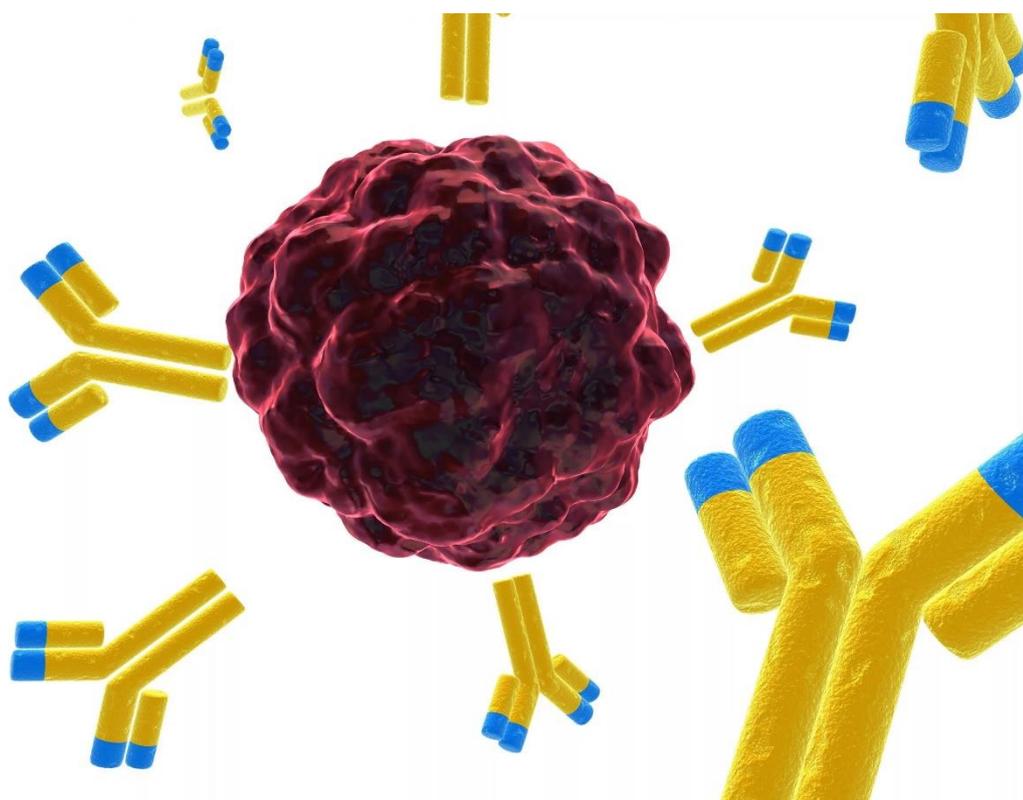


**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ**

# **ИММУНОЛОГИЯ**

*Практикум*



**Пенза 2025**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ**

**Кафедра биологии, биологических технологий и ветеринарно-  
санитарной экспертизы**

**С.А. Сашенкова, Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин**

**ИММУНОЛОГИЯ**

*Практикум*

*для студентов технологического факультета,  
обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария*

Пенза 2025

УДК 577.2 (075)  
ББК 28.074 (Д 75)  
С22

Рецензент – кандидат биологических наук, доцент кафедры ветеринарии ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ **А.В. Остапчук**.

Издается по решению методической комиссии технологического факультета Пензенского ГАУ от 09 июня 2025 г., протокол № 11.

Сашенкова, С.А.

**С22** **Иммунология:** практикум / С.А. Сашенкова, Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин; Пензенский государственный аграрный университет – Пенза: ПГАУ, 2024. – Текст: электронный.  
1СД (121)

Учебное пособие составлено в соответствии с программой курса «Иммунология» для студентов, обучающихся по специальности 36.05.01 Ветеринария. В нем даны краткие теоретические сведения по основным разделам курса, содержатся методические указания по выполнению лабораторных работ, а также кейсы заданий для аудиторной и самостоятельной работы, тестовые задания.

УДК 577.2 (075)  
ББК 28.074 (Д 75)

© С.А. Сашенкова, Г.В. Ильина,  
Д.Ю. Ильин, 2025

© ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ, 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Термин «иммунитет» происходит от латинского слова «*immunis*» – свободный, избавленный от чего-либо (так в древнем Риме называли гражданина, свободного от определенных государственных повинностей). Первоначально этот термин использовался для обозначения устойчивости организма к инфекционным заболеваниям. В настоящее время это определение существенно расширено и касается множества реакций организма на любой чужеродный антиген.

*Антигены* – вещества, специфически взаимодействующие с клеточными рецепторами и вызывающие иммунный ответ организма, в том числе выработку антител.

*Антитела* – вещества белковой природы, вырабатываемые в ответ на проникновение в организм антигена и способные специфически связываться с ним.

*Иммунология* – наука, изучающая реакции организма на чужеродные структуры (антигены), механизмы и проявление этих реакций в норме и патологии, разрабатывающая методы исследования и коррекции иммунных реакций живого организма.

История возникновения иммунологии связана с использованием вакцин для защиты от некоторых инфекционных заболеваний. Так, имеются сведения, что в 1000 г. до н.э. содержимое оспенных папул втирали в кожу здорового человека для защиты от острой формы заболевания. В 1546 итальянский врач Джираламо Фракасторо в книге «О контагии, контагийных болезнях и лечении» вводит термин инфекция и пишет о причинах их распространения и необходимости проведения дезинфекции жилища больных. В 1796 год Эдвард Энтони Дженнер вакцинировал 8-летнего мальчика, втирая в царапину содержимое из пустул оспы коров. В 1798 год он опубликовал результаты своих исследований, сделав отчет о вакцинации и предположив, что легкая форма заболевания коровьей оспой делает организм устойчивым, не восприимчивым к оспе натуральной.

Основоположником современной научной иммунологии является Луи Пастер. В 1881г. он сообщил, что куры при заражении ослабленным возбудителем холеры кур становятся невосприимчивы к вирулентным культурам. На основании этого он сформулировал основной принцип защиты от возбудителя любой инфекционной болезни: организм после встречи с ослабленным возбудителем становится не-

восприимчив к вирулентным микробам того же вида. Л. Пастер в честь Дженнера назвал ослабленные культуры возбудителей инфекционных болезней вакцинами (от лат. «vassa» - корова). Пастером были изготовлены вакцины против сибирской язвы, бешенства, рожи свиней и др.

Большой вклад в развитие иммунологии внес И.И. Мечников. В 1883 г. он открыл фагоцитоз и ввел понятие «клеточный иммунитет». В 1898 г. Эрлих создал теорию гуморального иммунитета. В 1908 г. Мечникову и Эрлиху была присуждена Нобелевская премия за выдающиеся открытия по иммунитету.

В начале XX века было дано понятие анафилаксии и аллергии, открыты группы крови, многие вирусы животных и человека. В 1962 г. Ж. Миллер установил роль тимуса как первичного лимфоидного органа. В 1975 г. Ц. Мильштейн и Д. Кехлер предложили методику получения моноклональных антител. Крупнейшим достижением в иммунологии явилось выделение двух клеточных популяций в иммунном ответе Т- и В-лимфоцитов. Благодаря развитию иммунологии ликвидирована натуральная оспа, снизилось количество «детских» болезней, под контроль удалось взять распространение холеры, брюшного тифа и др. инфекционных заболеваний.

Открытие прионов, как нового класса инфекционных заболеваний и поиск путей профилактики и лечения туберкулеза, кори, ВИЧ, ковида и др. инфекционных заболеваний становятся вызовами XXI века.

Поэтому основные задачи иммунологии сводятся к продолжению изучения закономерностей формирования устойчивости организма к инфекционным болезням и разработке и совершенствованию методов, лечения и профилактики инфекционных болезней животных и человека.

Практикум предназначен для организации аудиторного и самостоятельного изучения дисциплины «Иммунология», целью которой является изучение системы иммунитета животных, механизмов и особенностей его формирования и патологии; приобретение навыков иммунологических исследований для использования в клинической практике и исследовательской работе.

В рамках реализации поставленной цели и приобретения соответствующих компетенций необходимо решить следующие задачи:

- получить представление об иммунологии, как дисциплине в целом, так и об основополагающих разделах общей (фундаменталь-

ной) и частной (клинической) иммунологии;

-изучить роль врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета в поддержании генетической целостности организма в процесс онтогенеза и роль их нарушений в формировании иммунозависимых патологических состояний;

- изучить структурно-функциональное строение системы иммунитета;

- получить современные представления о формах реакций клеточных субпопуляций иммунной системы на антигенное раздражение, значение их взаимодействий и продуцируемых продуктов в реакциях гуморального и клеточного иммунитета;

- рассмотреть генетические структуры, контролирующие функции иммунной системы, и биологическую роль главного комплекса гистосовместимости;

- рассмотреть основные этапы формирования системы иммунитета (антигеннезависимая дифференцировка иммуноцитов) и ее перестройки при антигеном раздражении (антигензависимая дифференцировка клеток иммунной системы);

- научиться использовать методы экспериментальной иммунологии для решения задач прогнозирования, профилактики и лечения заболеваний животных.

В практикуме представлен не только порядок выполнения лабораторных работ, но и дополнительные методические разработки, призванные помочь приобрести необходимые знания, умения и навыки, которые представлены в рабочей программе дисциплины.

# **Иммунологическая лаборатория и иммунодиагностика**

## **Вводные пояснения**

*Иммунологическая лаборатория* предназначена для проведения иммунодиагностики и определения состояния иммунной системы организма.

В ветеринарной практике отдельные иммунологические лаборатории, как правило, не создаются, а функционируют в рамках серологических отделов ветеринарных станций или лабораторий.

Принципы их устройства и функционирования идентичны общелабораторным и включают: обеспечение безопасности сотрудников, исключение выноса инфицированного материала за пределы лаборатории, предотвращение контаминации исследуемого материала посторонней микрофлорой.

Размещают серологические отделы в отдельной комнате помещения, предназначенного для лаборатории, которое должно быть расположено на расстоянии 300-500 метров от жилых объектов. На двери здания должен быть знак, означающий биологическую опасность.

Как и вся лаборатория, серологические отделы должны быть обеспечены холодным и горячим водоснабжением, электричеством, освещением отвечающим нормативам, отоплением, вентиляцией, канализацией.

План помещений должен обеспечивать поточность движения персонала и исследуемого материала, поэтому отделы лаборатории разделяют на «заразную» и «чистую» зоны». В «заразной» зоне осуществляют манипуляции с исследуемым материалом и инфекционными агентами, их хранение. В «чистой» зоне ведут только подготовительные работы. На границе зон находится санитарный пропускник (душевые, санитарные узлы).

В «чистой» зоне располагаются следующие помещения для работы с документами и литературой, для отдыха персонала, для мытья и стерилизации посуды и оборудования, подготовке сред и т.п.

В «заразной» зоне лаборатории размещаются комната для приемки и хранения биологического материала, помещения для обеззараживания патматериала и стерилизации оборудования. Здесь же должны быть расположены емкости с дезинфицирующими

растворами (3%-го хлорамина, или 5%-го фенола). В отдельном помещении в этой зоне располагают комнату для проведения исследований, в том числе иммунологических реакций. В этом помещении располагают термостаты, весы, центрифуги и др. оборудование необходимое для проведения исследований. Если для исследований используются лабораторные животные, то для их содержания отводится отдельное помещение в рамках «заразной» зоны.

В помещениях лаборатории, особенно «заразной» зоны, все поверхности (пола, стен, потолка и оборудования ) должны быть гладкими и устойчивы к многократному воздействию моющих и дезинфицирующих веществ; окна и двери должны быть герметичными, вентиляция приточно-вытяжная с фильтрацией выходящего воздуха и канализацией, обеспечивающей химическое или термическое обеззараживание стоков.

Весь персонал лаборатории проходит инструктаж и обучение безопасным методом труда, обеспечивается спецодеждой, спецобувью, средствами санитарной защиты и другими приспособлениями в соответствии с действующими нормами.

#### *Основные правила работы лаборатории:*

1. Вход в производственное помещение посторонних лиц, а также вход сотрудников в лабораторию без спецодежды и сменной обуви запрещен.

2. Запрещено выходить за пределы лаборатории в халатах и спецобуви или надевать верхнюю одежду на халат, курить, принимать пищу в производственных помещениях и хранить в них продукты питания. В боксе работают в стерильном халате, маске, шапочке, при необходимости надевают резиновые перчатки и очки.

