CD45, CD45 RO

Основные субпопуляции:

- T_0 (нулевые, тимические, «наивные», незрелые)
- Т-цитотоксические
- Т-хелперы (T_H1 , T_H2 , T_H3)
- Т-памяти

В норме у человека Т-лимфоциты составляют 60% (50-75%) всех лимфоцитов крови

Т-клеточный рецептор



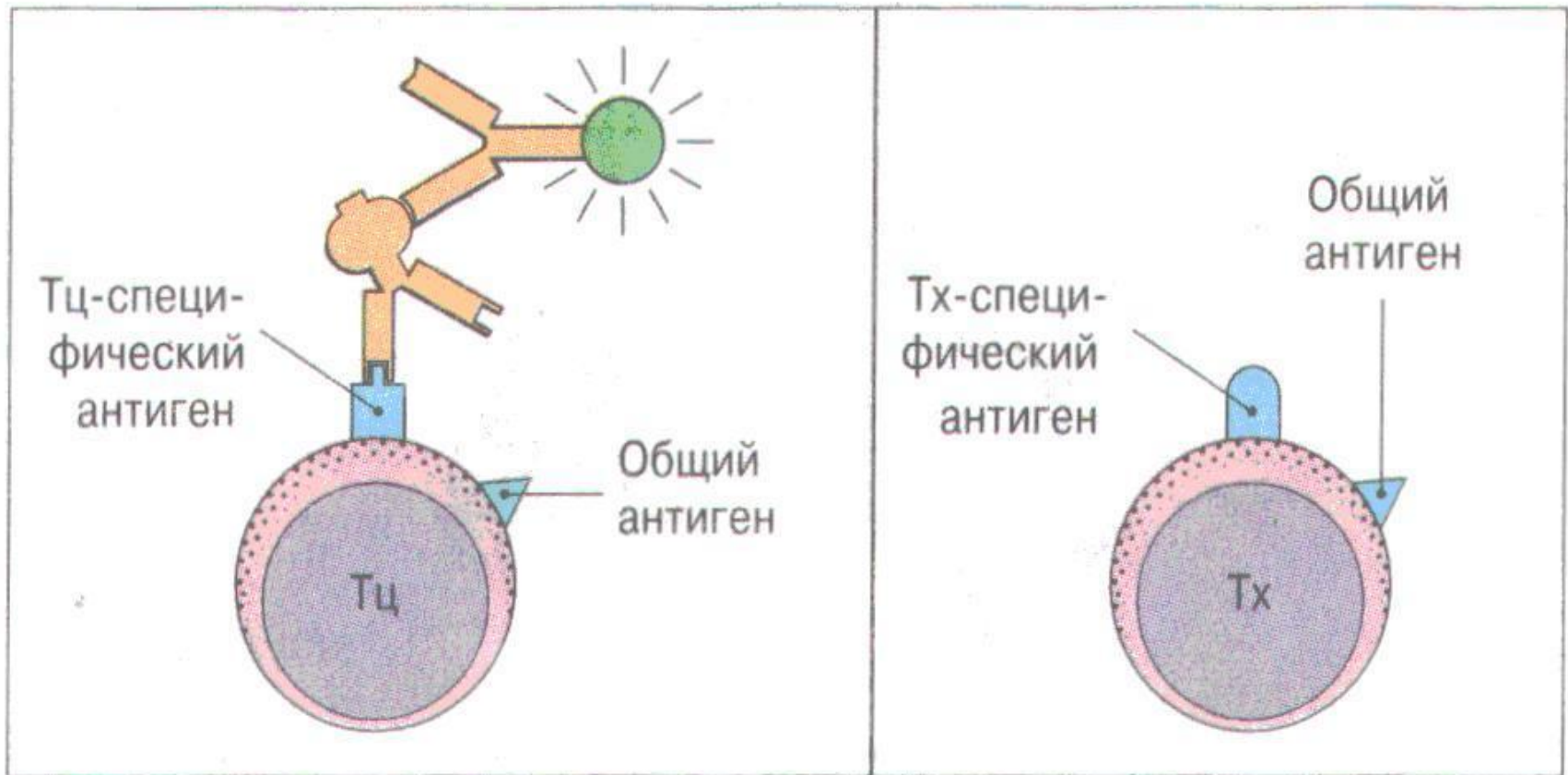
ТКР у Тх и Тц одинаковы по строению

Тх распознают комплексы АГ+HLAII, причем АГ в виде пептида 12-25 аминокислотных остатков

Тц распознают комплексы АГ+HLAI, АГ в виде пептида 8-11 аминокислотных остатков

Различие обусловлено участием CD4 у Тх и CD8 у Тц

Иммунофлуоресцентное выявление Т-клеточных маркеров



Дифференцировка В-лимфоцитов

Процесс созревания стимулируется цитокинами:
ИЛ3, ИЛ7, ИЛ4

Антигеннезависимая дифференцировка

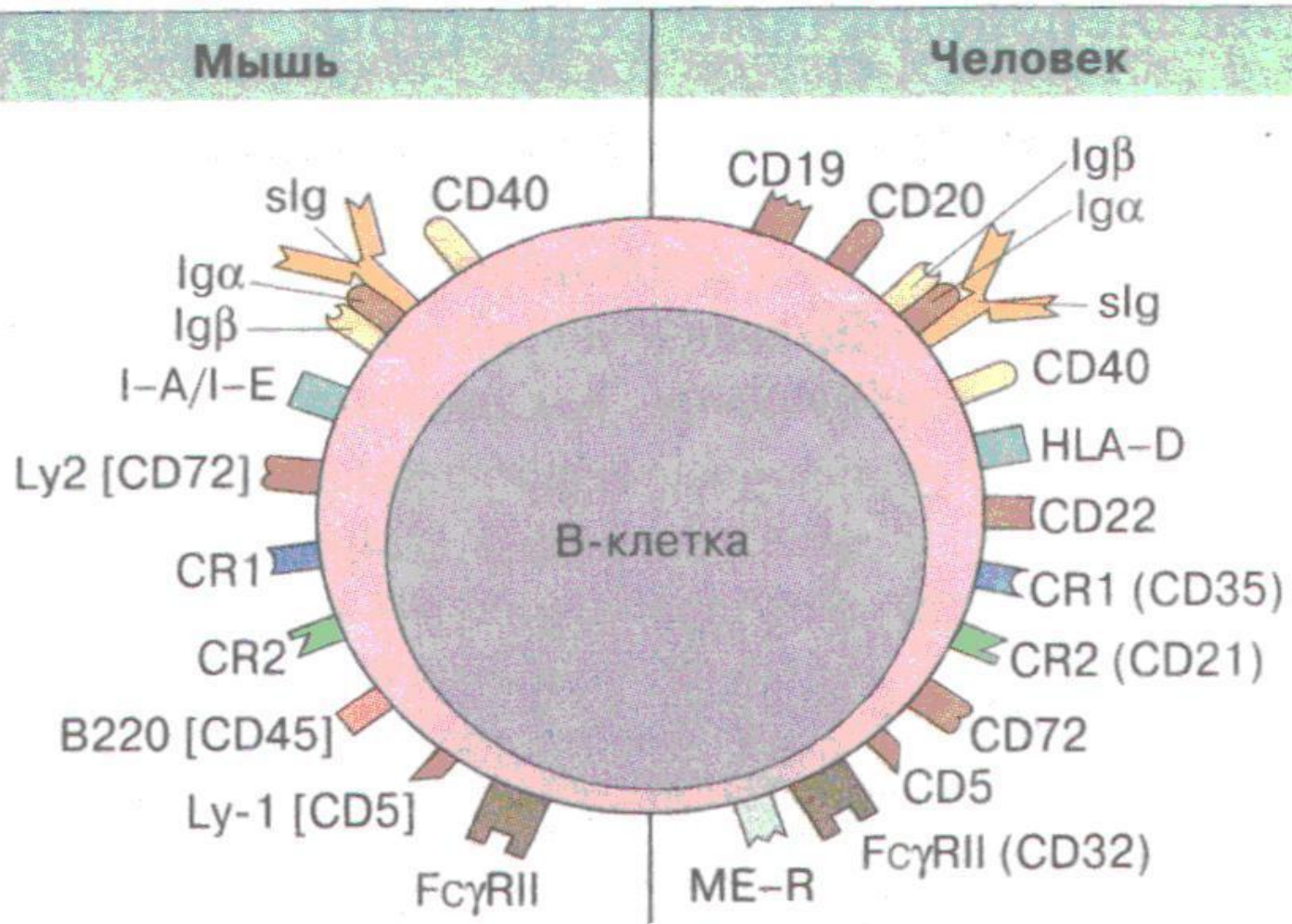
- ГСК (CD34) → ЛСК → пре Вл (CD19, пептиды $Ig\alpha$, $Ig\beta$)
- Большой пре Вл (содержит внутриклеточно цепь μ , CD20-21, 72)
- Малый пре Вл (поверхностный IgM)
- Незрелый Вл (ВКР= μ IgM+ $Ig\alpha$, $Ig\beta$)

- μ IgM может взаимодействовать с АГ
- $Ig\alpha$ и $Ig\beta$ - передают сигнал в клетку
- Зрелый Вл (ВКР, IgD – маркер зрелых В-лимфоцитов)
- Субпопуляции Вл несут IgG , IgA , IgE на мембране

Антигензависимая дифференцировка В-л

РБТЛ → плазмоциты (синтез $Ig=АГ$)

Поверхностные маркеры циркулирующих В-клеток человека и мыши



- На поверхности В-лимфоцитов имеются дифференцировочные антигены: CD19, 20, 22, 40, 72, рецепторы к эритроцитам мыши, к Fc-фрагменту IgG, к C3 компоненту комплемента и др.

В норме в крови у человека содержится 18-30% В-клеток от общего числа лимфоцитов

- Субпопуляции: B1 (CD5) и B2

Проточная цитометрия

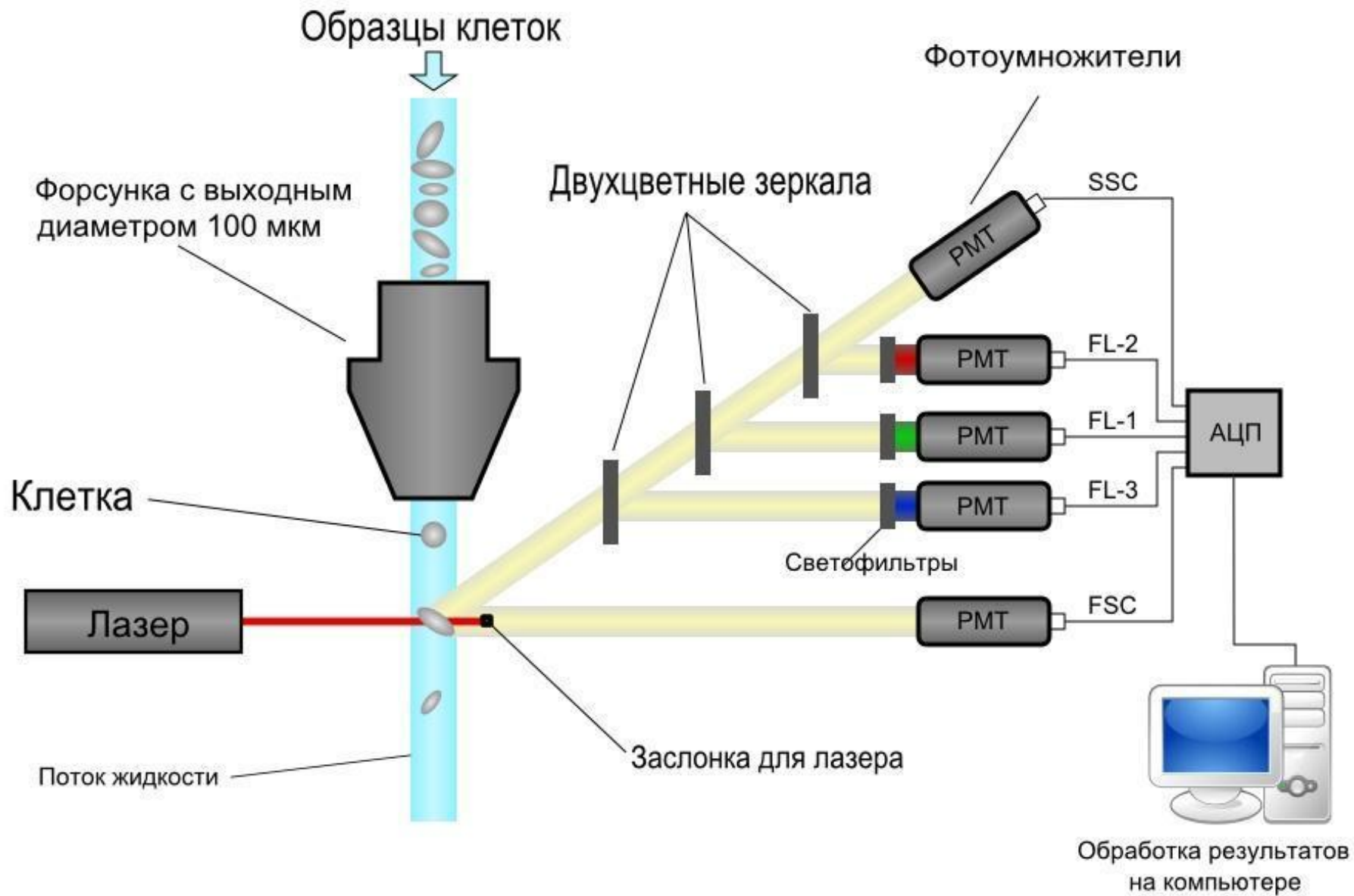
- Метод оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов
- Выявляют рассеяние света лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости
- Степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки
- Учитывается собственная флуоресценция и флуоресценция используемого красителя