3. Весь материал, поступающий в лабораторию на исследование, должен рассматриваться как инфицированный. С инфекционным материалом нужно обращаться крайне осторожно, при распаковке его банки следует обтирать снаружи дезинфицирующим раствором. Рабочее место на столе прокрывают несколькими слоями марли, увлажненной 5% раствором хлорамина. Переливание жидкостей, производят над кюветой с дезинфицирующим раствором. Пипетки, предметные и покрывные стекла и другую посуду, бывшую в употреблении, обеззараживают, погружая в 5% раствор хлорамина, фенола, лизола или серной кислоты. Запрещается выносить из лаборатории оборудование,

инвентарь, материалы и т. д. без предварительной дезинфекции их на месте.

4. По окончании работы рабочее место приводят в порядок и тщательно дезинфицируют. Материал, необходимый для дальнейшей работы маркируют и ставят на хранение в холодильник, который опечатывают.

5. Руки в перчатках промывают 5% раствором хлорамина, затем перчатки снимают и руки обеззараживают вторично, дезинфицируют спиртовым раствором и моют.

Вся работа лаборатории фиксируется документально. Для этого в каждой лаборатории ведутся следующие журналы: для регистрации поступившего материала, проведенных исследований, серологических исследований и др.

*Иммунодиагностика* - это совокупность иммунологических методов, позволяющих выявить то или иное заболевание или определить возбудителя в исследуемом материале. Эти методы используют для оценки иммунного статуса животных, т.е. для характеристики состояния иммунной системы. Методы иммунодиагностики делятся на две группы: *неспецифические и специфические*.

*Неспецифические методы* позволяют определить качественное, количественное и функциональное состояние различных звеньев системы иммунитета. Например, количество и соотношение видов лейкоцитов в крови, общее количество Т и В-лимфоцитов, их функциональную активность. У Т-лимфоцитов определяют пролиферативную и цитотоксическую активность. Активность В-лимфоцитов определяют по их функциональным продуктам – иммуноглобулинам G-, M-, A-классов в сыворотке крови и различных биологических жидкостях как общее их количество так и каждого класса.

Для диагностики гуморальных факторов определяют также наличие цитокинов, активность лизоцима, комплемента и др.

*Специфические методы* позволяют выявить способность иммунной системы реагировать на антиген и формировать адаптивный иммунитет или выявить определенный антиген. Эту группу методов можно разделить на две подгруппы:

1. Методы иммунодиагностики с использованием проявления гуморального иммунного ответа. Именно на его закономерностях строятся гуморальные методы исследований, или серодиагностика. Серологическую диагностику проводят путем постановки особых диагностических (серологических) реакций: преципитации,

агглютинации, связывания комплемента, нейтрализации и др. Эти реакции основываются на взаимодействии антигена и специфических антител (преципитинов, агглютининов, антитоксинов, комплементсвязывающих антител и др.).

Имея известный антиген (стандартный диагностикум), изготовленный из микробов определенного вида, можно выявить антитела в исследуемых сыворотках крови животного и благодаря этому диагностировать инфекционное заболевание. В качестве антигенов применяют взвеси живых или убитых микробов, экстракты или изолированные химические фракции из них.

2. Методы иммунодиагностики с использованием проявления клеточного иммунного ответа в котором участвуют Т-лимфоциты и В-лимфоциты .

Методы основаны на реакции антигена с сенсibilизированными лимфоцитами (клетки, ранее встречавшиеся с данным антигеном). Наибольшее значение среди этих методов иммунодиагностики имеет аллергическая проба. Это диагностика инфекционных болезней с помощью реакций, выявляющих повышенную чувствительность клеток и тканей организма к специфическим инфекционным аллергенам. На введение аллергена (в кожу, под кожу, на слизистые оболочки) инфицированный организм отвечает аллергической реакцией, которая протекает как местное (гиперемия, отек, болезненность) или общее (угнетение, повышение температуры тела, учащение дыхания, нарушение сердечной деятельности) явление. В неинфицированном организме таких явлений при введении аллергенов не наблюдают.

### **Задания**

1. Опишите устройство и функционирование иммунологической лаборатории.

2. Нарисуйте схему методов иммунодиагностики, используя вводные пояснения.

3. Приведите примеры использования аллергенов для диагностики заболеваний, заполните таблицу 1.

Таблица 1 – Аллергены, используемые в иммунодиагностике

Аллерген	Характеристика	Заболевание
Туберкулин		
Маллеин		
Бруцеллин		
Тулярин		
Антраксин		

4. Определить бактерицидную активности кожи в отношении кишечной палочки.

#### Ход работы

1. Суточную бульонную культуру кишечной палочки развести в физ. растворе до концентрации 1:50000 по стандарту мутности (1мл на 5 мл физ. раствора).

2. Полученную взвесь с помощью пипетки в объеме 1-2 капли нанести на внутреннюю поверхность предплечья обеих рук и распределить равномерно стерильным шпателем.

3. С обработанного участка кожи одной руки сразу сделать отпечаток на предметное стекло со средой Эндо, а через 15 минут - со смежного участка другой руки.

4. Стекла со средой Эндо поместить в стерильные пустые чашки Петри.

5. Инкубировать посева 18-24 часа при 37 °С.

6. Подсчитать количество колоний на 3 см<sup>2</sup> поверхности каждой пластины и определить индекс бактерицидности (ИБ), который вычисляют по формуле 1:

$$\text{ИБ} = \frac{K_1 - K_2}{K_1} \times 100 \% , \quad (1)$$

где  $K_1$  – количество колоний сразу после нанесения на кожу,

$K_2$  – количество колоний через 15 минут после контакта.

7. Сделайте вывод, учитывая, что у здоровых людей индекс бактерицидности равен 90-100 %.

## Контрольные вопросы

1. Что такое иммунодиагностика и, какие методы диагностики вам известны?
2. В чем отличие неспецифических методов диагностики?
3. К какой группе методов и почему следует отнести определение бактерицидной активности кожи?
4. Что такое аллергены и для чего они используются в иммунодиагностике?
5. Какие принципы лежат в основе организации работы иммунологической лаборатории?

## Иммунная система, её функции и виды иммунитета

### Вводные пояснения

Иммунная система объединяет органы и ткани, в которых происходит образование, созревание и взаимодействие клеток иммунной системы, выполняющих функцию распознавания генетически чужеродных субстанций (антигенов) и осуществляющих специфические реакции, направленные на обезвреживание антигенов.

Иммунная система представлена центральными и периферическими органами лимфоидного происхождения. К центральным органам относятся тимус, фабрициева сумка у птиц, пейеровы бляшки и костный мозг. Лимфатические узлы, миндалины, селезенка и кровь представляют периферические лимфоидные образования.

**Центральные органы иммунной системы.** *Тимус* (зобная, грудная, вилочковая железа) является центральным, первичным, лимфоидным органом, состоит из двух долей, разделенных на более мелкие дольки. В каждой дольке имеются корковый и мозговой слои. В корковом слое много малых лимфоцитов (тимоцитов), отличающихся высокой митотической активностью, а в мозговом слое тимоциты встречаются в меньшем количестве. Из эпителиальных клеток в мозговом слое тимуса местами образуются островки – тельца вилочковой железы.

Лимфоциты коркового слоя прогрессивно дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты и мигрируют в мозговой слой, а затем в кровь. На ряду с Т-лимфоцитами из вилочковой железы выделяются в кровь гуморальные вещества (гормоноподобные), стимулирующие созревание Т-лимфоцитов.

Лимфоциты в тимусе располагаются островками, и получили они

название пакетов Кларка, в каждом из которых находятся 1-2 макрофага. Из высокой митотической активности в тимусе высоко содержание нуклеиновых кислот, больше, чем в других тканях.

Тимус формируется на ранних стадиях утробного развития, и его масса увеличивается до периода половозрелости, а относительная масса его уменьшается с момента рождения. Однако орган полностью никогда не исчезает.

При удалении вилочковой железы у молодняка развиваются тяжелые трофические расстройства, характеризующиеся истощением, замедлением роста дерматитами и диареей. Иммунные нарушения проявляются атрофией тимусзависимых зон селезенки и лимфатических узлов, ослаблением иммунных реакций.

*Сумка Фабрициуса* (Фабрициева сумка) этот орган имеется только у птиц; располагается на дорзальной поверхности прямой кишки и с помощью протока связан с задней камерой клоаки. Развивается к 13-му дню эмбрионального развития у кур.

Фабрициева сумка является онтогенетически вторым из первичных лимфоидных органов у птиц. Это полое образование соединяется с клоакой протоком, выстлано слизистой оболочкой в виде первичных и вторичных складок, на поверхности которых локализованы многочисленные лимфатические узелки. В них различают центральную – мозговую и периферическую – корковую зоны. В мозговом слое преобладают большие и средние лимфоциты, а в корковом – малые лимфоциты. Инволюция сумки начинается с 8-1 недели жизни цыплят; удаление ее сопровождается прекращением синтеза антител.

*Пейеровы бляшки* (групповые лимфатические фолликулы) располагаются в подслизистом слое тонкого отдела кишечника и представляют собой совокупность отдельных зародышевых центров, окруженных скоплениями лимфоцитов. Эти лимфатические образования отделены от просвета кишечника только эпителием, между клетками которого тоже встречаются лимфоциты.

*Костный мозг* является одним из центральных органов иммунной системы, где из стволовых клеток формируется В-система лимфоидных клеток. Такое мнение подтверждается тем, что большинство лимфоцитов костно-мозгового происхождения относится к В-лимфоцитам.

**Периферические (вторичные) лимфоидные органы.** *Лимфатические узлы* представляют собой встроенные в систему лимфатических сосудов фильтрующие станции из лимфоретикулярной ткани. У

млекопитающих лимфатические узлы – многочисленные образования, локализованные в местах слияния лимфатических сосудов. Они располагаются по пути только лимфы и потому являются важнейшими барьерно-фильтрационными органами, в которых задерживаются и подвергаются фагоцитозу микроорганизмы и различные чужеродные частицы.

Лимфатические узлы – периферические органы лимфоидного кроветворения и иммунной защиты. На антигенное воздействие в лимфоидной ткани узла образуются плазматические клетки и система эффекторных Т-клеток.

Лимфоидная ткань узла представлена многочисленными клетками лимфоидного ряда, макрофагами с ретикулярными клетками и капиллярно-сосудистой сетью. В наружной зоне узла (корковое вещество) располагаются лимфатические фолликулы, а в центре узла – мозговое вещество. Зона между корковым и мозговым веществами, состоящая из диффузной лимфоидной ткани, именуется паракортикальной зоной. Лимфатические фолликулы коркового вещества из-за неравномерного распределения клеток разных типов при окрашивании имеют неоднородный характер. Светлые центры в фолликулах появляются под влиянием антигенного воздействия на организм животного. Эти светлые центры отсутствуют в лимфатических фолликулах животных в период их эмбрионального развития, а также у особей, выращенных в стерильных условиях.

В центре фолликулов имеются особые дендритные клетки сложной отростчатой формы, на которых фиксируется комплекс антиген – антитела, где и осуществляется их контакт с В-лимфоцитами. В светлом центре располагаются свободные макрофаги, фагирующие продукты распада лимфоцитов, погибающих при массовом антигеном раздражении.

В периферической зоне фолликулов сосредоточены преимущественно малые лимфоциты (В-клетки). Фолликулы лимфатического узла относятся к тимуснезависимым образованиям лимфоидной системы, микроструктура, которая зависит от фазы иммунного ответа.

Паракортикальная зона заполнена Т-лимфоцитами и относится к тимусзависимым образованиям. В этой зоне располагаются макрофаги с многочисленными отростками. Полагают, что они индуцируют пролиферацию и дифференциацию Т-лимфоцитов в клетке Киллеры клеточного иммунитета.

Мозговые тяжи узла располагаются по ходу кровеносных сосу-

дов в мозговом веществе и поддерживаются с помощью ретикулярных волокон. По ходу этих тяжей, от корковой зоны к воротам, происходит созревание плазматических клеток.

Лимфа в лимфатическом узле циркулирует по лимфатическим синусам, в просвете которых находятся фиксированные клетки с отростками, свободные макрофаги и лимфоциты. В синусах происходит поглощение значительной части антигенов.

Гемолимфотические узлы встречаются у животных в виде небольших желтых и красных узлов вдоль грудной, брюшной аорты и почечных сосудов, и по строению они сходны с обычными лимфатическими узлами. Предполагают, что в гемолимфатических узлах и после рождения сохраняется миелоидное кроветворение.

*Лимфоидные образования пищеварительного тракта* в слизистой оболочке пищеварительного тракта на всем его протяжении имеются скопления лимфоидных элементов лимфоидных элементов в виде диффузной лимфоидной ткани, одиночных фолликул и группы фолликул. К наиболее крупным лимфоидным образованиям относится глоточное лимфоидное кольцо.

Лимфоидные фолликулы кишечной стенки по строению и клеточному составу схожи с фолликулами лимфатических узлов. В лимфоидных образованиях кишечника происходят иммунологические реакции, опосредованные Т- и В-лимфоцитами. Предполагают, что здесь образуются в значительном количестве плазматические клетки, которые и синтезируют иммуноглобулины типа А.

*Селезенка* располагается на большой кривизне желудка, а у жвачных – на рубце. У разных видов животных она имеет разные формы и размеры. Характерный цвет селезенки (от красно-коричневого до синеволетового) обусловлен наличием в ней значительной массы крови.

Селезенка является также одним из основных лимфоидных органов, в котором синтезируются преимущественно антитела гуморального типа. Кроме того, в селезенке при участии макрофагов происходит разрушение эритроцитов, продукты распада которых (железо, белки) вновь используются в синтетических процессах.

Основным в структуре селезенки является опорно-сократительный аппарат, состоящий из капсулы и системы трабекул. Межтрабекулярное пространство заполнено белой и красной пульпами.

Белая пульпа представляет собой совокупность округлых светло-серых узелков, рассредоточенных по всему органу. Число этих узелков

у крупного рогатого скота больше, чем у лошадей и свиней.

Светлый центр узелка селезенки соответствует фолликулам лимфоузла и является тимусзависимым участком. Строение центра характеризует функциональное состояние узелка, и изменяется оно при инфекционных процессах. Узелок окружает маргинальная зона, состоящая из Т- и В-лимфоцитов и макрофагов, где происходит, по видимому, кооперативное взаимодействие клеток разных типов в иммунном ответе. В результате такого взаимодействия В-лимфоциты пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки, которые накапливаются в тяжах красной пульпы.

Красная пульпа занимает большую часть (до 70 %) массы селезенки и располагается между узелками и трабекулами. Цвет пульпы обусловлен содержанием значительного количества эритроцитов. Наряду с ними в ретикулярной ткани органа содержатся плазматические клетки и макрофаги. Через красную пульпу проходят многочисленные сосуды (артериолы, капилляры, и венозные синусы). Между синусами красной пульпы располагаются селезеночные (пульпарные) тяжи, в которых много лимфоцитов, и здесь происходит созревание плазматических клеток. Макрофаги же пульпы фагоцитируют поврежденные эритроциты, участвуют в обмене железа.

Итак, иммунитет – защита организма от генетически чужеродных веществ антигенов, обеспечивающая сохранение и поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма, также биологический индивидуальности и видовых различий. Принято выделять следующие виды иммунитета: *врожденный иммунитет*, обусловленный наследственными особенностями вида или отдельного организма и *приобретенный иммунитет*, формирующийся при взаимодействии клеток иммунной системы с антигенами. Последний, в свою очередь, подразделяют на *активный*, возникающий после перенесенного заболевания или после введения вакцины, и *пассивный*, который развивается при введении в организм готовых антител в виде сыворотки или передаче их новорожденному с молозивом матери или внутриутробным способом.

Кроме того, выделяют следующие виды иммунитета:

1) *антитоксический*, направленный на нейтрализацию бактериальных токсинов, ядов змей, насекомых и т.д.;

2) *антимикробный*, проявляющийся фагоцитозом, выработкой антител, способствующих растворению, агглютинацией микроорганизмов, облегчающих их фагоцитоз;

3) *противовирусный*, заключающийся в выработке противовирусных антител, образовании в лимфоидных клетках особого белка – интерферона, подавляющего размножение вирусов;

4) *противоопухолевый*, заключающийся в уничтожении клеток, имеющих признаки эмбрионального тератогенного характера.

В процессе усложнения организмов появились новые, более совершенные, специализированные защитные взаимосвязанные реакции клеточного и гуморального иммунитета.

В осуществлении *клеточного иммунитета* решающая роль принадлежит Т-лимфоцитам, функции и классификация которых будет рассмотрена в следующих темах. *Гуморальный иммунитет* связан с деятельностью В-лимфоцитов – клеток, имеющих общую с Т-лимфоцитами клетку-предшественницу. Однако в отличие от Т-лимфоцитов, которые созревают и дифференцируются в тимусе, у птиц это сумка *фабриция*, красный костный мозг, В-лимфоциты созревают и дифференцируются в периферических лимфоидных органах.

Также приобретённый иммунитет может быть *стерильным*, если возбудителя нет в организме, и *нестерильным*, если возбудитель находится в организме. Эти характеристики используются для антитоксического, антимикробного и противовирусного иммунитетов.

## Задания

1. Рассмотрите рисунок 1, изучите и зарисуйте строение красного костного мозга.

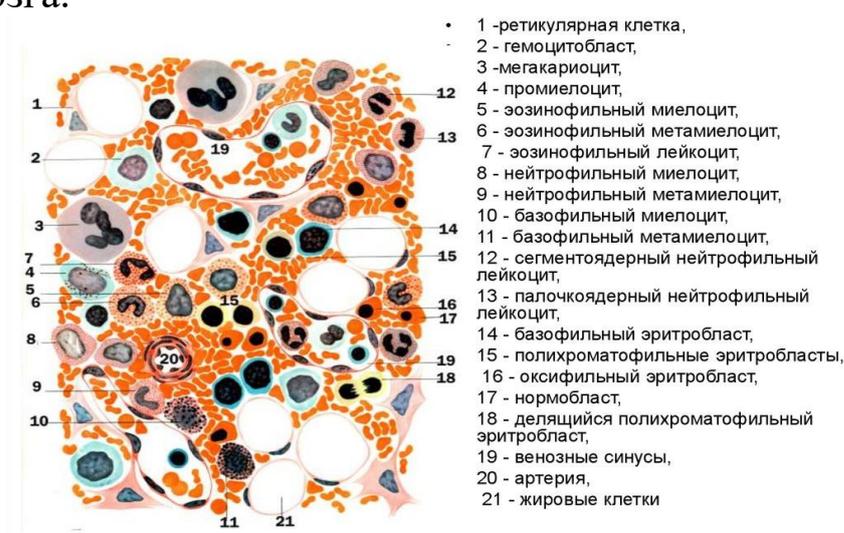
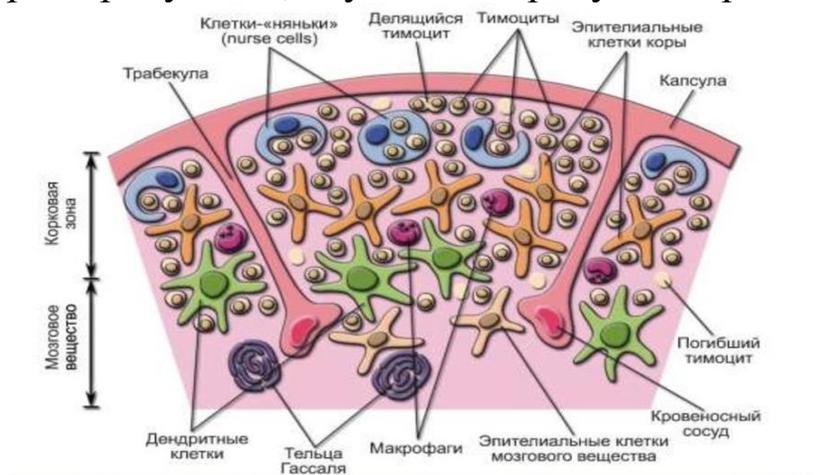


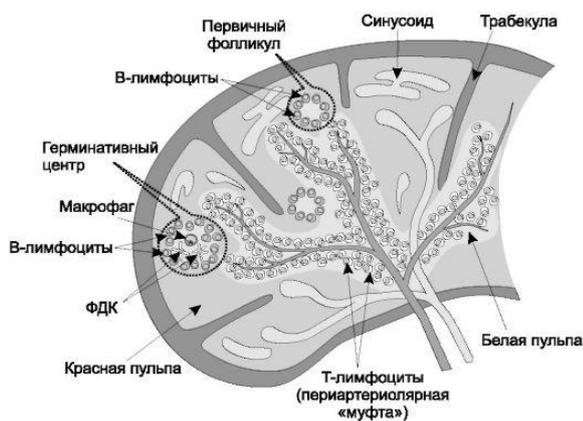
Рисунок 1 – Строение красного костного мозга

2. Рассмотрите рисунок 2, изучите и зарисуйте строение тимуса.



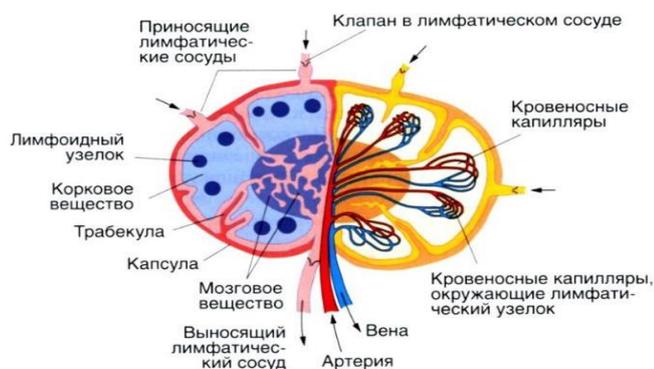
*Рисунок 2 – Строение тимуса*

3. Рассмотрите рисунок 3, изучите и зарисуйте строение селезенки.



*Рисунок 3 – Строение селезенки*

4. Рассмотрите рисунок 4, изучите и зарисуйте строение лимфатического узла.



*Рисунок 4 – Строение лимфатического узла*

5. Изучите классификацию видов иммунитета и, используя вводные пояснения, нарисуйте схему.

6. Изучите последовательность приготовления мазка крови и отработайте практические навыки, используя следующую схему действий.

### Ход работы

1. Подготовьте предметные стекла, с помощью которых делают мазок. Для этого стекла, бывшие в употреблении со следами иммерсионного масла, моют и помещают в мыльный раствор на 8-10 часов, затем кипятят в нем 5-10 минут. После этого стекла промывают проточной водой и вытирают насухо. Чистые стекла просто моют в горячей воде. Хранят стекла в стеклянной банке с притертой крышкой в смеси Никифорова (спирт и эфир 1:1). Перед употреблением стекла достают пинцетом и насухо вытирают полотняной или шелковой тряпочкой.

2. Взяв предметное стекло за длинные края, не прикасаясь к его поверхности, на расстоянии 0,5-1 см от узкого края нанести каплю крови. Правой рукой приставить шлифованное стекло или другое чистое предметное стекло к краю капли и, наклонив его на  $45^\circ$ , чтобы кровь растеклась по углу, образованному двумя стеклами, провести по стеклу. Движение должно быть легким и быстрым. Нельзя давить и останавливаться, иначе мазок будет тонким и неравномерным, что существенно ухудшит его качество. После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.

3. Зафиксируйте мазки, погружая их в стаканчик с фиксажем: 3 г сернокислого цинка, 1 г хлористого натрия, 100 мл воды. на 1 мин. Можно обрабатывать сразу несколько стекол, помещая их в специальный лоток для фиксации и окрашивания. Затем мазки кладут на фильтровальную бумагу и высушивают в термостате при  $+37^\circ\text{C}$ .

4. Окрасьте мазок по Романовскому-Гимзе. Для этого используются предварительно приготовленные растворы азура (1 г азура + 1 л воды) и эозина (1 г эозина + 1 л воды), которые оставляют на сутки. Непосредственно перед окрашиванием смешивают раствор азура с раствором эозина и водой (в пропорции 2:1:2) и в эту смесь погружают мазки на 30-40 минут. Смывают краситель проточной водой и высушивают на воздухе.