- Клеточная суспензия, предварительно меченная флюоресцирующими моноклональными АТ или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку
- Условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет гидродинамического фокусирования струи в струе

- В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют:
 - рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) для определения размеров клеток.
 - рассеяние света под углом 90° (позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, о неоднородности и гранулярности клеток)
 - интенсивность флуоресценции по нескольким каналам - позволяет определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.

Применение

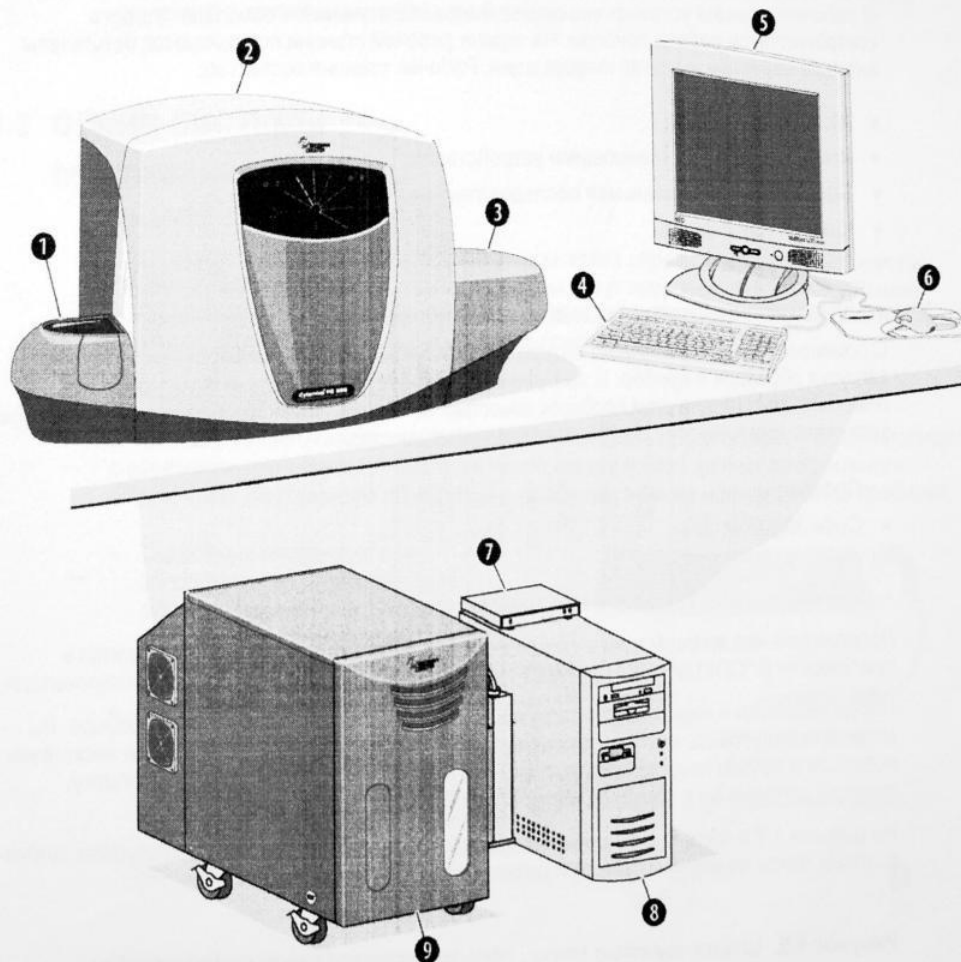
- Для выявления определённых клеток в исследуемых образцах (бактерий, грибов, собственных клеток организма человека)
- Определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам
- Мониторинг состояния вирусного процесса у ВИЧ-инфицированных пациентов.



1.1 КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ

Компоненты системы показаны на рисунке 1-1.

Рисунок 1.1 Система проточной цитометрии Cytomics FC 500



1 Многопробирочный карусельный загрузчик образцов

2 Цитометр

3 Гелий-неоновый лазер (дополнительный)

4 Клавиатура

5 Монитор

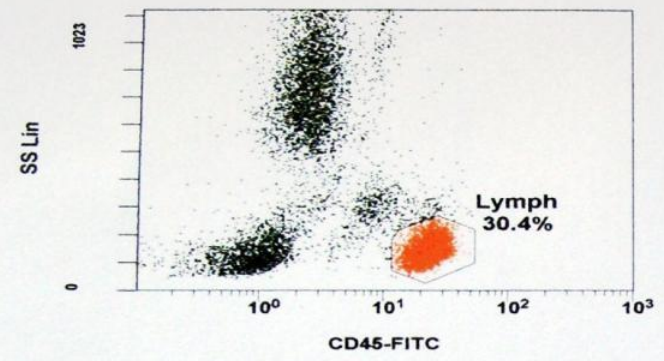
6 Мышь

7 Блок USB

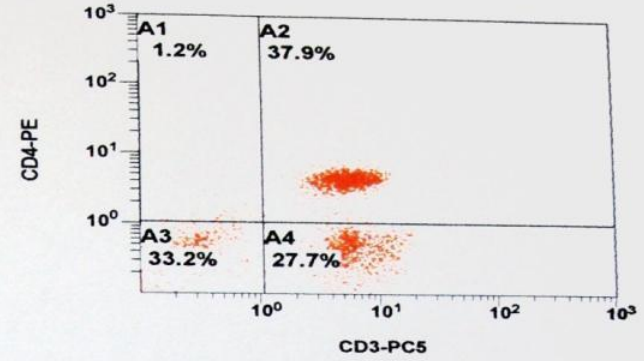
8 Компьютер

9 Источник питания

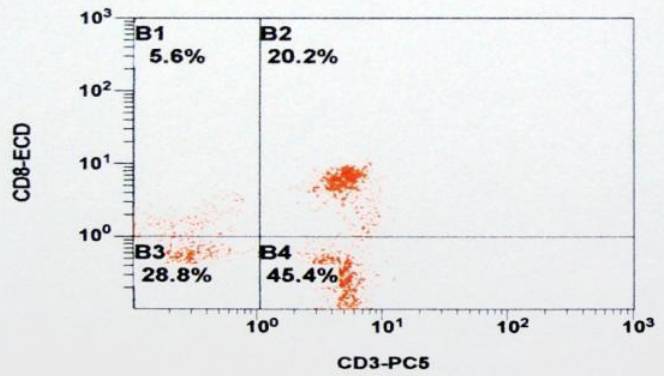
[Ungated] FL1 Log/SS Lin - ADC



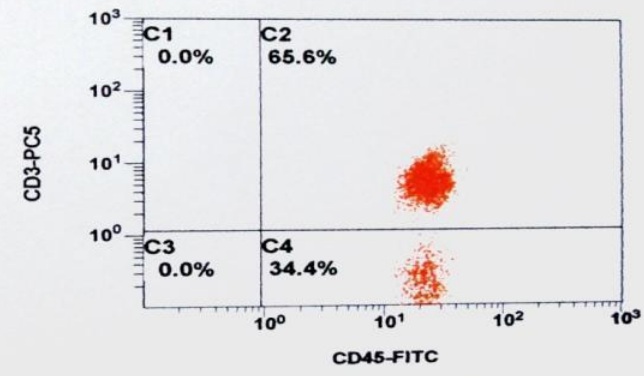
(3000) [Lymph] FL4 Log/FL2 Log - ADC



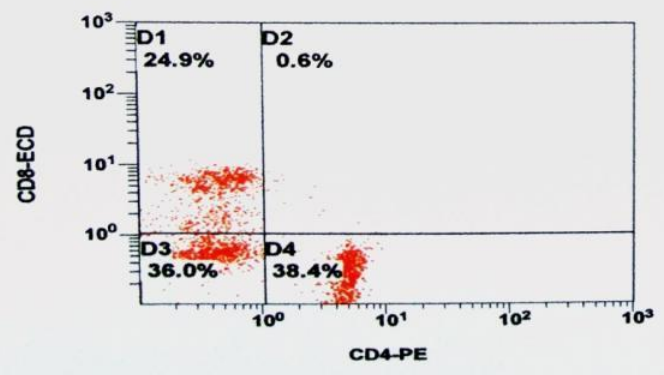
[Lymph] FL4 Log/FL3 Log - ADC



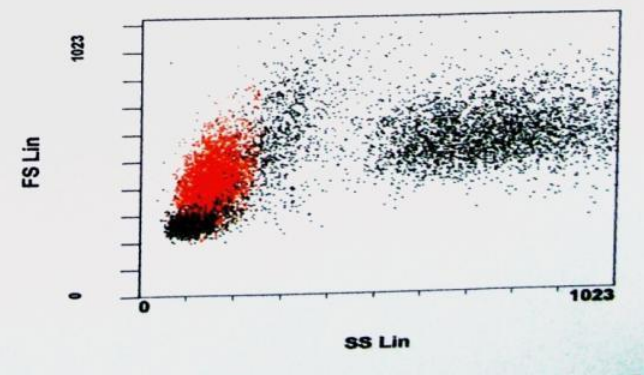
[Lymph] FL1 Log/FL4 Log - ADC



[Lymph] FL2 Log/FL3 Log - ADC



[Ungated] SS Lin/FS Lin - ADC



Иммуноглобулины (Ig) –
большое семейство белков,
которые синтезируются В-л и
плазмочитами

при электрофорезе образуют
фракцию γ -глобулинов

Структура Ig

- 2 тяжелые полипептидные цепи (H – heavy)
 - 2 легкие (L – light) полипептидные цепи
- между собою L и H цепи соединены дисульфидными связями

Тяжелые цепи определяют класс Ig:

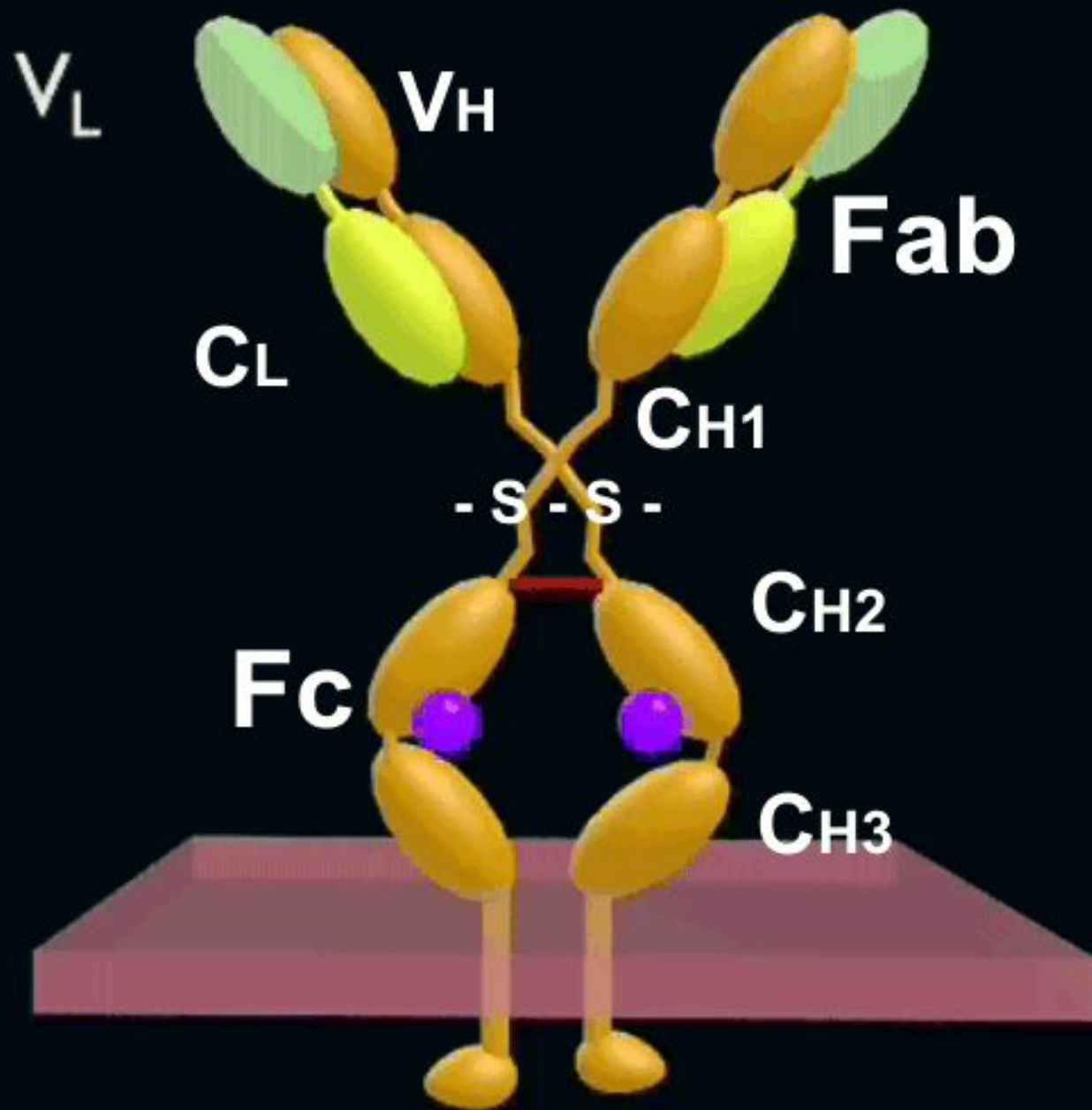
γ - IgG, α - IgA, μ - IgM, δ - IgD ϵ - IgE

- В цепях Ig различают **константные (с)** и **вариабельные (v)** участки.
- Участки Ig цепей, замкнутые в виде глобул - **домены**
- Гипервариабельные домены L и H цепей формируют активный центр АГ для взаимодействия с АГ – **паратоп**

- Между CH1 и CH2 доменами тяжелой цепи локализуется подвижный – **"шарнирный"** участок Ig, чувствительный к протеолитическим ферментам
- Под действием папаина молекула иммуноглобулина расщепляется на **2 Fab-фрагмента и Fc-фрагмент**

Функции Fc-фрагмента

- CN2 домен Fc-фрагмента активирует комплемент по классическому пути (после образования комплекса АГ+АТ)
- CN3 домен может связываться с Fc-рецепторами на лейкоцитах и других клетках



Свойства иммуноглобулинов

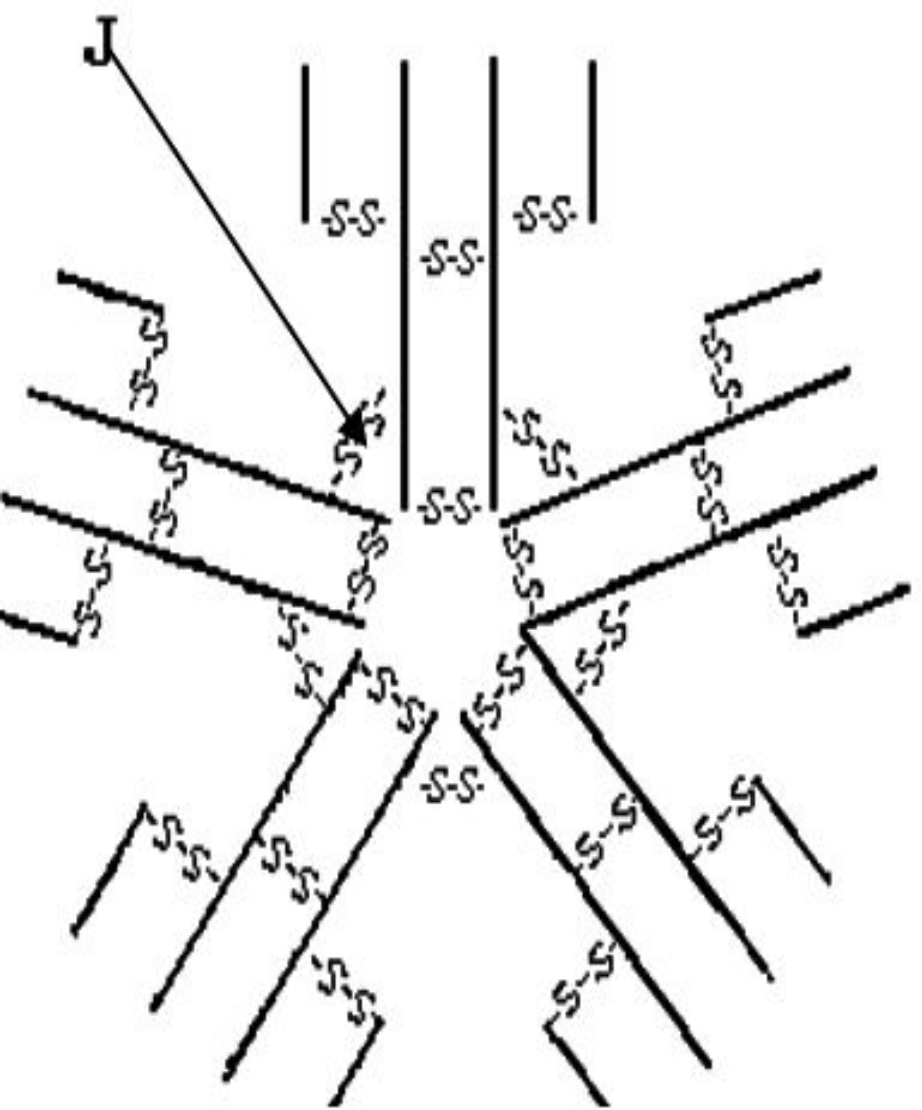
- **IgG** составляют основную массу иммуноглобулинов сыворотки крови (75-85%) – 10 г/л (8-12 г/л)
- Передаются от матери к плоду через плаценту
- АТ IgG появляются в большом количестве при вторичном иммунном ответе

■ **IgM** – пентамер, в сыворотке крови в среднем – 1 г/л (0.8-1.5 г/л)

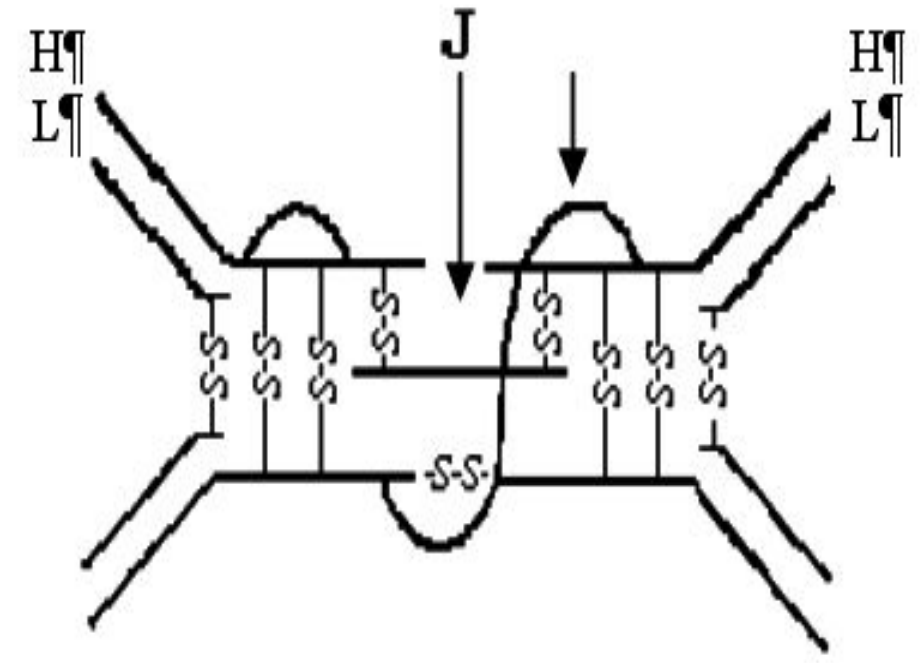
■ АТ IgM синтезируются в организме при первичном иммунном ответе

- **IgA** в крови присутствуют в виде мономеров (от 1,5 до 3 г/л), а в секретах в форме димеров и тримеров
- Секреторные АТ IgA (**sIgA**) формируют местный иммунитет, препятствуют адгезии микроорганизмов к эпителию слизистых оболочек, опсонизируют микробные клетки, усиливают фагоцитоз

IgM μ



IgA μ



- **IgD** содержится в сыворотке крови в концентрации 0,03-0,04 г/л
- Служат рецепторами созревающих В-лимфоцитов
- Увеличиваются при некоторых вирусных инфекциях

- **IgE** присутствуют в сыворотке крови в концентрации около 0,00005 г/л или от 0 до 100 МЕ/мл (1 МЕ ~ 2,4 нг)
- Содержание **АТ IgE** увеличивается при аллергии

Антитела

- Это Ig любого из 5 классов, специфично взаимодействующие с АГ
- **Естественные АТ** находятся в организме без предварительного введения антигена (иммунизации)
- **Иммунные АТ** накапливаются и выявляются в сыворотке крови после предварительной иммунизации АГ

Механизмы действия антител

- нейтрализация активных центров токсинов (токсиннейтрализующий эффект)
- образование комплекса АГ-АТ, который активирует комплемент с последующим лизисом клетки

- опсонизация объектов фагоцитоза (усиление фагоцитоза)
- связывание с Fc-рецепторами лейкоцитов, которые приобретают способность специфично взаимодействовать с антигенами ("вооружающий" эффект антител)

- антирецепторные АТ, связываясь с соответствующим рецептором, блокируют или стимулируют функцию клетки
- АТ обладают собственной медленной ферментативной активностью и могут расщеплять некоторые субстраты (**абзимная активность**)

- Бивалентные **полные** АТ (обычно IgG) имеют 2 активных центра
- Моновалентные **неполные** АТ, у которых один активный центр из-за пространственной блокировки второго центра

- Сила связывания (сродство) одного активного центра АТ с эпитопом АГ-**аффинность**
- Прочность связывания всей молекулы Ig с АГ- **авидность**

Наибольшей авидностью обладают IgM
(пентамеры)

- **Поликлональные АТ** сыворотки представляют собой смесь Ig различных классов
- **Моноклональные АТ** разработаны на основе гибридомной технологии, моноспецифичны, направлены к одному эпитопу АГ

Получение моноклональных АТ

- Иммунизация мышей антигеном
- Из селезенки иммунизированных мышей получают суспензию клеток, среди которых есть антителообразующие В-лимфоциты

- Проводят **слияние** этих антителообразующих В-клеток с В-клетками мышинной опухоли – плазмочитомы («бессмертные» клетки)
- Образуются **гибридные клетки**, которые:
 - способны синтезировать специфические антитела (как иммунные В-лимфоциты)
 - становятся долгоживущими, как клетки плазмочитомы