## Контрольные вопросы

1. Какие органы и ткани формируют иммунную систему?
2. Почему выделяют центральные и периферические органы?
3. Какие виды иммунитета вам известны, чем они отличаются?
4. В чем отличия между клеточным и гуморальным иммунитетом?
5. К каким видам иммунитета и почему применимы термины стерильный и нестерильный?
6. Как правильно изготовить мазок крови?

## Клетки иммунитета

### Вводные пояснения

Лейкоциты – клетки, обеспечивающие иммунные реакции, делятся на три главные группы: гранулоциты, моноциты и лимфоциты.

*Гранулоциты* содержат многочисленные лизосомы, секреторные пузырьки и гранулы. В соответствии с различным характером окраски этих гранул гранулоциты делятся на нейтрофилы, базофилы и эозинофилы (рис. 5).

*Нейтрофилы* имеют фиолетово-розовую окраску гранул, они способны к фагоцитозу и к активному амебоидному движению, могут выходить за пределы кровеносных сосудов. Они являются *микрофагами*, то есть способны поглощать лишь относительно небольшие чужеродные частицы или клетки. После фагоцитирования чужеродных частиц нейтрофилы обычно погибают, высвобождая большое количество биологически активных веществ, повреждающих бактерии и грибы, усиливающих воспаление и хемотаксис иммунных клеток в очаг. Нейтрофилы содержат большое количество миелопероксидазы, фермента, который способен окислять анион хлора до гипохлорита – сильного антибактериального агента. Миелопероксидаза как гемсодержащий белок имеет зеленоватый цвет, что определяет зеленоватый оттенок самих нейтрофилов, цвет гноя и некоторых других выделений, богатых нейтрофилами. Погибшие нейтрофилы вместе с клеточным детритом из разрушенным воспалением тканей и гноеродными микроорганизмами, послужившими причиной воспаления, формируют массу, известную как гной.

Нейтрофилы играют очень важную роль в защите организма от бактериальных и грибковых инфекций, и сравнительно меньшую – в

защите от вирусных инфекций. В противоопухолевой или антигельминтной защите нейтрофилы практически не играют роли.

Нейтрофильный ответ (инфильтрация очага воспаления нейтрофилами, повышение числа нейтрофилов в крови, сдвиг лейкоцитарной формулы влево с увеличением доли «юных» форм, указывающий на усиление продукции нейтрофилов костным мозгом) – самый первый ответ на бактериальные и многие другие инфекции. Нейтрофильный ответ при острых воспалениях и инфекциях всегда предшествует более специфическому лимфоцитарному. При хронических воспалениях и инфекциях роль нейтрофилов незначительна и преобладает лимфоцитарный ответ (инфильтрация очага воспаления лимфоцитами, абсолютный или относительный лимфоцитоз в крови).

*Эозинофилы* имеют розовую окраску гранул и защищают организм от паразитов, способствуют развитию аллергических реакций. Уровень эозинофилов повышается при глистных инвазиях. При окраске по Романовскому интенсивно окрашиваются кислым красителем эозином и не окрашиваются основными красителями, в отличие от базофилов (окрашиваются только основными красителями) и от нейтрофилов (поглощают оба типа красителей). Так же отличительным признаком эозинофила является двудольчатое ядро (у нейтрофила оно имеет 4-5 долей, а у базофила не сегментировано).

Эозинофилы способны к активному амебоидному движению, к экстравазации (проникновению за пределы стенок кровеносных сосудов) и к хемотаксису (преимущественному движению в направлении очага воспаления или повреждения ткани).

Эозинофилы, как и нейтрофилы, способны к фагоцитозу, причём являются микрофагами, то есть способны, в отличие от макрофагов, поглощать лишь относительно мелкие чужеродные частицы или клетки. Однако, эозинофил не является "классическим" фагоцитом, его главная роль не в фагоцитозе. Главнейшее их свойство - экспрессия Fc-рецепторов, специфичных для Ig E. Физиологически это проявляется в мощных цитотоксических, а не фагоцитарных, свойствах эозинофилов, и их активном участии в противопаразитарном иммунитете. Однако, повышенная продукция антител класса E может привести к аллергической реакции немедленного типа (анафилактический шок), что является главным механизмом всех аллергий такого типа.

Также эозинофилы способны поглощать и связывать гистамин и ряд других медиаторов аллергии и воспаления. Они также обладают

способностью при необходимости высвобождать эти вещества, подобно базофилам. То есть эозинофилы способны играть как про-аллергическую, так и защитную анти-аллергическую роль. Процентное содержание эозинофилов в крови увеличивается при аллергических состояниях.

Эозинофилы менее многочисленны, чем нейтрофилы. Большая часть эозинофилов недолго остаётся в крови и, попадая в ткани, длительное время находится там.

*Базофилы* имеют сине-фиолетовую окраску гранул. Основная их функция – выделение гистамина, который участвует в воспалительных реакциях. Базофилы имеют S-образное ядро, зачастую не видимое из-за перекрытия цитоплазмы гранулами гистамина и прочих аллергомедиаторов. Получили свое названия из-за интенсивного поглощения основного красителя при окраске по Романовскому. Базофилы – очень крупные гранулоциты: они крупнее и нейтрофилов, и эозинофилов. Гранулы базофилов содержат большое количество гистамина, серотонина, лейкотриенов, простагландинов и других медиаторов аллергии и воспаления.

Базофилы принимают активное участие в развитии аллергических реакций немедленного типа (реакции анафилактического шока). Существует заблуждение, что базофилы являются предшественниками лаброцитов. Тучные клетки очень похожи на базофилов. Обе клетки имеют грануляцию, содержат гистамин и гепарин. Обе клетки также выделяют гистамин при связывании с иммуноглобулином E. Это сходство заставило многих предположить, что тучные клетки и есть базофилы в тканях. Кроме того, они имеют общий предшественник в костном мозге. Тем не менее, базофилы покидают костный мозг уже зрелыми, в то время как тучные клетки циркулируют в незрелом виде, только со временем попадают в ткани. Благодаря базофилам яды насекомых или животных сразу блокируются в тканях и не распространяются по всему телу. Также базофилы регулируют свертываемость крови при помощи гепарина. Базофилы способны к экстравазации (эмиграции за пределы кровеносных сосудов), причём могут жить вне кровеносного русла, становясь резидентными тканевыми лаброцитами (тучными клетками).

Базофилы обладают способностью к хемотаксису и фагоцитозу. Кроме того, по всей видимости, фагоцитоз не является для базофилов ни основной, ни естественной (осуществляемой в естественных физиологических условиях) активностью. Единственная их функция –

мгновенная дегрануляция, ведущая к усилению кровотока, увеличению проницаемости сосудов, росту притока жидкости и прочих гранулоцитов. Другими словами, главная функция базофилов заключается в мобилизации остальных гранулоцитов в очаг воспаления.

*Моноциты* – самые крупные из лейкоцитов, относящийся к *агранулоцитам*. Выходя из кровяного русла, они становятся *макрофагами* – крупными клетками серо-голубого цвета. Как и нейтрофилы, они способны к фагоцитозу. Макрофаги, однако, значительно больше по размерам и дольше живут, чем нейтрофилы. Это одноядерная клетка с эксцентрично расположенным полиморфным ядром, имеющим рыхлую хроматиновую сеть, и с азурофильной зернистостью в цитоплазме.

Моноцит – наиболее активный фагоцит периферической крови. Клетка овальной формы с крупным бобовидным, богатым хроматином ядром (что позволяет отличать их от лимфоцитов, имеющих округлое тёмное ядро) и большим количеством цитоплазмы, в которой имеется множество лизосом.

Помимо крови, эти клетки всегда присутствуют в больших количествах в лимфатических узлах, стенках альвеол и синусах печени, селезенки и костного мозга.

Моноциты находятся в крови 2-3 дня, затем они выходят в окружающие ткани, где, достигнув зрелости, превращаются в тканевые макрофаги – гистиоциты. Моноциты также являются предшественниками клеток Лангерганса, клеток микроглии и других клеток, способных к переработке и представлению антигена.

Моноциты способны фагоцитировать микробов в кислой среде, когда нейтрофилы неактивны. Фагоцитируя микробов, погибших лейкоцитов, поврежденные клетки тканей, моноциты очищают место воспаления и подготавливают его для регенерации. Эти клетки образуют отграничивающий вал вокруг неразрушаемых инородных тел.

Активированные моноциты и тканевые макрофаги:

- осуществляют противоопухолевый, противовирусный, противомикробный и противопаразитарный иммунитет, производят цитокины, интерлейкин (ИЛ-1), фактор некроза опухоли (ФНО), интерферон;
- участвуют в регуляции гемопоэза(кроветворения);
- принимают участие в формировании специфического иммунного ответа организма.

Вблизи воспалительного очага моноциты могут размножаться делением, также способны, подобно другим макрофагам, выполнять процессинг антигенов и представлять антигены Т-лимфоцитам для распознавания и обучения, то есть являются антигенпрезентирующими клетками иммунной системы.

Моноциты продуцируют как факторы, усиливающие свертывание крови (тромбоксаны, тромбопластины), так и факторы, стимулирующие фибринолиз (активаторы плазминогена). В отличие от В- и Т-лимфоцитов, макрофаги и моноциты не способны к специфическому распознаванию антигена.

Таким образом, фагоцитами являются гранулярные нейтрофилы и более крупные и долгоживущие агранулярные макрофаги (моноциты).

*Лимфоциты* – клетки, относящиеся к агранулоцитам и отвечающие за специфический иммунный ответ. Они подразделяются на Т-лимфоциты, В-лимфоциты и нормальные (естественные) киллеры (NK-клетки).

*Т-лимфоциты*, или *Т-клетки* – это лимфоциты, развивающиеся у млекопитающих в тимусе из предшественников (претимоцитов), поступающих в него из красного костного мозга. В тимусе Т-лимфоциты дифференцируются, приобретая Т-клеточные рецепторы (TCR) и различные ко-рецепторы (поверхностные маркеры). Играют важную роль в приобретённом иммунном ответе. Обеспечивают распознавание и уничтожение клеток, несущих чужеродные антигены, усиливают действие моноцитов, NK-клеток.

Т-лимфоциты подразделяются на несколько видов, в зависимости от выполняемых функций и наличия на поверхности комплекса белков, которые называются факторами кластерной дифференцировки (CD) или рецепторами, ответственными за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Так все Т-лимфоциты имеют комплекс белков CD3. В функции CD3 комплекса входит передача сигналов в клетку, а так же стабилизация Т-клеточного рецептора на поверхности мембраны. В зависимости от выполняемых функций различают следующие типы Т-клеток.

*Т-хелперы* – это Т-лимфоциты, главной функцией которых является усиление адаптивного иммунного ответа. Они активируют другие клетки иммунитета (Т-киллеры, В-лимфоциты, моноциты, NK-клетки), а также выделяют цитокины. Основным признаком Т-

хелперов служит наличие на поверхности клетки молекулы корцептора CD4. Т-хелперы распознают антигены при взаимодействии их Т-клеточного рецептора с антигеном, связанным с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса.

*Т-киллеры* – это цитотоксические Т-лимфоциты, главной функцией которых является уничтожение повреждённых клеток собственного организма. Мишенями Т-киллеров являются клетки, поражённые внутриклеточными паразитами (вирусами и некоторыми бактериями), опухолевые клетки. Т-киллеры являются главным компонентом противовирусного иммунитета. Основным признаком Т-киллеров служит наличие на поверхности клетки молекулы корцептора CD8. Т-киллеры распознают антигены при взаимодействии их Т-клеточного рецептора с антигеном, связанным с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса.

Т-хелперы и Т-киллеры образуют группу эффекторных Т-лимфоцитов, непосредственно ответственных за иммунный ответ. В то же время существует другая группа клеток, регуляторные Т-лимфоциты или *Т-супрессоры*, функция которых заключается в регулировании активности эффекторных Т-лимфоцитов. Модулируя силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию активности Т-эффекторных клеток, регуляторные Т-клетки поддерживают толерантность к собственным антигенам организма и предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний. Существуют несколько механизмов супрессии: прямой, при непосредственном контакте между клетками, и дистантный, осуществляющийся на расстоянии – например, через растворимые цитокины.

$\gamma\delta$  *Т-лимфоциты* представляют собой небольшую популяцию клеток с видоизменённым Т-клеточным рецептором. В отличие от большинства других Т-клеток, рецептор которых образован двумя  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами, Т-клеточный рецептор  $\gamma\delta$  лимфоцитов образован  $\gamma$  и  $\delta$  субъединицами. Данные субъединицы не взаимодействуют с пептидными антигенами презентированными МНС комплексами. Предполагается, что  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты участвуют в узнавании липидных антигенов.

*В-лимфоциты* образуют антитела, являющиеся изменёнными формами собственных поверхностных рецепторов. Получили название от *bursa fabricii* птиц, где впервые были обнаружены. Они играют важную роль в обеспечении гуморального иммунитета. При контакте с антигеном или стимуляции со стороны Т-клеток некоторые

В-лимфоциты трансформируются в плазматические клетки, способные к продукции антител. Другие активированные В-лимфоциты превращаются в В-клетки памяти. Помимо продукции антител, В-клетки выполняют множество других функций: выступают в качестве антигенпрезентирующих клеток, продуцируют цитокины и экзосомы.

У эмбрионов человека и других млекопитающих В-лимфоциты образуются в печени и костном мозге из стволовых клеток, а у взрослых млекопитающих – только в костном мозге. Дифференцировка В-лимфоцитов проходит в несколько этапов, каждый из которых характеризуется присутствием определённых белковых маркеров и степенью генетической перестройки генов иммуноглобулинов.

Различают следующие типы зрелых В-лимфоцитов:

- собственно В-клетки (ещё называемые «наивными» В-лимфоцитами) – неактивированные В-лимфоциты, не контактировавшие с антигеном. Они полиспецифичны и имеют слабое сродство к многим антигенам;

- В-клетки памяти – активированные В-лимфоциты, вновь перешедшие в стадию малых лимфоцитов в результате кооперации с Т-клетками. Являются долгоживущим клоном В-клеток, обеспечивают быстрый иммунный ответ и выработку большого количества иммуноглобулинов при повторном введении того же антигена. Названы клетками памяти, так как позволяют иммунной системе «помнить» антиген на протяжении многих лет после прекращения его действия. В-клетки памяти обеспечивают долговременный иммунитет;

- плазматические клетки – являются последним этапом дифференцировки активированных антигеном В-клеток. В отличие от остальных В-клеток несут мало мембранных антител и способны секретировать растворимые антитела. Являются большими клетками с эксцентрично расположенным ядром и развитым синтетическим аппаратом – шероховатый эндоплазматический ретикулум занимает почти всю цитоплазму, также развит аппарат Гольджи. Являются короткоживущими клетками (2-3 дня) и быстро элиминируются при отсутствии антигена, вызвавшего иммунный ответ.

Характерной особенностью В-клеток является наличие поверхностных мембраносвязанных антител, относящихся к классам IgM и IgD. В комплексе с другими поверхностными молекулами иммуноглобулины формируют антигенраспознающий рецептивный комплекс, ответственный за узнавание антигена. Также на поверхности

В-лимфоцитов расположены антигены МНС класса II, важные для взаимодействия с Т-клетками, также на некоторых клонах В-лимфоцитов присутствует маркер CD5, общий с Т-клетками. Рецепторы компонентов комплемента C3b (Cr1, CD35) и C3d (Cr2, CD21) играют определённую роль в активации В-клеток. Следует отметить, что маркеры CD19, CD20 и CD22 используются для идентификации В-лимфоцитов. Также на поверхности В-лимфоцитов обнаружены Fc рецепторы.

*Натуральные киллеры* – большие гранулярные лимфоциты, обладающие цитотоксичностью против опухолевых клеток и клеток, зараженных вирусами. В настоящее время НК-клетки рассматривают как отдельный класс лимфоцитов. НК выполняют цитотоксические и цитокин-продуцирующие функции. НК являются одним из важнейших компонентов клеточного врождённого иммунитета. НК формируются в результате дифференцировки лимфобластов (общих предшественников всех лимфоцитов). Они не имеют Т-клеточных рецепторов, CD3 или поверхностных иммуноглобулинов, но обычно несут на своей поверхности маркеры CD16 и CD56 у людей или NK1.1/NK1.2 у некоторых линий мышей. Около 80 % НК несут CD8.

Эти клетки были названы естественными киллерами, поскольку, по ранним представлениям, они не требовали активации для уничтожения клеток, не несущих маркеров главного комплекса гистосовместимости I типа. Основная функция НК-клеток – это уничтожение клеток организма, не несущих на своей поверхности МНС I и таким образом недоступных для действия основного компонента противовирусного иммунитета – Т-киллеров. Уменьшение количества МНС I на поверхности клетки может быть следствием трансформации клетки в раковую или действием вирусов.

Макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и натуральные киллеры обеспечивают прохождение врождённого иммунного ответа, который является неспецифичным.

*Тучные клетки* относятся к вспомогательным клеткам иммунной системы. Они представляют незрелые лейкоциты, которые мигрируют из кровяных сосудов в ткани, где подвергаются окончательной дифференцировке и созреванию. Тучные клетки находятся практически во всех тканях, но особенно их много в коже, около сосудов и в слизистой оболочке дыхательных путей и кишечника. В тканях тучные клетки активно перемещаются с помощью псевдоподий. В их цитоплазме содержится большое количество везикул (пу-

зырьков). При контакте тучной клетки с антигеном везикулы сливаются с клеточной мембраной в течение доли секунды, и их содержимое освобождается. Этот процесс играет важную роль в аллергических и воспалительных реакциях немедленного типа.

Не смотря на то, что тучные клетки способны самостоятельно уничтожать некоторые антигены путем фагоцитоза, основная их роль заключается в координации врожденных и адаптивных иммунных реакций.

*Дендритные клетки* (ДК, англ. *Dendritic cells, DC*) имеют характерную морфологию с множеством отростков, по форме напоминающих амёбу. Их относят к «профессиональным» антигенпрезентирующим клеткам. Дендритные клетки играют важнейшую роль в функционировании иммунной системы, поскольку они необходимы для активации Т-клеточного ответа. Дендритные клетки экспрессируют молекулы главного комплекса гистосовместимости I (МНС-I) и II (МНС-II), на которых представляют фрагменты антигенов Т-клеткам. Без участия антигенпрезентирующих клеток Т-клетки не могут распознать антиген.

Почти все дендритные клетки образуются в костном мозге и могут относиться как к миелоидному, так и лимфоидному ряду. Небольшое число дендритных клеток, так называемых, фолликулярных дендритных клеток имеют мезенхимальное происхождение. Существует несколько разновидностей дендритных клеток: миелоидные дендритные клетки, плазмоцитоподобные дендритные клетки, фолликулярные дендритные клетки и клетки Лангерганса.

Дендритные клетки играют важную роль в развитии и терапии аутоиммунных заболеваний, рака и других болезней. Для ряда вирусов, например, ВИЧ, дендритные клетки выступают в роли мишени. Иногда дендритные клетки сами становятся причиной рака и претерпевают злокачественное перерождение.

## Задания

1. Рассмотрите и зарисуйте рисунок 5. Изучив строение и функции клеток иммунитета, заполните таблицу 2.

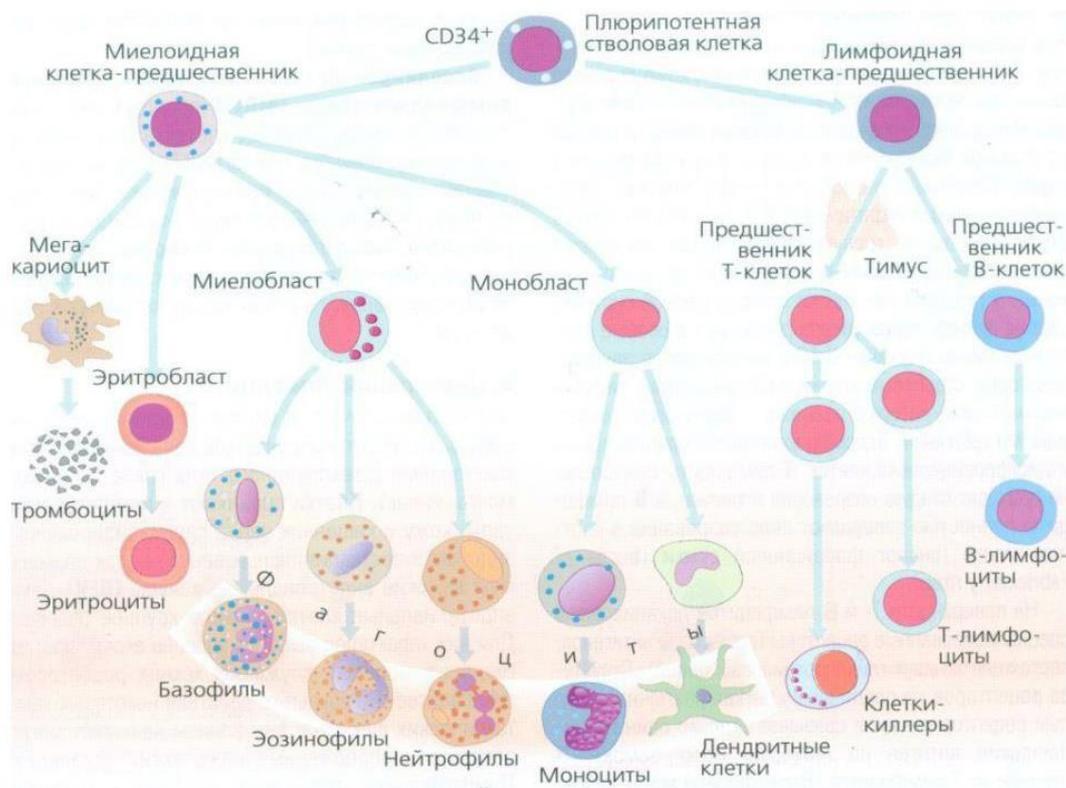


Рисунок 5 – Клетки иммунитета

Таблица 2 – Функции клеток иммунитета

Клетка иммунной системы	Особенности строения	Происхождение	Функции

2. Рассмотрите под микроскопом изготовленный мазок крови, проведите подсчет числа лейкоцитов и заполните таблицу 3.

Таблица 3 – Лейкоцитарная формула периферической крови

Клетка	Количество	% содержание		Вывод
		в норме	в мазке	

3. Используя вводные пояснения и дополнительную литературу, заполните таблицу 4.

Таблица 4 – Рецепторы (маркеры) клеток иммунной системы

Клетка иммунной системы	Рецепторы (маркеры)	Значение рецептора

4. Используя материалы лекций, дополнительную литературу и приложения 1 и 2, нарисуйте схемы дифференцировки Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, отметив рецепторы приобретаемые клетками на каждой стадии.

### Контрольные вопросы

1. Как классифицируются иммунные клетки?
2. Приведите примеры миелоидных, лимфоидных и тканевых иммунных клеток.
3. Каковы отличительные особенности клеток иммунитета?
4. Чем отличаются Т-лимфоциты и какие группы среди них можно выделить?
5. Чем отличаются В-лимфоциты и какие группы среди них можно выделить?
6. Что такое рецепторы и, каково их значение в реализации иммунного ответа?
7. Какие клетки можно отнести к антигенпрезентирующим?

### Антигены и антитела

#### Вводные пояснения

*Антигены* (от лат. *anti* – против, *genos* – род) – генетически чужеродные вещества, которые при введении во внутреннюю среду организма способны вызывать иммунный ответ в виде образования антител или иммунных Т-лимфоцитов и взаимодействовать с ними. Под чужеродностью антигенов следует понимать определенную степень химического различия между антигеном и макромолекулами организма, во внутреннюю среду которого, он попадает. То есть, вещество или объект (бактерия, вирус и т.п.) должно распознаваться иммунной системой как «не свое, чужое». При этом, чем меньше выражено генетическое родство между организмом и вводимым веществом, тем лучшим иммуногеном оно является. Поэтому основное

свойство антигенов – это *иммуногенность*, т.е. способность вызывать иммунный ответ. Способность антигена вступать в реакции взаимодействия со специфичными к нему антителами или активированными лимфоцитами, что приводит к нейтрализации этого антигена, обозначают термином *специфичность*. Таким образом, иммуногенность и специфичность являются основными свойствами антигенов.

Принято различать полноценные антигены, неполноценные антигены (гаптены) и полугаптены.

*Полноценными антигенами* называют такие, которые вызывают образование антител или сенсibilизацию лимфоцитов и способны реагировать с ними как в организме, так и в лабораторных реакциях. Свойствами полноценных антигенов обладают белки, полисахариды, высокомолекулярные нуклеиновые кислоты и комплексные соединения этих веществ.