- Их культивируют в специальной среде, в которой не растут обычные негибридные клетки
- Из смеси гибридных клеток выделяют по 1 клетке и помещают в лунки с жидкой питательной средой и размножают (клонировать)
- Выявляют клон, синтезирующий АГ, специфичные к единственному эпитопу изучаемого АГ и размножают его

Применение моноклональных АТ

- Выявление АТ бактерий и вирусов
- Выявление клеточных маркеров (CD)
- Выявление гормонов, медиаторов и др.
- Лечение (инфликсимаб – моноклональные АТ, блокирующие действие ФНО α и тем самым подавляющие местное и системное воспаление)

Генетические основы разнообразия АТ и ТКР

- Н и L цепи Ig кодируются несколькими генными сегментами, расположенными в разных хромосомах. В ДНК половых клеток они разобщены и объединяются непосредственно в Вл и плазмоцитах
- Вариабельные участки L цепей кодируются V-сегментами (несколько сотен вариантов) и J-сегментами
- Вариабельные участки H цепей кодируются V, D, J-генными сегментами

- Каждый такой сегмент формируется из нескольких участков ДНК
- При объединении фрагментов генома в единую последовательность ДНК происходят множественные рекомбинации и мутации, т.е. количество вариантов нарастает
- Разнообразие АТ увеличивается и при последовательном переключении классов Ig (IgM и IgD на IgG, A и т.д.), продуцируемых одной клеткой
- Разнообразие Ig продолжает увеличиваться и после контакта СИ с АГ, что связано с постоянными мутациями ДНК, таким образом в организме преобладают миллиарды вариантов Ig (также происходит и с ТКР)

Антигены (АГ) - любые простые или сложные вещества, которые при попадании в организм тем или иным путем вызывают иммунную реакцию и способны специфично взаимодействовать с продуктами этой реакции: **АТ** и **ТКР**

Основные свойства антигенов:

Иммуногенность – способность АГ индуцировать в организме иммунную реакцию

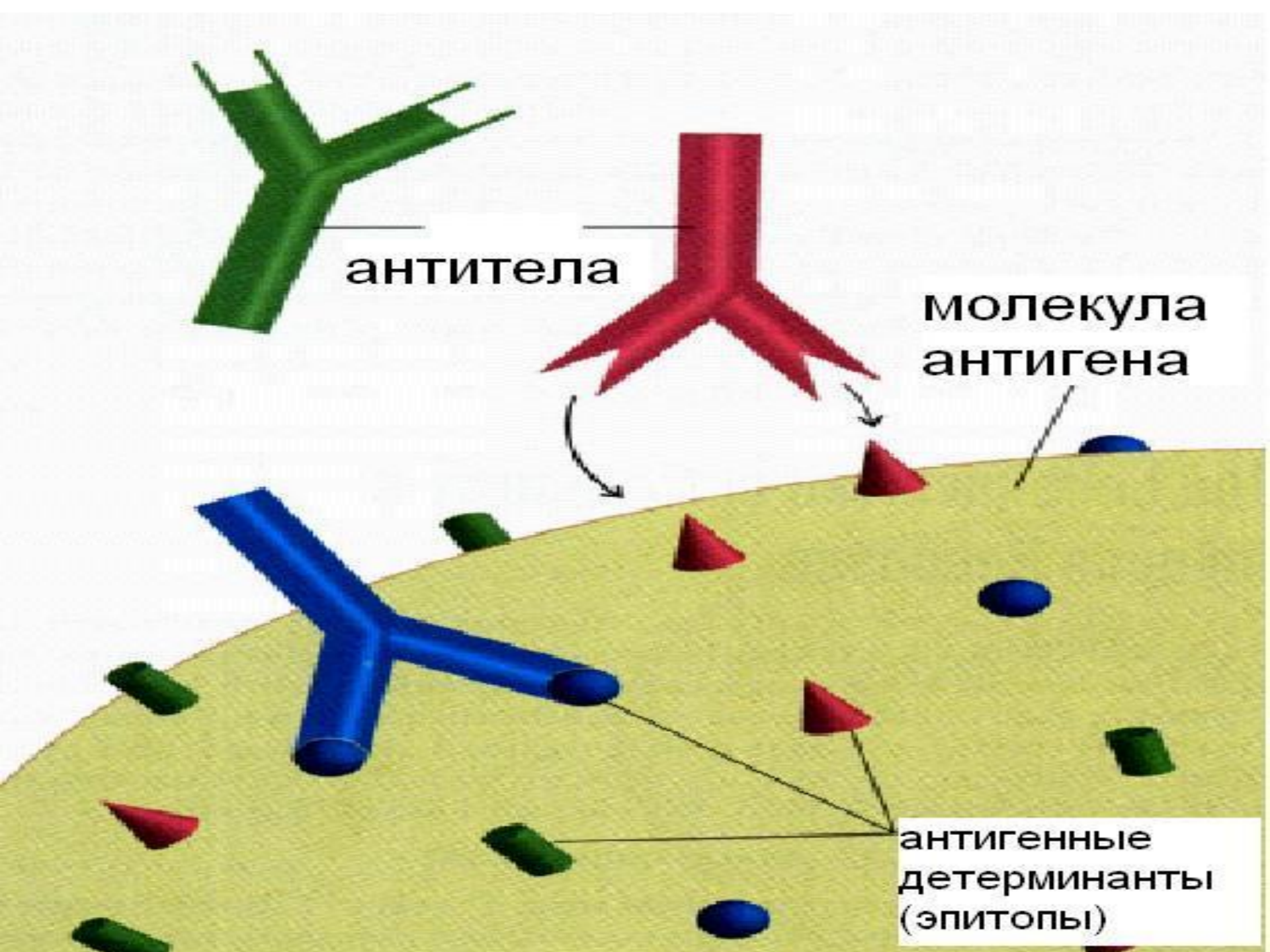
Специфичность – способность взаимодействовать только с комплементарными ему АТ и/или ТКР

Высокая молекулярная масса (более 10000 дальтон) - полноценные антигены (белки и их комплексные соединения – гликопротеиды, липопротеиды, нуклеопротеиды)

Поливалентность - на 1 молекуле полноценного АГ может быть 10-20 и более **эпитопов**

Иммуногенность обусловлена сложностью пространственной структуры молекулы (боковые радикалы, разветвленные цепи и т.п.)

Эпитоп (антигенная детерминанта) - участок молекулы антигена, взаимодействующий с одним активным центром АТ (паратопом) или ТКР



антитела

молекула
антигена

антигенные
детерминанты
(эпитопы)

Гаптены - низкомолекулярные вещества, в обычных условиях не вызывают иммунную реакцию

Способны запускать иммунный ответ после связывания с белками организма

В результате образуются АТ, способные взаимодействовать с гаптемом

Аллергены - АГ или гаптены,
которые **при повторном** попадании в
организм вызывают аллергическую
реакцию.

Все АГ и гаптены могут быть
аллергенами

Т-зависимые АГ - запускают
иммунный ответ с участием Т-
лимфоцитов (белки)

Т-независимые АГ - запускают
иммунный ответ и синтез антител В-
клетками без Т-лимфоцитов
(высокополимерные полисахариды,
ЛПС и др.)

Экзогенные и эндогенные АГ

Экзогенные антигены попадают в организм из внешней среды.

Среди них различают
инфекционные
неинфекционные

Инфекционные АГ - антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших, токсины, ферменты

⇒ **группоспецифические** (встречаются у разных видов одного рода или семейства)

⇒ **видоспецифические** (у различных представителей одного вида)

⇒ **типоспецифические** (определяют серологические варианты - серовары, антигеновары внутри одного вида)

По локализации: **O-АГ** **H-АГ** **K-АГ**

O-АГ - полисахарид, входит в состав клеточной стенки бактерий, является частью ЛПС у грам(-) бактерий, термостабилен

По O-АГ различают много сероваров у бактерий одного вида

Строение ЛПС

Центральная часть ЛПС – **полисахарид**, состоит из остатков 2-кетоглюкозы, галактозы, глюкозы, гептозы и N-ацетилглюкозамина

С одной стороны к этому ядру присоединен **липид А**, а с другой – **O-специфические** олигосахаридные цепочки из 3-4 сахаров

Липид А - неспецифический
иммуностимулятор, токсичен

ЛПС – **ЭНДОТОКСИН** и пироген

В небольших дозах активирует макрофаги с
выделением ИЛ1, ФНО и др. цитокинов

В больших дозах угнетает фагоцитоз,
вызывает нарушение функции сердечно-
сосудистой системы, тромбозы,
ЭНДОТОКСИЧЕСКИЙ ШОК

H-АГ входит в состав жгутиков, состоит из белка флагеллина, термолабилен

K-АГ - гетерогенная группа поверхностных капсульных АГ бактерий, содержат обычно кислые полисахариды

Варианты K-антигена: А, В, L у кишечной палочки, Vi – у сальмонелл

Протективные антигены

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

Антигенная мимикрия- сходство в строении АГ бактерий, человека, животных

Гемолитические стрептококки группы А содержат АГ, общие с АГ эндокарда и клубочков почек человека

Вызывают образование АТ, перекрестно реагирующих с клетками человека, что приводит к развитию ревматизма и постстрептококкового гломерулонефрита

У возбудителя сифилиса есть фосфолипиды, сходные по строению с **кардиолипидным** АГ сердца животных и человека

Поэтому кардиолипиновый антиген из сердца животных используют для выявления АТ к возбудителю сифилиса (реакция Вассермана)

Суперантигены - в небольших дозах вызывают поликлональную активацию и пролиферацию большого числа Т-лимфоцитов (более 20%, обычные антигены - 0,01%)

При этом вырабатывается много цитокинов, вызывающих воспаление и повреждение тканей

Суперантигены: энтеротоксины, эксфолиатины, холероген и др.

НЕИНФЕКЦИОННЫЕ АНТИГЕНЫ

АГ растений, лекарственные препараты, химические, природные и синтетические вещества, антигены ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Антигены животных по отношению к человеку являются **ксеногенными**

Антигены, отличающие одного индивидуума от другого, называют **аллогенными** или **изоантигенами**

К аллогенным АГ относятся АГ эритроцитов и лейкоцитов (HLA-система) и др.

Антигены эритроцитов

На поверхности эритроцитов имеется более **100 антигенов**, относящихся к 14 системам

Наиболее важными являются изогемагглютиногены системы **A B 0** групп крови и **резус-АГ (Rh+)**

АНТИГЕНЫ ЛЕЙКОЦИТОВ

HLA (Human Leucocyte Antigens)

контролируются генами 6 хромосомы (главным комплексом гистосовместимости)

- Обуславливают несовместимость тканей при пересадках между индивидуумами
- участвуют в распознавании АГ
- участвуют в межклеточных взаимодействиях
- являются маркерами «своего»
- определяют предрасположенность к заболеваниям