*Неполноценные антигены*, или *гаптены*, сами по себе не способны вызывать образование антител или сенсibilизацию лимфоцитов. Это свойство появляется лишь при добавлении к ним полноценных антигенов («проводников»), а среди образующихся антител или сенсibilизированных лимфоцитов часть специфична к «проводнику», а часть – к гаптену.

*Полугаптенами* называют сравнительно простые вещества, которые при поступлении во внутреннюю среду организма могут химически соединяться с белками этого организма и придавать им свойства антигенов. К этим веществам могут принадлежать и некоторые лекарственные препараты (йод, бром, антипирин и др.).

Молекула антигена состоит из двух неравных частей. Активная (малая часть) носит название антигенной детерминанты (эпитоп) и определяет антигенную специфичность. Антигенные детерминанты расположены в тех местах молекулы антигена, которые находятся в наибольшей связи с микроокружением. В белковой молекуле, например, они могут располагаться не только на концах полипептидной цепи, но и в других ее частях. Антигенные детерминанты содержат в своем составе, по крайней мере, три аминокислоты с жесткой структурой (тирозин, триптофан, фенилаланин). Специфичность антигена связана также с порядком чередования аминокислот полипептидной цепи и комбинацией их положений по отношению друг к другу. Количество антигенных детерминант у молекулы антигена определяет его валентность. Она тем выше, чем больше относительная молекулярная масса молекулы антигена.

Остальная (неактивная) часть молекулы антигена, как полагают, играет роль носителя детерминанты и способствует проникновению антигена во внутреннюю среду организма, его пиноцитозу или фагоцитозу, клеточной реакции на проникновение антигена, образование медиаторов межклеточного взаимодействия в иммунном ответе (Т-лимфоциты имеют рецепторы к носителю, В- к антигенной детерминанте).

Организм животных реагирует на антигенное воздействие синтезом специфических белков. Эти белки синтезируются лимфоидными клетками и получили название *антител*. Все белки, имеющие аналогичное молекулярное строение, типичное для антител, теперь именуется *иммуноглобулинами*. В связи с этим понятие «иммуноглобулины» и «гаммаглобулины» не следует рассматривать как синонимы, так как не все иммуноглобулины по электрофоретической подвижности относятся к определенной гамма-глобулиновой фракции.

Иммуноглобулины представляют собой момеры и полимеры белковой молекулы, состоящей из 4-х полипептидных цепей. Мономер же состоит из 2-х идентичных легких полипептидных цепей (L-цепи), образованных из 220 аминокислот с молекулярной массой около 250000, и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей (H-цепи), состоящих из 450 аминокислот с молекулярной массой около 50000. Все 4 полипептидные цепи образуют Y-образную молекулу с помощью дисульфидных мостиков (рис.6).

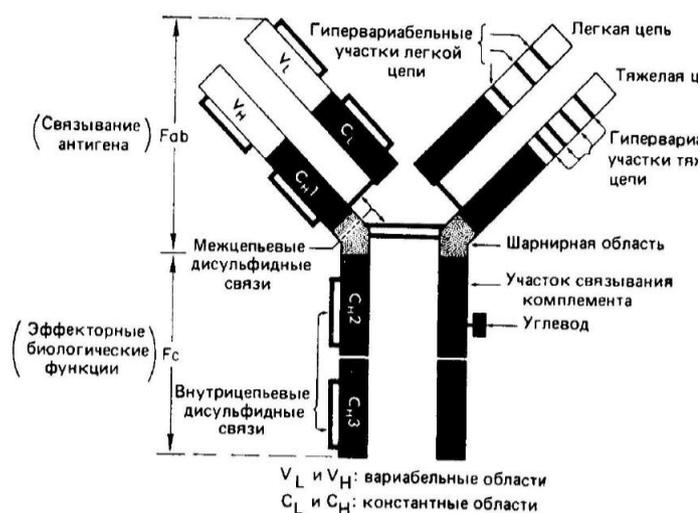


Рисунок 6 – Строение иммуноглобулина

В молекуле иммуноглобулина в легких и тяжелых цепях различают переменные (V) и константные или постоянные (C) участки.

По номенклатуре принятой Всемирной организацией здравоохранения (1964), иммуноглобулины в зависимости от структуры постоянной части тяжелых цепей молекул антитела делятся на следующие классы: IgG (гамма-цепь), IgM (мю-цепь). Кроме того, в пределах класса могут быть еще деления на подгруппы – IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> или IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub> и т.д.

Сведения о свойствах различных классов иммуноглобулинов получены в основном в результате изучения их у человека и подопытных животных. В отношении же домашних животных данные об иммуноглобулинах пока еще недостаточно полны. Однако у большинства животных имеются те же классы иммуноглобулинов, что и у человека.

*Иммуноглобулин G* относится к классическим антителам, обнаруживается в сыворотке крови всех млекопитающих и птиц, а также в их тканевой жидкости. Молекулы белка имеют относительно небольшой размер и вес (150000), и два активных центра. Иммуноглобулин участвует почти во всех реакциях, проводимых с участием антител. Он не проходит через плацентарный барьер животных.

*Иммуноглобулин H* – крупные 19 S-молекулы (мол. вес 900000), каждая из них имеет от 5 до 10 активных центров. Он отличается от других типов иммуноглобулинов по ряду свойств и является, по видимому – первым классом в эволюции антител (у акул он является единственным типом иммуноглобулинов).

*Иммуноглобулин M* локализуется в основном в сосудистом русле, в тканевой жидкости встречается в меньшем количестве. Он относится к классу иммуноглобулинов, которые первыми появляются после иммунизации и только через 2-3 дня синтезируются в другие виды иммуноглобулинов.

*Иммуноглобулин A* является основным классом иммуноглобулина, содержащихся в различных секретах организма (слеза, слюна), а также в выделениях слизистых оболочек трахеи, бронхов, желез пищеварительного тракта. Таким образом, иммуноглобулин A покрывает слизистую оболочку перечисленных органов в виде иммунологической антисептической пленки.

Устойчивость слизистой оболочки пищеварительного тракта к действию трипсина и пепсина обусловлена наличием в слюне и выделениях желез желудка и кишечника иммуноглобулина A. Кроме того, резистентность слизистой связывают с секреторным (транспортным) белком, который, соединяясь с молекулой иммуноглобулина, образу-

ет димер из двух молекул IgA.

В содержимом кишечника и фекалиях были обнаружены антитела (копроантитела), которые исследованиями последних лет были отнесены к иммуноглобулинам класса А. Они характеризуются устойчивостью к гидролизу и, по-видимому, выполняют защитную роль при кишечных инфекциях.

Иммуноглобулин А содержится в молозиве большинства животных и является основным типом молозивного иммуноглобулина.

*Иммуноглобулин Д* в обычных условиях содержится в сыворотке крови в очень низких концентрациях. В последние годы были получены данные, IgД по строению близок к молекуле IgG и чрезвычайно чувствителен к действию протеолитических ферментов. Предполагается, то молекулы иммуноглобулина Д содержат длинный шарнирный участок, более доступный действию ферментов.

*Иммуноглобулин Е* относится к классу иммуноглобулинов, который синтезируется главным образом в слизисто-дыхательного и желудочно-кишечного трактов, а также в региональных лимфатических узлах. В сыворотке же крови IgЕ содержится лишь в очень низкой концентрации. Значительная часть этого иммуноглобулина связана с тучными клетками кожи и базофилами. Предполагают, что главная функция IgЕ состоит в том, что он стимулирует выделение гистамина при аллергических явлениях.

Для оценки иммунного статуса у новорожденных животных, обусловленного получением иммуноглобулинов с молозивом, применяются различные методы. Самыми простыми и доступными, даже в полевых условиях, являются: рефрактометрический метод определения общего белка и метод определения количества иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных животных. Контроль за уровнем общего белка и Ig в крови молодняка осуществляют обычно в суточном возрасте.

Количества общего белка в сыворотке крови новорожденного молодняка в 1-5-суточном возрасте находится в пределах 5,5–7,0 г/% у телят, 7,0–7,5 г/% у ягнят и 5,3–7,2 г/% у поросят. Данный показатель косвенно указывает на наличие гуморальных факторов иммунитета в организме животного (иммуноглобулинов, комплемента, лизоцима и т.д.), так как все они имеют белковую природу. Низкое количество общего белка указывает либо на иммунодефицитное состояние новорожденного из-за недостаточного поступления гуморальных факторов от матери (малый объем

выпоенного молозива или несвоевременная его выпойка), либо на иммунодефицитное состояние материнского организма (болезнь, недостаточное и несбалансированное кормление, плохое содержание и другие причины).

Повышенный уровень общего белка может указывать на обезвоживание организма или заболевание.

Количество иммуноглобулинов в сыворотке крови должно быть 15 г/л и выше у всех новорожденных. Именно иммуноглобулины являются основным фактором защиты новорожденного организма от инфекций, передаваемым от материнского организма с молозивом. Их количество в сыворотке крови напрямую указывает на уровень колостерального иммунитета у животного.

### Задания

1. Изучив вводные пояснения, заполните таблицу 5.

*Таблица 5 – Характеристика антител*

Имуноглобулин	Характеристика	Функции

2. Определите общее количество иммуноглобулинов в сыворотке крови методом осаждения сульфитом натрия, используя следующую последовательность действий.

### Ход работы

1. В три пробирки разлить по 1.9 мл растворов сульфита натрия в концентрации: 14 %, 16 % и 18 % .

2. Добавить во все пробирки по 0.1 мл испытуемой сыворотки крови. Тщательно перемешать и выдержать 30 минут при комнатной температуре.

3. Провести учет реакции по наличию помутнения, хлопьев или осадка. Количество иммуноглобулинов в исследуемой сыворотке крови определить по таблице 6, записать в тетрадь, сравнить с нормой и сделать вывод.

*Таблица 6 – Зависимость количества иммуноглобулинов от концентрации раствора сульфита натрия*

Количество иммуноглобулинов мг/мл.	Концентрация сульфита натрия %		
	14	16	18
Оптимальный уровень (более 15 мг/мл.)	+	+	+
Пониженный уровень (от 5 до 15 мг/мл)	-	+	+
Очень низкий уровень (ниже 5 мг/мл.)	-	-	+

(+) – наличие помутнения хлопьев и осадка

(-) – отсутствие помутнения хлопьев и осадка

3. Определите общее количество иммуноглобулинов в сыворотке крови рефрактометрическим методом, используя следующую последовательность действий.

### **Ход работы**

1. Подготовить рефрактометр к работе. Для этого:

1.1 Стеклопалочкой на призму рефрактометра нанести каплю дистиллированной воды, закрыть камеру и регулировочным винтом устанавливают шкалу рефрактометра на отметку 1,3330. В верхнем окне граница света-тени должна быть на пересечении двух линий.

1.2 Воду с призмы удалить марлевой салфеткой и протереть ватой, смоченной смесью спирта с эфиром.

2. Провести исследование сыворотки:

2.1 Нанести каплю исследуемой сыворотки на призму стеклопалочкой и закрыть камеру.

2.2 Регулировочным винтом слева установить границу света-тени в прежнее положение и определить показатель рефракции по верхней, а затем по нижней шкале. Отсчет производят 2 раза и вычисляют среднее показание.

2.3 Марлевой салфеткой удалить с призмы рефрактометра сыворотку и протереть ватой смоченной спирт – эфиром .

2.4 Определить содержание белка по таблице 7. Если температура в камере во время отсчета не соответствует 20 С°, то ввести поправку 0,0001 на каждый градус. При низкой температуре поправку вычитать, при высокой – прибавить.

2.5 Содержание белка записать в тетрадь, сравнить с нормой и сделать вывод.

*Таблица 7 – Содержание белка в сыворотке крови в зависимости от показателя рефракции*

Показания рефрактометра	Белок г %	Показания рефрактометра	Белок г %	Показания рефрактометра	Белок г %
1,3431	4,16	1,3463	6,01	1,3492	7,69
1,3435	4,38	1,3464	6,07	1,3493	7,75
1,3439	4,60	1,3465	6,12	1,3495	7,87
1,3443	4,81	1,3466	6,18	1,3496	7,93
1,3445	5,03	1,3467	6,24	1,3497	7,98
1,3450	5,25	1,3468	6,30	1,3498	8,04
1,3451	5,31	1,3469	6,36	1,3499	8,10
1,3452	5,37	1,3470	6,41	1,3500	8,16
1,3453	5,43	1,3471	6,47	1,3512	8,86
1,3454	5,48	1,3472	6,53	1,3513	8,91
1,3455	5,54	1,3473	6,59	1,3515	9,03
1,3456	5,60	1,3474	6,59	1,3516	9,09
1,3457	5,66	1,3475	6,70	1,3517	9,15
1,3458	5,72	1,3476	6,76	1,3518	9,20
1,3459	5,77	1,3477	6,82	1,3520	9,32
1,3460	5,83	1,3478	6,88		
1,3461	5,89	1,3479	6,94		
1,3462	5,95	1,3480	7,00		

### Контрольные вопросы

1. Что такое антигены и, какими свойствами они характеризуются?
2. Что такое гаптены и полугаптены? Почему их называют неполноценными антигенами?
3. Какое строение имеют антитела?

4. Какие клетки иммунной системы продуцируют антитела?
5. Какие методы используются для определения содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови?
6. В чем заключается сущность этих методов исследования?

## Серологические реакции в иммунологии

### Вводные пояснения

Серологические реакции основаны на взаимодействии антигена с антителом и относятся к специфическим реакциям иммунодиагностики. Термин «серология» произошел от латинских слов *serum* – сыворотка и *logos* – наука, изучаю. Серологические реакции широко используются для диагностики различных заболеваний животных и человека и включают следующие виды реакций.

*Реакция агглютинации (РА).* Сущность РА заключается в том, что при добавлении сыворотки крови, содержащей специфические антигену антитела, в равномерной взвеси клеток происходит их склеивание, образование комочков, хлопьев, которые постепенно оседают, формируя характерный осадок – *агглютинат*. Характер агглютината зависит от антигенного строения микробной клетки или вируса (антигена). От этого зависит время формирования агглютината и его характер (мелкозернистый, крупнозернистый или крупнохлопчатый осадок).

В ветеринарной практике РА используют для диагностики бруцеллеза, сальмонеллез, колибактериоза, листериоза, вибриоза, лептоспирозов и других заболеваний. Существует несколько методов постановки РА: пробирочный (объемный), капельный (пластинчатый), кровяно-капельный, гемагглютинации (РГА), торможения гемагглютинации (РТГА), антиглобулиновый Кумбса и др.

Для определения наличия антител в сыворотке крови животного по известному антигену вначале готовят сыворотку из 5...10 мл крови. Сыворотки для РА (как и вообще при серологических исследованиях) используют свежие без гемолиза или консервированные фенолом, мертиолатом натрия или борной кислотой. Антиген для РА представляет собой взвесь в физиологическом растворе убитых или живых возбудителей заболевания. Для диагностических целей рекомендуется стандартный раствор антигена биофабричного производства. Такие препараты называют *диагностикумы*.

Для идентификации культуры, выделенной из патологического

материала, применяют стандартные сыворотки, которые называют диагностическими или агглютинирующими. Их получают на биофабриках путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (специально подготовленной взвесью живых или убитых микробов, эритроцитами и др.). Готовую сыворотку консервируют, разливают в ампулы и запаивают. Нередко диагностические сыворотки подвергают лиофильному высушиванию. Перед употреблением такие сыворотки разводят дистиллированной водой. Но для постановки реакции (и промывания пипеток) ее разводят физиологическим раствором.

*Классический способ постановки РА (пробирочный метод).* Исследуемые сыворотки разводят в чистых сухих пробирках с ровным сферическим дном. Для каждой сыворотки берут отдельную пипетку. В зависимости от инфекции производят соответствующие степени разведения сывороток (согласно инструкции). Например, для диагностики бруцеллеза сыворотки разводят 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400.

Разведения удобно производить следующим образом. В отдельной пробирке готовят основное (исходное) разведение сыворотки – 1:25, смешивая 0,1 мл испытуемой сыворотки с добавлением 2,4 мл физиологического раствора. В опытные пробирки разливают по 1 мл физиологического раствора. Затем из исходного разведения 1 мл жидкости переносят в первую опытную пробирку, смешивают с физраствором (разведение 1:50) и 1 мл переносят во вторую пробирку (1:100), из второй 1 мл – в третью и т. д. Из последней пробирки 1 мл выливают в сливную чашку, чтобы в каждой пробирке осталось по 1 мл разведенной сыворотки.

Во все пробирки добавляют по две капли стандартного антигена (концентрация 10 млрд микробных тел в 1мл), смешивают встряхиванием и выдерживают в термостате 4...6 ч при 37 °С, а затем при комнатной температуре 14...16 ч.

При постановке РА (как при каждой серологической реакции) обязательны контроли: в тех же разведениях испытывают сыворотку нормальную (от здорового животного) и позитивную (от заведомо больного животного или стандартную биофабричного производства) с тем же антигеном.

Учет РА осуществляют невооруженным глазом или с помощью агглютиноскопа, начиная с контрольных пробирок. Результат РА принято выражать количеством крестов:

++++ (#) – полное просветление жидкости; образовавшийся агглютинат имеет вид перевернутого зонтика, при встряхивании разбивается в глыбки, хлопья разной величины, жидкость остается прозрачной;

+ + +(///) – неполное просветление жидкости; агглютинат, как и в предыдущем опыте, в виде зонтика, при встряхивании разбивается на более мелкие глыбки, комочки;

++(++) – неполное просветление жидкости; агглютинат в виде зонтика, но при встряхивании разбивается на хлопья разной величины, жидкость мутная;

+ – наличие небольшого нехарактерного осадка в виде «пуговки», жидкость над ним мутная. При встряхивании такой осадок легко разбивается, увеличивая мутность;

– (минус) – вся жидкость мутная, на дне пробирки небольшой осадок антигена с ровными краями в виде «пуговки» и при встряхивании разбивается в равномерную муть.

РА в 3...4 креста учитывается как положительная степень проявления агглютинации, в два креста – сомнительная, один крест или отсутствие агглютината – выражает отрицательный результат. Реакцию оценивают не только по степени выраженности, но и по высоте титров, то есть степени разведения сывороток, давших положительный результат РА. Например, для диагностики бруцеллеза крупных животных диагностическим титром считают положительный результат РА с сывороткой в разведении не ниже 1:100, при сальмонеллезном аборте кобыл – выше 1:500.

*Капельный (пластинчатый) метод РА.* Используют для быстрого обследования поголовья животных в лаборатории и в условиях хозяйства. На чистую стеклянную пластинку наносят микропипеткой исследуемую сыворотку по 0,04; 0,02; 0,01 и 0,005 мл. К каждой сыворотке добавляют по одной капле антигена определенной концентрации, постепенно смешивают чистой стеклянной палочкой, начиная с наименьшего объема сыворотки. Условно считают, что сыворотка в первой капле соответствует разведению 1:50, во второй – 1:100, в третьей – 1:200, в четвертой – 1:400. Через 2...3 мин производят учет. Для ускорения реакции стекло слегка подогревают, держа высоко над пламенем горелки.

Положительный результат проявляется образованием в капле сыворотки комплекса антиген+антитело в виде крупинок, хлопьев и просветлением жидкости. При отрицательном результате капля сме-

си сыворотки и антигена остается равномерно мутной (отсутствие в сыворотке антител).

*Кровяно-капельный метод.* Реакцию чаще применяют для диагностики пуллороза (сальмонеллеза птиц) и бруцеллеза. На обезжиренное предметное стекло наносят каплю цельной крови (взятой у птиц из гребешка или сережки), в нее добавляют каплю соответствующего антигена и смешивают стеклянной палочкой. Для лучшей видимости феномена агглютинации биопромышленность выпускает антиген, подкрашенный гематоксилином. В положительных случаях РА (когда в крови присутствуют специфические антигену антитела) через 30...60 с в капле смеси появляются глыбки, хлопья склеенного антигена (агглютинат).

*Кольцевая проба (реакция) с молоком.* В основном используют при обследовании крупного рогатого скота на бруцеллез и при контроле сборного молока. В агглютинационные пробирки наливают по 2...3 мл свежего цельного молока и добавляют антиген (окрашенный гематоксилином) по 0,2 мл (2 капли). Пробирки встряхивают до равномерного окрашивания молока, выдерживают в водяной бане (или термостате) при 37 °С в течение 45...60 мин. При наличии в молоке антител образуется комплекс антиген+антитело, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывает наверх, образуя синее кольцо в нижнем слое сливок; столбик молока обесцвечивается. Отрицательная реакция характеризуется синей окраской всего молока в пробирке и слегка желтоватым слоем сливок.

*Реакция Кумбса.* В ряде случаев при постановке РА выпадения агглютината не происходит. Одной из причин этого является наличие в сыворотке больных животных наряду с полными антителами, так называемых, неполных или блокирующих антител, которые тормозят образование агглютината. Методика выявления таких неполных антител в организме больного разработана Кумбсом.

*Прямая реакция Кумбса* заключается в том, что к эритроцитам больного животного добавляют специфическую антиглобулиновую сыворотку (содержащую антитела против глобулинов сыворотки). Эритроциты агглютинируют. При *непрямой реакции* исследуют сыворотку больного, которую соединяют с эритроцитами здорового животного, затем, как и при прямом методе, добавляют антиглобулиновую сыворотку. Блокирующие (неполные) антитела соединяются с эритроцитами, и добавленная антиглобулиновая сыворотка,

вступая в реакцию с неполными антителами, приводит к агглютинации эритроцитов, нагруженных неполными антителами.

*Бактерийный вариант реакции Кумбса.* С исследуемыми сыворотками ставят обычную РА. После учета результата реакции в пробирки, в которых отсутствует агглютинация, добавляют по 2 мл физраствора и центрифугируют при 4000 мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 1 мл антиглобулиновой сыворотки в рабочем титре (установлен предварительно). Центрифужные пробирки встряхивают, содержимое переносят в агглютинационные пробирки, ставят их в термостат при 37...38 °С на 16...48 ч, а затем выдерживают еще 1 ч при комнатной температуре. Учет производят по характеру агглютината, как при обычном методе РА. Реакция Кумбса очень чувствительная и позволяет более точно выявлять больных.

*Реакция гемагглютинации (РГА).* Основана на том, что некоторые виды бактерий и вирусов обладают способностью адсорбироваться на поверхности эритроцитов разных видов животных (и птиц), вызывая их склеивание и образование агглютината (*прямая РГА*).

Адсорбция антигена (бактерий, вирусов) на поверхности эритроцитов не всегда проявляется образованием видимого осадка; кроме того, РГА неспецифична, потому что эритроциты одного и того же вида животного могут адсорбировать различные антигены.

Специфической является реакция *пассивной (непрямой) гемагглютинации* (РПГА). Для ее постановки предварительно готовят эритроцитарный диагностикум (эритроциты, на которых адсорбирован антиген). С этой целью стерильно получают кровь барана (или петуха), дефибринируют ее и несколько раз отмывают в фосфатно-буферном растворе (рН 7,2) при 3...5-кратном центрифугировании. Надосадочную жидкость сливают, концентрацию эритроцитов доводят до 2,5 % (1:40). К 2,5 %-й взвеси эритроцитов добавляют в равном объеме (по 1 мл или по 0,5 мл) взвесь исследуемого вида микроба в концентрации 5...10 млрд клеток в 1 мл. Эритроциты легко адсорбируют антиген полисахаридной природы. Для адсорбции антигена белковой природы эритроциты предварительно обрабатывают танином в разведении 1:20 000. Эритроциты в комплексе с добавленным антигеном оставляют для сенсibilизирования (адсорбции) на 2 ч в термостате (37 °С), затем вновь центрифугируют при оборотах 3000...4000 оборотов в минуту в течение 5 мин с фосфатно-

буферным раствором.

Полученный эритроцитарный диагностикум вносят в пробирки (или лунки в плексигласовой доске) и добавляют к нему стандартную иммунную сыворотку.

В положительных случаях выпадение эритроцитов в характерный хлопьевидный или зернистый осадок (*гемагглютинат*), распределенный по всей поверхности дна пробирки «зонтик». Значит, исследуемый вид микроба или вируса (антиген) специфичен антителам иммунной сыворотки. В отрицательных случаях несклеенные эритроциты осядут на дно в виде небольшого ровного кружочка «*пуговки*».