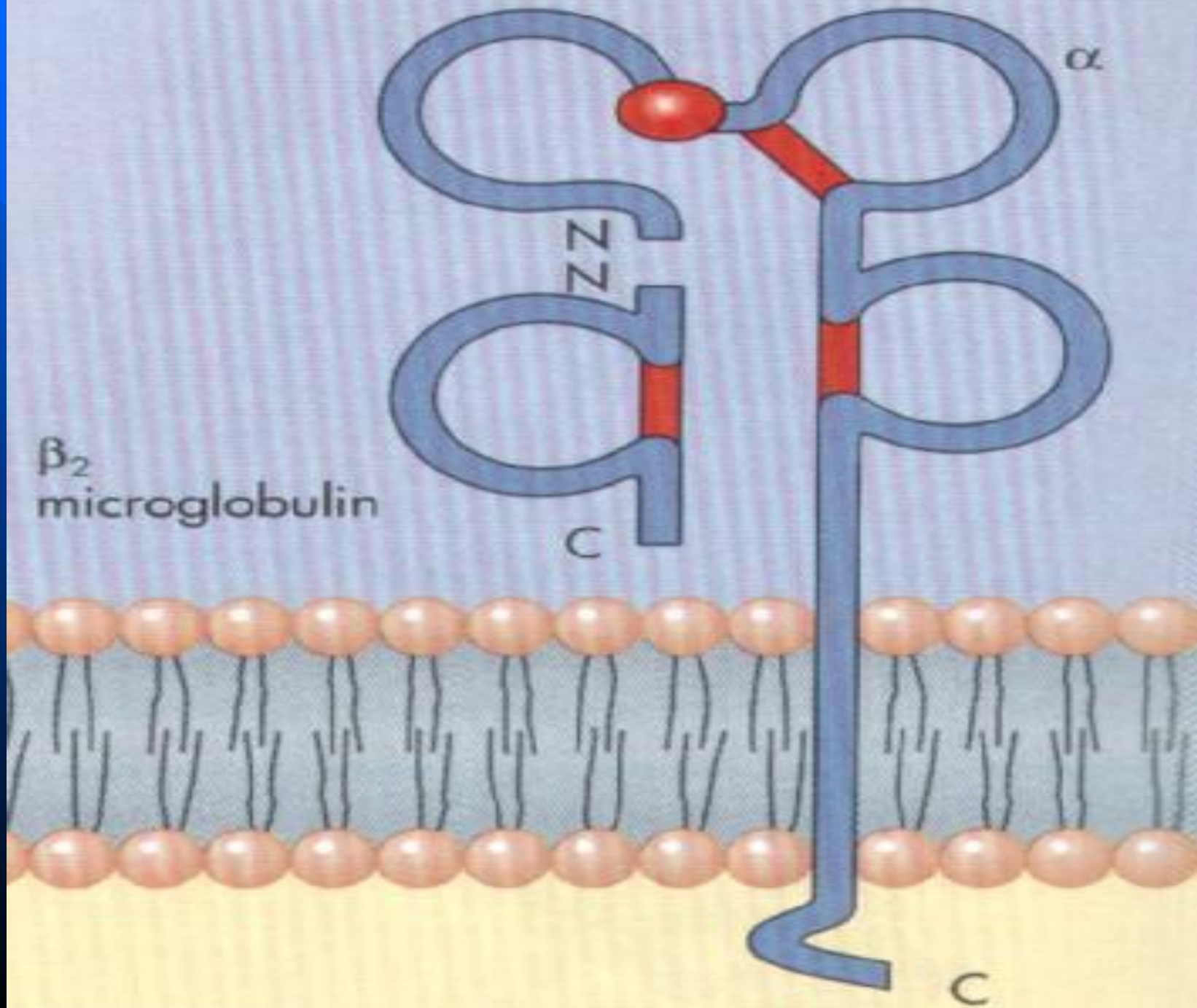
Молекулы **HLA I класса** – гетеродимеры, состоят из двух цепей

Легкая цепь - **β 2-микроглобулин**

Тяжелая цепь имеет три домена **α 1, α 2, α** , гидрофобный участок, фиксирующий цепь в мембране, и концевой участок в цитоплазме

HLA I класса есть на всех ядродержащих клетках → **маркеры «своего»**

Гены **HLA I** класса представлены тремя локусами: **HLA-A, HLA-B, HLA-C**

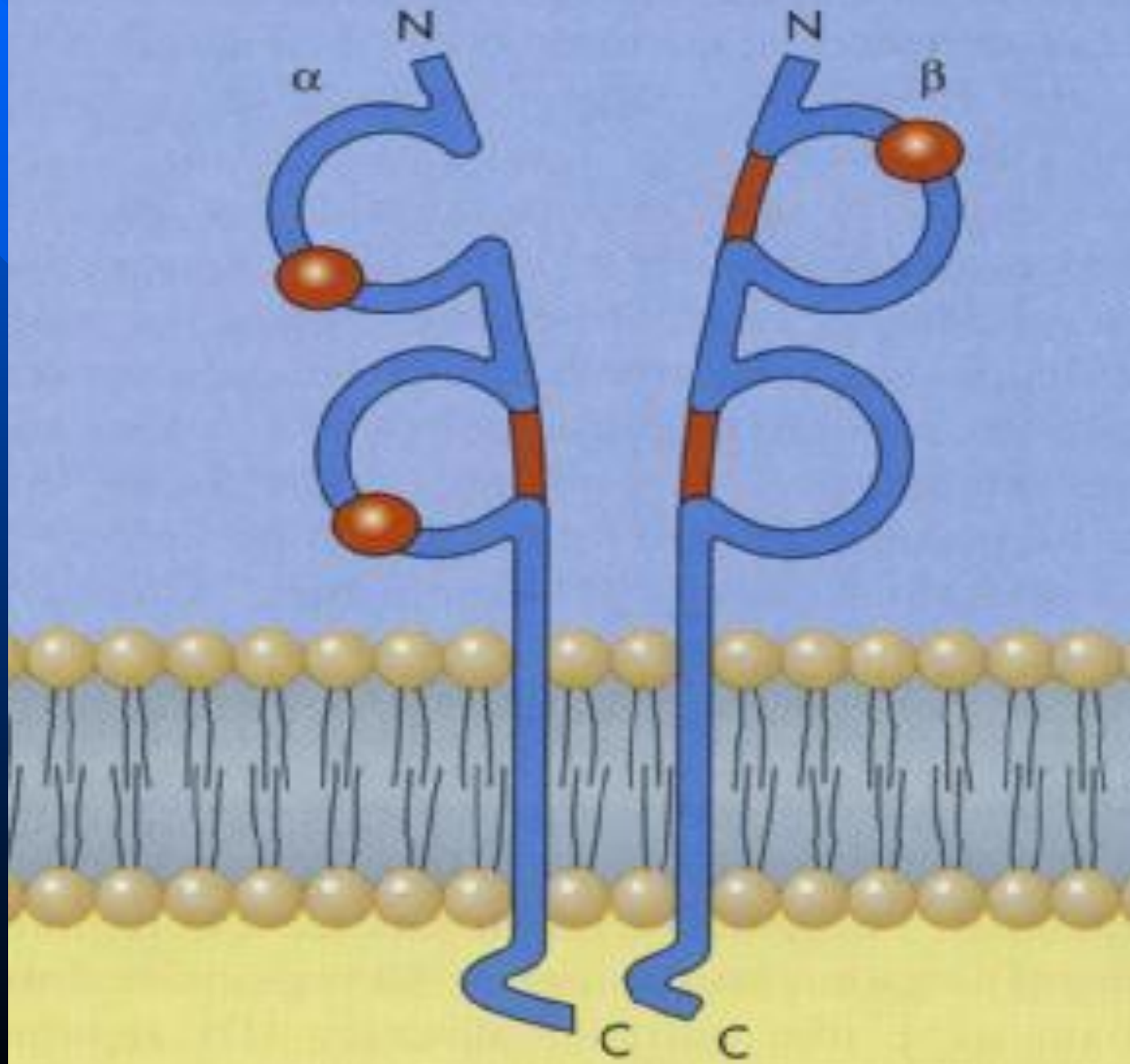


Молекулы **HLA II класса** состоят из двух полипептидных цепей: α и β . Обе цепи имеют по два домена ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\beta 1$, $\beta 2$), закрепленные в клеточной мембране дополнительным участком

HLA II класса экспрессированы на В-лимфоцитах, макрофагах, активированных Т-лимфоцитах

Гены, контролирующие HLA II класса, имеют три локуса : **HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP**

HLA II класса участвуют в распознавании чужеродных антигенов



Эндогенные антигены -

собственные аутологичные молекулы (аутоантигены), вызывающие активацию системы иммунитета

- естественные первичные (нормальная ткань хрусталика глаза, нервная ткань и др.)

- приобретенные вторичные (продукты повреждения тканей микробами, вирусами, ожоговые, лучевые, холодовые АГ)

По тканевой и клеточной принадлежности

- Стромальные (АГ эластических, коллагеновых и других волокон)
- Клеточные (мембранные, цитоплазматические, ядерные и т.д.)
- Внеклеточные аутоантигены (антигены межтканевой жидкости и др.)

Система мононуклеарных фагоцитов

Моноциты крови

Оседлые макрофаги печени (клетки
Купфера)

Мезангиальные клетки

Альвеолярные макрофаги

Глиальные макрофаги

Остеокласты

Макрофаги соединительной ткани и др.

Молекулярные маркеры моноцитов и макрофагов

- CD 14 – рецептор для ЛПС связывающего белка
- рецепторы для Fc-фрагмента IgG
- рецепторы к цитокинам
- интегрины (CD11a/CD18)
- Toll-like рецепторы

Функции макрофагов:

фагоцитоз

распознавание и представление
(презентация) антигенов

секреция медиаторов системы
иммунитета (монокининов)

Стадии фагоцитоза

хемотаксис

адгезия

эндоцитоз (поглощение)

переваривание

удаление продуктов фагоцитоза

Хемотаксис - движение макрофагов к объекту фагоцитоза по градиенту концентрации ***хемотаксических факторов*** (бактериальных компонентов, интерлейкинов (*ИЛ-8*) и т.д.)

Адгезия реализуется двумя механизмами: иммунным и неиммунным

Неиммунный фагоцитоз

осуществляется за счет связывания антигена на поверхности макрофага

В **иммунном** фагоцитозе участвуют рецепторы макрофагов к иммуноглобулинам (*опсонинам*)

В связывании могут участвовать самые разнообразные молекулы и рецепторы

Лектины микробных клеток

Лектины фагоцитарных клеток

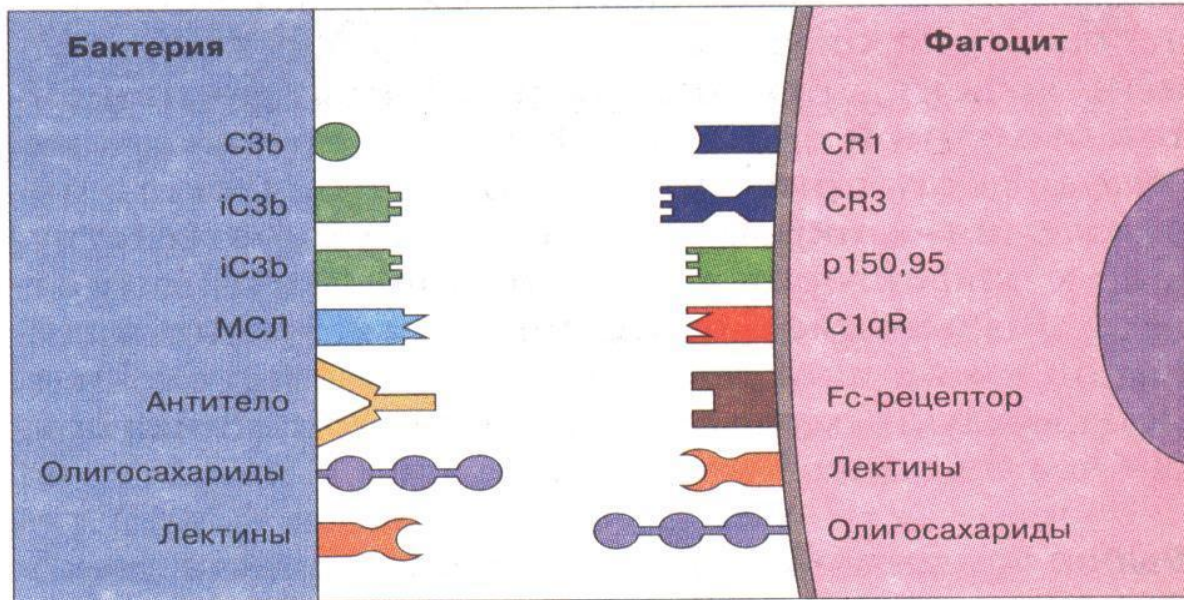
(рецепторы комплемента CR3 и CR4, маннансвязывающий белок, интегрины и др.).

Компоненты комплемента

Fc-рецепторы

Toll-like рецепторы и др.

Взаимодействие между бактериями и фагоцитарными клетками



Связыванию бактерий с мембраной фагоцита способствует ряд молекул. Произойдет ли поглощение микробной клетки фагоцитом и ее последующий лизис, зависит от характера этого взаимодействия. За исключением компонентов комплемента, антител и маннозосвязывающего лектина (МСЛ), которые присоединяются к бактериальной поверхности, все остальные молекулы на поверхности бактерий, участвующие в связывании, относятся к конститутивно экспрессируемым бактериальным компонентам.

Эндоцитоз (поглощение)

инвагинация мембраны фагоцита

обволакивание объекта

фагоцитоза

образование **фагосомы**

слияние фагосомы с лизосомами и

образование **фаголизосомы**

Переваривание

Кислородзависимые

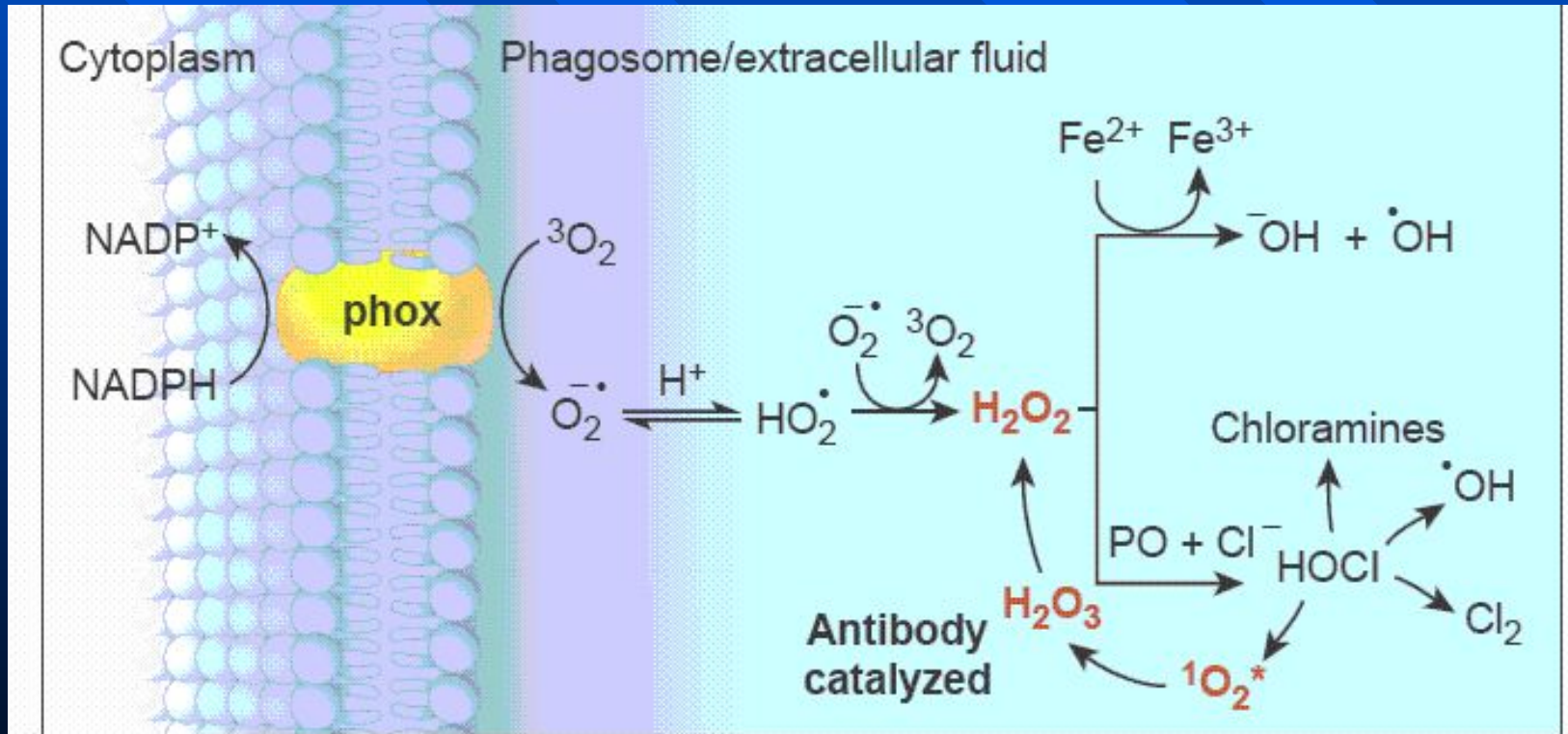
механизмы (образование
активных форм кислорода:

H_2O_2 , оксидаза,
миелопероксидаза и др.)

Кислороднезависимые

механизмы

Кислородзависимые бактерицидные механизмы - образование активных форм кислорода (АФК) через гексозомонофосфатный шунт - «дыхательный взрыв»



Phagosomal oxygen-dependent microbicidal mechanisms. Phox (phagocyte oxidase); PO (myeloperoxidase); $^3\text{O}_2$ (triplet or ground state dioxygen).

Кислороднезависимые бактерицидные механизмы:

Ферменты-гидролазы - катепсины, лизоцим, глюкуронидаза и т.д.

Катионные антибиотикоподобные белки - дефензины вызывают образование ионных каналов в мембране микробной клетки

Реакционноспособные метаболиты азота (РМА) - образование токсичного для бактерий и опухолевых клеток оксида азота NO(II)

Дополнительные антимикробные механизмы

После слияния лизосом содержимое фаголизосомы временно подщелачивается, после чего рН падает (подкисление)

Завершенный фагоцитоз - полное переваривание и гибель бактериальной клетки

Незавершенный фагоцитоз - микробные клетки остаются жизнеспособными.

Механизмы: микобактерии туберкулеза и токсоплазмы препятствуют слиянию фагосом с лизосомами; гонококки, стафилококки и стрептококки могут быть устойчивыми к действию лизосомальных ферментов, риккетсии и хламидии могут долго персистировать в цитоплазме вне фаголизосомы

Представление (презентация) антигенов макрофагами

В результате фагоцитоза и переваривания антигенов образуется большое количество низкомолекулярных антигенных фрагментов (**процессинг**). Часть из них в виде пептидов перемещается на поверхность макрофага

Экзоантигены - пептиды длиной 12-25 аминокислот связываются с HLA 2 класса (*HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ*). Только после этого они взаимодействуют с Т-хелперами. Таким образом, макрофаги представляют переработанный антиген Т-хелперам в комплексе со своими HLA (*1-й сигнал*).

Секреция медиаторов иммунной системы (монокринов).

Второй сигнал для активации Т-хелперов - выделение макрофагами ИЛ1 - монокина с многообразным биологическим и пирогенным действием. Кроме этого, макрофаги выделяют другие медиаторы: ИЛ-3, 6, 8, 10, 12, 18, фактор некроза опухоли (альфа-ФНО), простагландины, лейкотриены, интерфероны α и β , факторы комплемента, ферменты и др.

ДРУГИЕ АНТИГЕН- ПРЕЗЕНТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ (АПК)

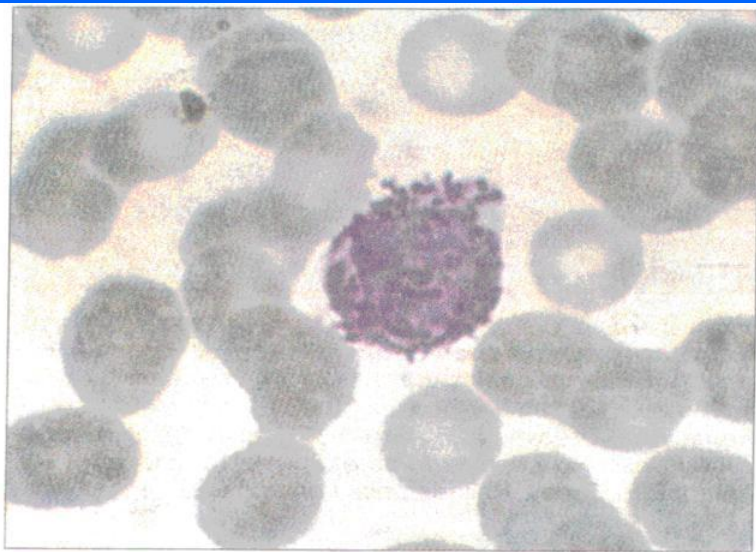
- **Клетки Лангерганса** из кожи мигрируют в паракортикальные области регионарных лимфоузлов. Там они взаимодействуют с Т-клетками и представляют собой уже **интердигитирующие (переплетенные) клетки (ИДК)**. Такая миграция обеспечивает доставку антигенов из кожи и слизистых оболочек к Тх лимфоузлов.
- **Фолликулярные дендритные (разветвленные) клетки (ФДК)**, презентируют антигены В-лимфоцитам.

Маркеры различных антигенпрезентирующих клеток

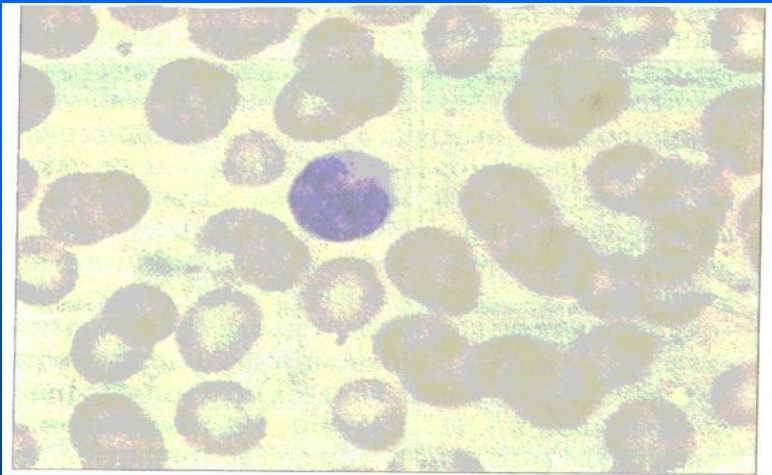
Клеточный маркер	Тип клеток					
	клетки Лангерганса	интердигитатные клетки	интердигитатные клетки центров размножения	дендритные клетки центров размножения	В-клетки	макрофаги
MHC II	+	+	-	+	+	±
FcγR (CD32)	+	-	+	+	+	+
FcγR (CD64)	±	-	-	-	-	+
CD35 (CR1)	+	-	+	+	+	+
CD21	-	-	Много	Мало	+	+
CD2	-	-	-	+	-	-
CD4	+	-	-	+	-	+
CD1a	+	-	-	-	-	-
CD40	?	Много	+	Мало	Много	+
НСЭ	-	-	-	-	-	+
Фагоцитоз	-	-	-	-	-	+

СИСТЕМА ГРАНУЛОЦИТОВ

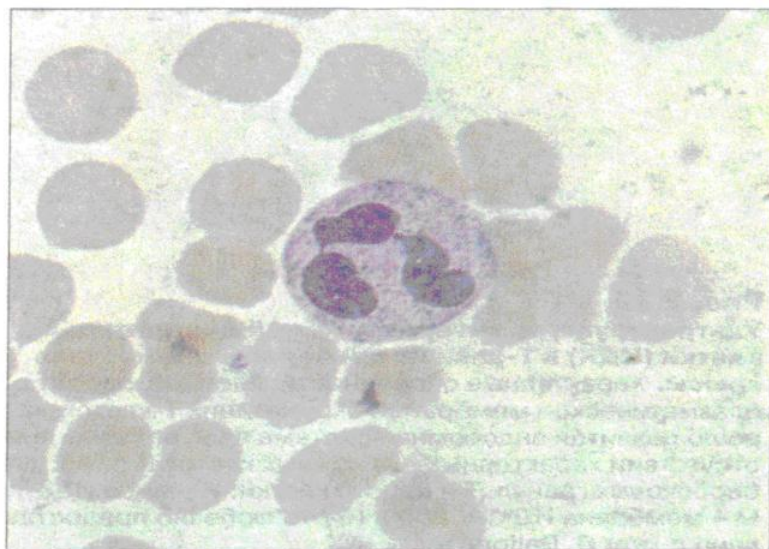
В нее входят **нейтрофильные, базофильные и эозинофильные** гранулоциты (*микрофаги*). Все они происходят из ГСК через ряд предшественников под влиянием гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов.



Морфология базофила



Морфология моноцита



Морфология нейтрофила



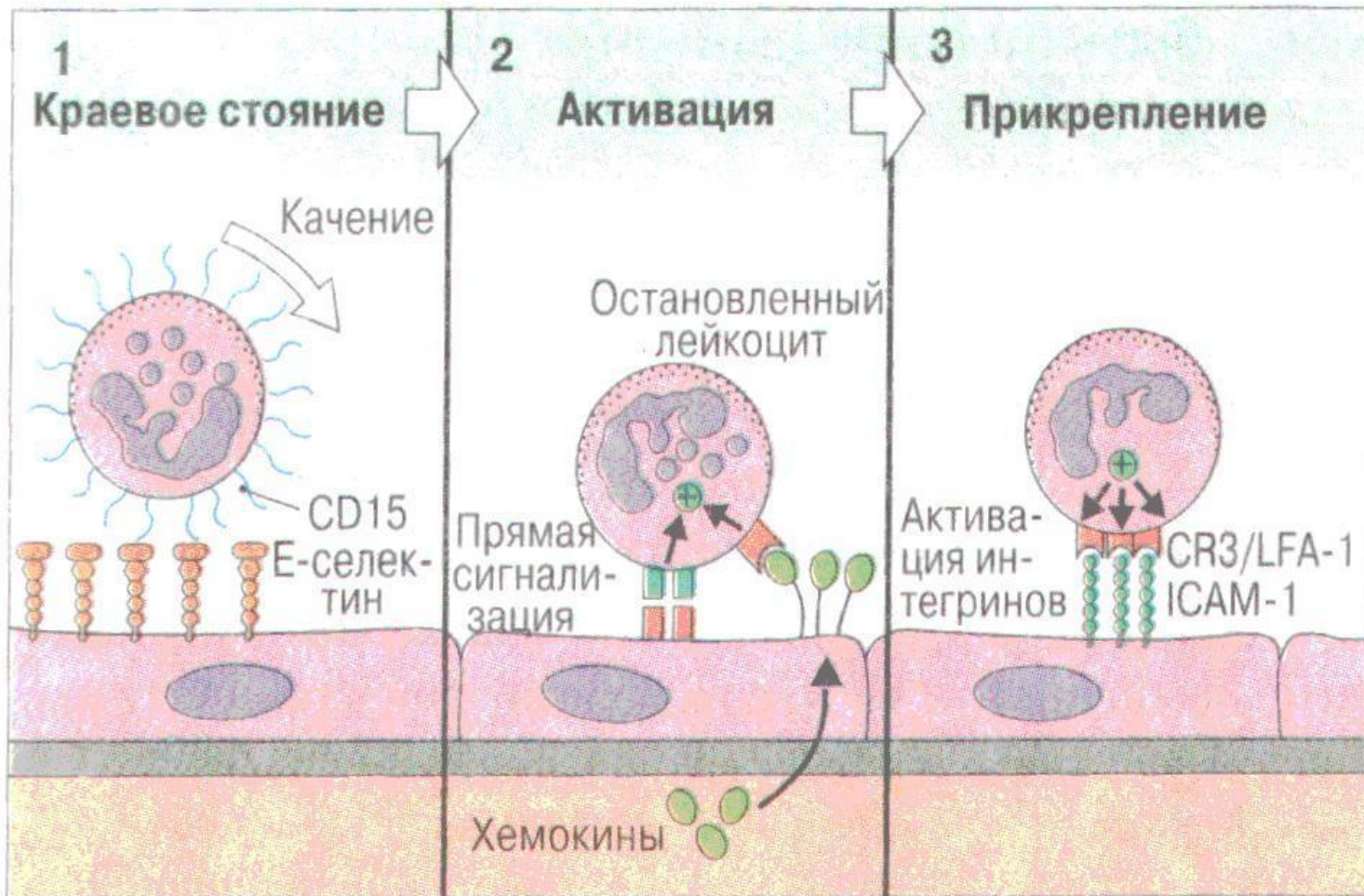
Морфология эозинофила

Нейтрофилы

составляют 47-72% всех лейкоцитов. Их содержится $2.5 - 4.5 \times 10^9$ /л. Средний срок жизни нейтрофилов - 7-9 часов. В цитоплазме имеют 2 основных типа гранул – азурофильные первичные и специфические вторичные.

Азурофильные гранулы содержат β -глюкуронидазу, катепсины, кислые и нейтральные протеиназы, *миелопероксидазу*.
В **специфических** гранулах находятся коллагеназа, лизоцим, *лактоферрин* и др.

Трехфазная модель адгезии лейкоцитов к эндотелию



Основные молекулы-маркеры на нейтрофилах : CD13, CD 14, CD64 , рецепторы к C1q, C3b, C5a

компонентам

комплемента, CD32(FcγRII) и CD16 (FcγRIII), много адгезинов, включая CD62L селектин и интегрины, хемокиновые рецепторы.

Базофилы

участвуют в аллергических реакциях. На поверхности базофилов имеются Fcε-рецепторы, связывающие IgE. В гранулах базофилов содержится большое количество медиаторов аллергии (*гистамин, серотонин, фактор активации тромбоцитов, простагландины, лейкотриены, факторы хемотаксиса, гепарин* и др.)

В крови в норме присутствует 0-1% клеток

Эозинофилы

играют большую роль в противопаразитарном иммунитете и аллергии. В крови 1-6%, созревают под действием ИЛ-5. В их гранулах содержится основной белок - цитотоксин, повреждающий паразитов и собственные клетки организма. Кроме этого, при активации эозинофилов из гранул высвобождается большое количество медиаторов аллергических реакций. Имеют рецепторы для C4, C3, C3b компонентов комплемента, для Fc-фрагментов IgG, IgE.

Характеристика системы макрофагов и гранулоцитов

1. *Определяют количество лейкоцитов в крови.*
2. *Оценивают поглотительную и переваривающую активность фагоцитов:*

К взвеси лейкоцитов добавляют взвесь микроорганизмов. Готовят 3 пробы, инкубируют при 37⁰С 1-ю пробу 30 мин, 2-ю - 60 мин, 3-ю - 90 мин. Делают мазки, высушивают их, фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Определяют фагоцитарный индекс и фагоцитарное число

Фагоцитарный индекс - это среднее количество частиц или микроорганизмов в одном фагоците (норма 3-12).

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

Оценка показателей фагоцитоза

В норме через 90 мин фагоцитарный индекс должен быть ниже, чем через 30 мин и 60 мин, в связи с перевариванием микробов.

При нарушении переваривания он не меняется.

Переваривание микробов оценивают

- посев лизатов лейкоцитов на питательные среды

- подсчет выросших колоний.

НСТ-тест

Метаболическую активность - «дыхательный взрыв» определяют после окраски лейкоцитов раствором **нитросинего тетразолия**. Под влиянием активных форм кислорода НСТ превращается в нерастворимый **формазан**, который выпадает в цитоплазме в виде глыбок голубого цвета. В норме таких лейкоцитов 15-18%, при инфекциях их число увеличивается до 40% и более.

С помощью моноклональных антител определяют антигены фагоцитов (CD14, CD11, CD18, HLA-DR и др.).

Выявляют рецепторы к C3 компоненту комплемента, к иммуноглобулинам и др.

Оценивают спонтанную и направленную миграцию (хемотаксис).

Определяют способность секретировать цитокины (ИЛ-1, α -ФНО и др.) и их уровень в крови.

Система комплемента

- сложная система ферментативных и рецепторных белков сыворотки крови (более 20)
- Активация системы комплемента - цепная ферментативная реакция, при которой каждый предыдущий компонент активирует несколько последующих за счет их ферментативного расщепления

- Белки **классического пути** активации системы комплемента называются компонентами и обозначаются буквой С (С1, С2, С3 и т.д. до С9)
- Белки **альтернативного** пути активации называются факторами и обозначаются большими латинскими буквами (В, Н и т.д.)

Все они образуются в печени и секретируются макрофагами

- При активации компонентов компонента обычно образуется 2 фрагмента
- Большой фрагмент обозначается малой латинской буквой «b» (напр., C3b) является активным, продолжает каскад расщепления
- Меньшие фрагменты в дальнейшей активации компонента обычно не участвуют (кроме C2a), обладают многообразными биологическими функциями
- Они обозначаются малой латинской буквой «a» (например, C3a)
- Комплексы активированных компонентов обозначаются сверху чертой

- Среди регуляторных белков различают естественный **C1-ингибитор**, который тормозит спонтанную активацию C1q компонента
- При дефиците C1 ингибитора возникает наследственный ангионевротический отек (**отек Квинке**)
- Фактор **DAF** или ускоряет деградацию C3b компонента на мембранах собственных клеток организма, предотвращая их лизис
- Альтернативный путь активации блокируется факторами **H, I** и т.д.

Пути активации системы комплемента

- **Классический** (запускается комплексом АГ-АТ в присутствии катионов Са и Mg обычно на поверхности клетки-мишени)
- **Лектиновый** (похож на классический, но активируется лектинами бактерий, например МСБ, С-реактивным белком, фибронектином и т. д.)
- **Альтернативный** (запускается ЛПС клеточной стенки бактерий (эндотоксинами), агрегированными Ig, лекарственными препаратами и т.д.)

Классический путь

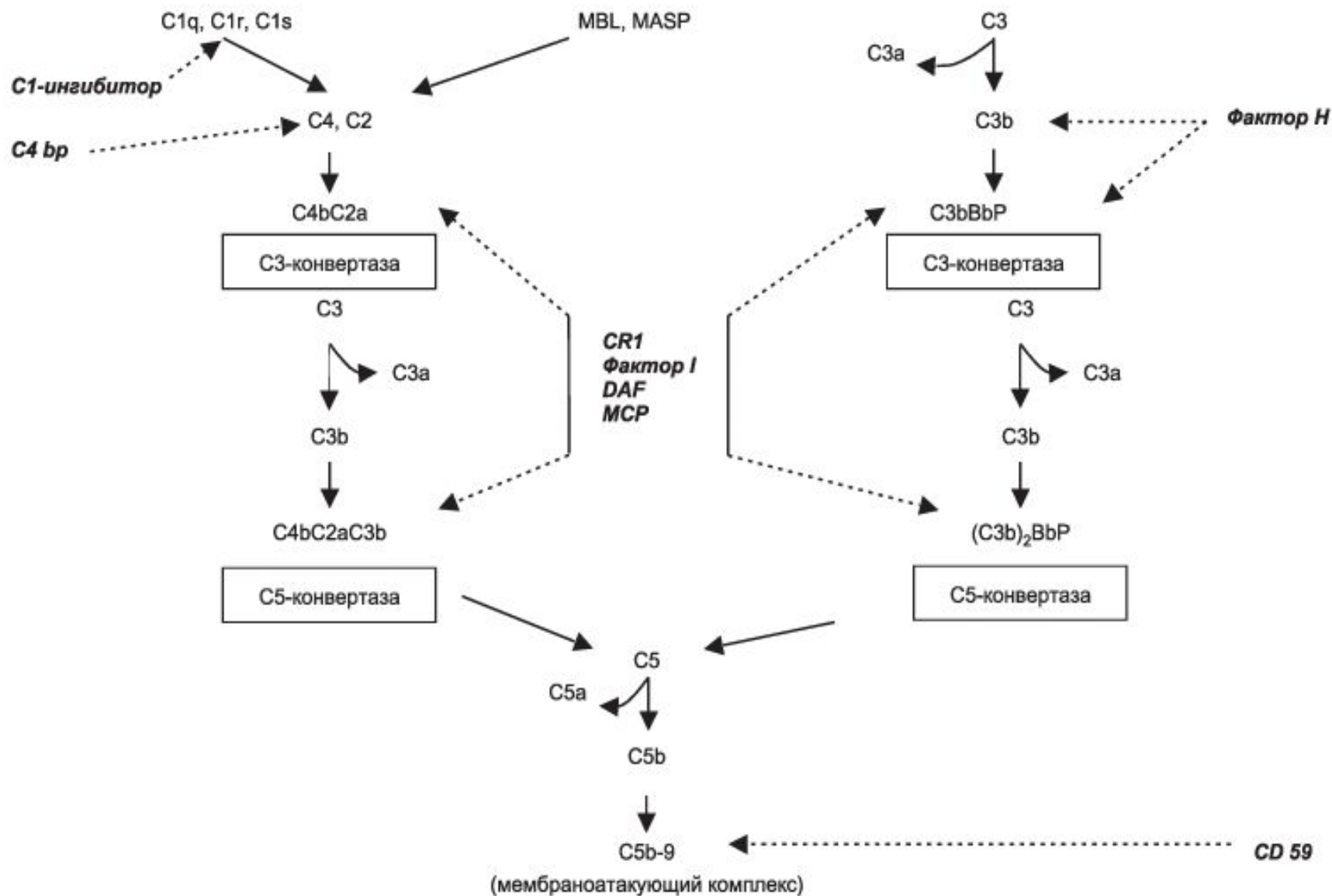
IgM, IgG,
иммунные комплексы

Лектиновый путь

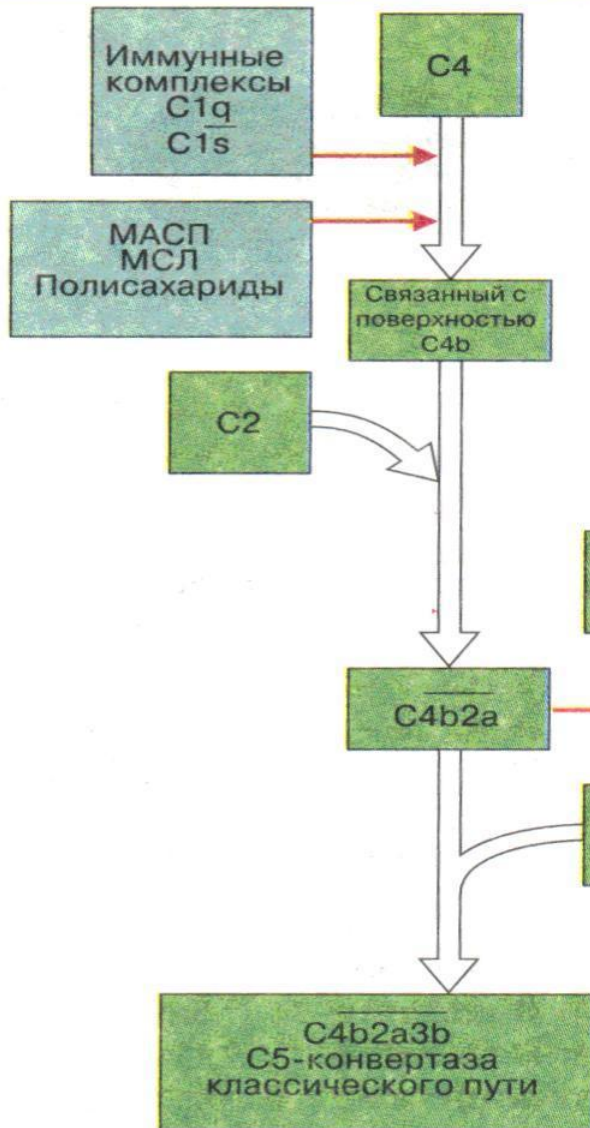
маннозосодержащие Гр «-»
бактерии, микобактерии, грибы

Альтернативный путь

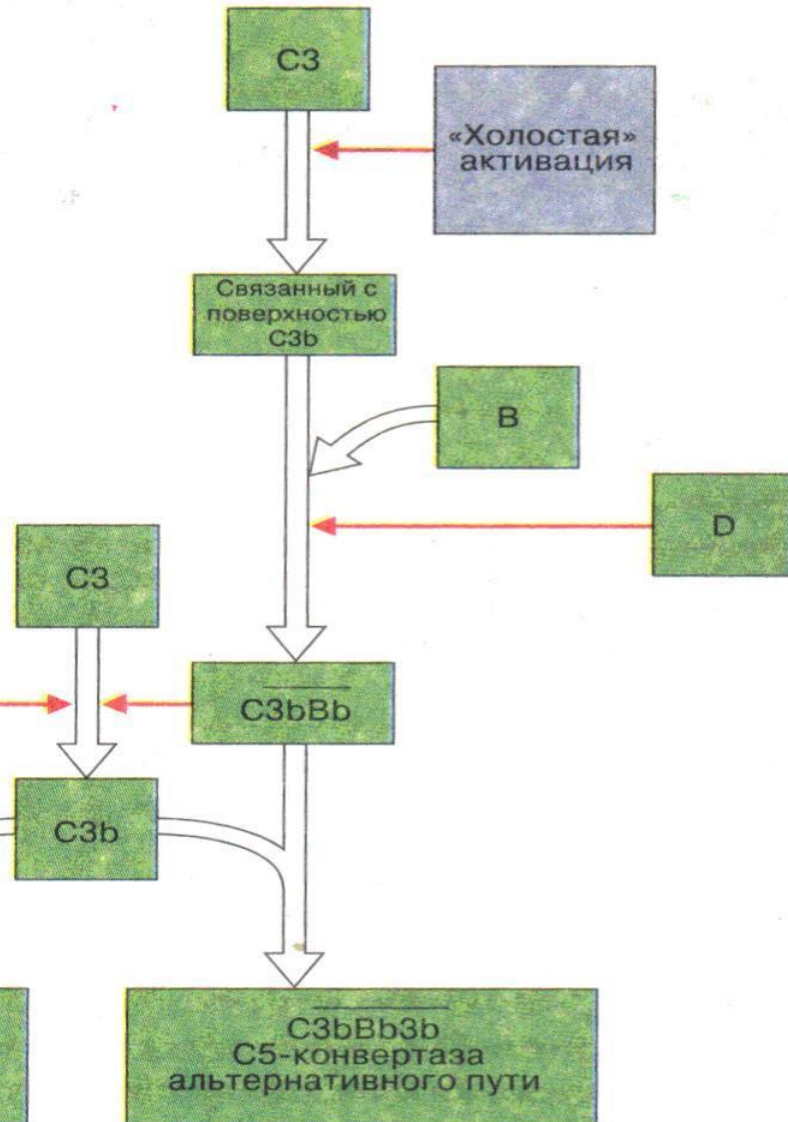
Гр «+», Гр «-» бактерии, бактериальные
токсины, липополисахариды



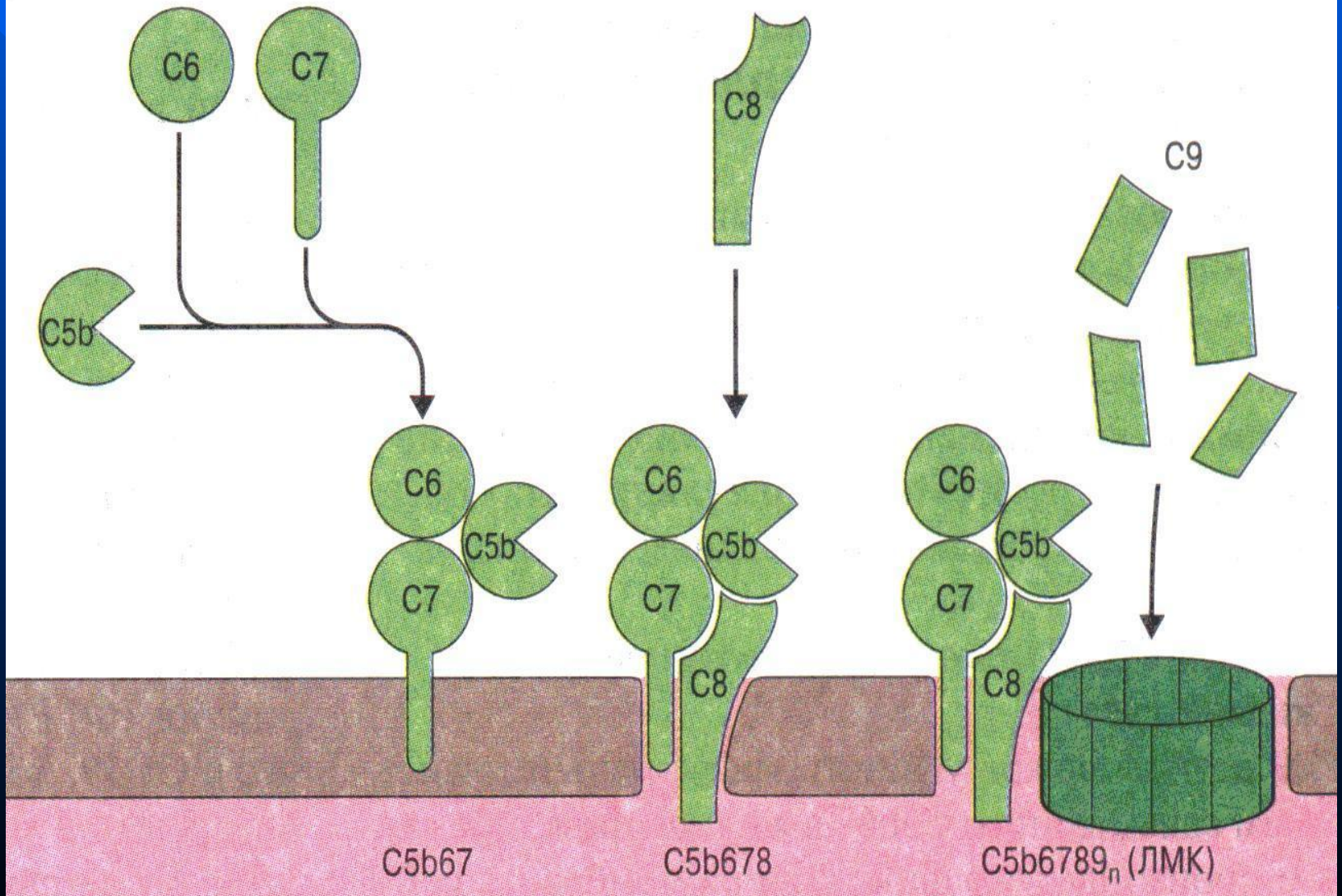
КЛАССИЧЕСКИЙ и ЛЕКТИНОВЫЙ ПУТИ



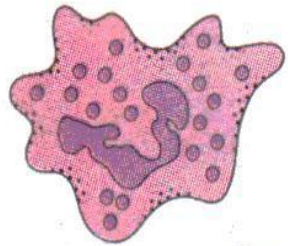
АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПУТЬ



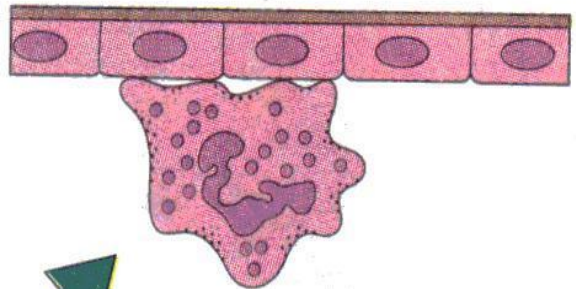
Формирование лизирующего мембрану комплекса



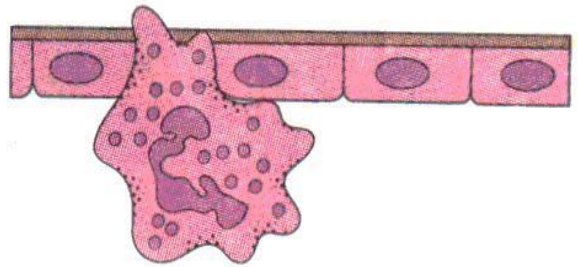
1. Активация
нейтрофилов



2. Адгезия
нейтрофилов



3. Эмиграция и хемотаксис
нейтрофилов



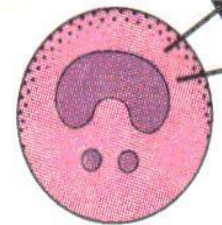
Сокращение гладких
мышц и повышение
проницаемости
сосудов

C5a

ИЛ-1

ИЛ-6

4. Активация
моноцитов



5. Дегрануляция
тучных клеток



Функции системы комплемента

- **Лизис** клеток-мишеней (бактериальных, зараженных вирусом, опухолевых)
- **Опсонизация**, т.е. усиление фагоцитоза через рецепторы к комплексу (например, CD35)
- **Участие в воспалении, хемотаксисе и аллергических реакциях**
- **Растворение иммунных комплексов**, что препятствует их отложению в тканях

Спасибо за внимание