Для подтверждения достоверности результатов РПГА ставят *реакцию задержки (торможения) феномена гемагглютинации* (РТГА) или ее модификацию — *реакцию нейтрализации антител* (РНА).

*Методика постановки РТГА.* Сущность заключается в том, что реакцию агглютинации ставят со специфической диагностической сывороткой и испытуемым антигеном (исследуемый вид микроба используют как антиген). Эту смесь выдерживают 1...2 ч при 37 °С, затем добавляют эритроциты. Если испытуемый антиген гомологичен антителам диагностической сыворотки, они взаимодействуют друг с другом и добавленные эритроциты не агглютинируют и образуют «*пуговку*» – результат реакции положительный. Если испытуемый антиген не гомологичен антителам сыворотки или отсутствует в исследуемом материале, добавленные эритроциты адсорбируют антиген и происходит РГА, наблюдаем образование «зонтика» – результат РТГА отрицательный, вид испытуемого микроба (антигена) не установлен,

*Методика постановки реакции нейтрализации антител РНА.* Сущность заключается в том, что в равных объемах смешивают диагностическую иммунную сыворотку с различными разведениями исследуемого материала (искомого антигена), оставляют для контакта на 1...2 ч, затем добавляют эритроциты, сенсibilизированные определенным (известным) антигеном, специфическим по отношению к антителам сыворотки (эритроцитарный диагностический кум). Когда искомым антигеном вступает в реакцию с антителами сыворотки, происходит их нейтрализация и добавленные эритроциты не агглютинируют, РГА не происходит – результат РНА положительный. Если в исследуемом материале не содержится антиген, специфический к антителам используемой сыворотки, нейтрализации антител не бу-

дет; поэтому при добавлении эритроцитарного диагностикума проявляется агглютинация эритроцитов (гемагглютинация), а результат РНА будет отрицательным.

*Реакция преципитации (РП).* Основана на том, что при соединении антигена (*преципитиногена*) со специфическими антителами (*преципитинами*), находящимися в соответствующей сыворотке, образуется осадок – *преципитат*. В РП используют растворимые антигены, получаемые путем экстракции из разрушенных бактерий или извлеченные из тканей. Преципитиногены резистентны к воздействию высокой температуры (кипячению, автоклавированию) и гниению. Постановка РП может осуществляться в пробирках в жидкой среде и в чашках Петри (или на предметном стекле) в плотной агаровой среде (*диффузионная преципитация*).

*Реакция кольцепреципитации* проводится в пробирках. Для ее постановки может использоваться как культур, выделенная от больного, так и сыворотка крови больного. В первом случае к антигену нужно добавлять диагностическую сыворотку. Во втором – к сыворотке крови добавляют диагностикум с известными антигенами. Антиген осторожно добавляют (наслаивают) по стенке пробирки, не касаясь пипеткой сыворотки. Пробирку держат вертикально. Если же в пробирку сначала внести антиген, то сыворотку нужно подслаивать под антиген. Для того чтобы предотвратить смешение компонентов, пипетку с сывороткой опускают на дно пробирки и осторожно выпускают сыворотку в том же объеме, что и антиген (сыворотка имеет большую плотность). В том и другом случае при положительном результате на границе двух жидкостей почти сразу или в течение 1...2 мин образуется резко ограниченное беловатое кольцо или диск *преципитат*.

*Реакция диффузионной преципитации.* Осуществляют путем наслаивания антигена на поверхность агара, содержащего специфическую сыворотку, или путем внесения сыворотки в специальные лунки в агаре, содержащем антиген. На месте встречи специфических антигенов с антителами выпадает сероватый преципитат, образующий кольцо. Если кольцо не образуется реакция считается отрицательной.

С помощью реакции диффузионной преципитации можно не только обнаруживать антитела в сыворотке крови, но и определять их титр по диаметру кольца преципитата.

*Реакция флоккуляции.* Используют для выявления токсинов и

определения активности антитоксических сывороток. В пробирки, содержащие по 10 мл определенного токсина, добавляют убывающие количества специфической токсину антитоксической сыворотки (1,0; 0,9; 0,8... 0,3 и т.д.), полученной от гипер-иммунизированного животного (например, лошади). Пробирки встряхивают, оставляют при комнатной температуре, а через некоторое время в них наблюдают опалесценцию, переходящую в четко выраженное помутнение, затем образуются хлопья и выпадает осадок. Это *инициальная флокуляция*, появляющаяся первоначально в отдельных пробирках, а затем и в соседних с ними, служит показателем эквивалентности антигена (токсина) и антитела (антитоксина), при котором происходит полное связывание антигена и антитела (токсина и антитоксина), полная нейтрализация токсина. В пробирках, где нет полного насыщения, флокуляция наступает позднее.

*Реакция нейтрализации (РН).* В пробирки с равным количеством антигена добавляют равный объем специфической гипериммунной сыворотки (может использоваться несколько разных сывороток или разные концентрации одного вида сыворотки). Пробирки помещают в термостат на 1...2 ч. Затем раствор из каждой пробирки вводят лабораторным животным (не менее двух животных на каждую пробу) или в другую чувствительную биологическую систему, например культуру клеток. Животные, которым ввели смесь, где произошла нейтрализация токсина или антигена, остаются живыми, не заболевают. Соответственно в культуре клеток не наблюдаются цитопатические эффекты (гибель, изменение морфологии и т.п.). В противном случае результат реакции будет отрицательным. Наименьшее количество сыворотки, нейтрализовавшее токсин или антиген, принимается за единицу активности сыворотки (АЕ).

*Реакция связывания комплемента (РСК).* В основе реакции лежат два явления – бактериолизис и гемолиз. В их проявлении участвует комплемент. Поэтому в РСК применяют две системы компонентов: 1) обеспечивает феномен бактериолизиса и используется для диагностических целей; 2) гемолитическая, индикаторная, вспомогательная; позволяет установить, связался или не связался комплемент в первой системе. Ранее в качестве антигена использовали взвесь бактерий, поэтому первая система была названа бактериолитической (в положительных случаях происходил лизис бактерий).

Постановку РСК осуществляют в два этапа. На первом этапе готовят бактериолитическую систему: в пробирках смешивают по 0,5 мл

исследуемой сыворотки с антигеном, добавляют комплемент в строго определенной дозе (титре). Смесь антиген + сыворотка + комплемент (бактериолитическая система) выдерживают в водяной бане (или термостате) 20...40 мин при 37...38 °С. Результат взаимодействия компонентов в пробирке невидим, жидкость остается прозрачной и бесцветной. Чтобы определить, связался ли комплемент в бактериолитической системе, осуществляют второй этап реакции: в пробирки добавляют компоненты гемолитической системы – отмытые эритроциты барана и инактивированную гемолитическую сыворотку. Все компоненты встряхивают для перемешивания в пробирке, помещают в водяную баню при 37...38 °С на 20...40 мин.

Если сыворотка получена от больного животного, то в ней содержатся антитела, которые соединяются со специфическим антигеном. С этим комплексом (антиген+антитело) связывается комплемент – гемолиз не происходит, результат положительный.

В сыворотке от здорового животного антитела отсутствуют: комплекс антиген+антитело не образуется, комплемент в бактериологической системе не связывается. При добавлении эритроцитов и гемолизина (это между собой антиген и антитело) комплемент реагирует с этим комплексом – произойдет гемолиз, результат отрицательный.

Для подтверждения результата пробирки оставляют при комнатной температуре на 15...20 ч. При положительной реакции эритроциты осядут на дно пробирки, надосадочная жидкость будет прозрачной. Если в исследуемой сыворотке нет специфических антител к используемому антигену и результат отрицательный, то происходит гемолиз эритроцитов – осадок не образуется, жидкость в пробирке лаково-красного цвета.

РСК. используют: 1) для обнаружения в сыворотке больного животного специфических антител (при диагностике бруцеллеза, перипневмонии, сапа, лептоспироза, трипанозомоза и др.); 2) для выявления в исследуемом материале специфического антигена (бактериального или вирусного) при наличии специфической иммунной сыворотки.

Для постановки РСК необходимо иметь: пробы сывороток, поступившие для исследования; две сыворотки, заведомо позитивные (стандартные, обеспечивающие положительный результат), и две нормальные сыворотки. Все сыворотки в разведении 1:10 инактивируют при 56...58 °С 30 мин; антиген в разведении согласно титру;

комплемент, разведенный в соответствии с установленным титром при титровании в бактериолитической системе; гемолизин в рабочем титре; эритроциты барана (1 : 40); физиологический раствор, градуированные пипетки, пробирки, штативы, водяную баню на 37...38 °С.

*Метод флуоресцирующих антител (МФА) или Реакция иммунофлуоресценции (РИФ).* Возможности данного метода обусловлены специфичностью первой фазы серологических реакций с высокой чувствительностью люминесцентного анализа.

Один из компонентов иммунной реакции, как правило, антитело метится (конъюгируется) флуоресцирующим красителем. Чаще всего для этого используют флуоресцеинизотиоционаты (ФИТЦ), дающие зеленое свечение в ультрафиолетовом свете, и тетраметилродаминизотиоционат (ТРИТЦ) – оранжево-красное свечение. Антитела, которые метят флуорохромом, должны обладать физико-химической гомогенностью. Наиболее подходящими для мечения являются моноклональные антитела, обладающие сродством к строго определенным рецепторам антигена. Вторым компонентом выступает антиген (искомый или известный). Для РИФ могут использоваться антигены, локализованные в клетке или на клетке, срезах тканей.

*Варианты постановки РИФ:*

1. *Прямая РИФ.* Для каждого изучаемого антигена используется гомологичная иммунофлуоресцентная сыворотка. Компоненты реакции соединяют и после инкубации проверяют на свечение в ультрафиолетовом свете. Если оно присутствует, то реакции считается положительной поскольку произошло соединение антигена с антителом (рисунок 11);

2. *Непрямая РИФ (РНИФ)* основана на использовании двух различных антисывороток. Вначале применяют немеченые антитела к искомому антигену (или искомые антитела в сыворотке к известному антигену). Затем образовавшийся комплекс АГ+АТ обрабатывают антилюминесцентной сывороткой, содержащей меченые флуорохромом антитела к иммуноглобулинам того вида животных, чья сыворотка использовалась на первом этапе реакции (рисунок 12);

3. *Антикомплементарный метод РИФ (РИФСК)* основан на способности комплемента (сыворотки морских свинок) фиксироваться на иммунном комплексе. В этом варианте используют люминесцентные сыворотки против глобулинов (комплемента) морской свинки

4. *РГИФ (реакция гашения иммунофлуоресценции).* Использует-

ся для выявления титра антител в исследуемой сыворотке, при наличии известного клеточного антигена и специфической к нему люминесцентной сыворотки. На первом этапе на известный антиген наносят исследуемую сыворотку, и если в ней есть соответствующие антигену антитела, они занимают его эпитопы. При добавлении на втором этапе люминесцентной сыворотки к данным антигенам, присоединение люминесцентных антител к эпитопам происходить не будет. Свечения не наблюдается.

Для оценки результатов учитывают яркость, цвет, локализацию и структуру свечения. Интенсивность свечения оценивают по четырехкрестовой системе: + + + + – очень яркая флуоресценция по периферии микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; + + + – яркая флуоресценция периферии клетки; + + – слабое свечение периферии клетки; + – нет контрастного свечения периферии тела микробной клетки. Отсутствие специфического свечения обозначают «—» (видны тени микроорганизмов). При диагностике различных возбудителей положительным результатом чаще всего считают специфическое свечение не ниже чем на четыре или на три креста.

*Иммуноферментный анализ (ИФА).* Предназначен для выявления и идентификации антигенов и антител к ним. Различают две разновидности иммуноферментного анализа: гомогенный и гетерогенный.

*Гетерогенный метод* (иммуносорбентный ELISA-тест) и РЭМА – реакция энзиммеченых антител (или антигенов), адсорбированных на поверхности водонерастворимых полимерных материалов. При *гомогенном иммуноферментном методе* не используется твердая фаза; он предназначен в основном для определения низкомолекулярных антигенов (гормонов, лекарственных препаратов)..

*Определение антигена иммуноферментным методом.* Перед постановкой реакции лиофилизированные компоненты растворяют в объеме, указанном на этикетке, 0,01 М раствором фосфатного буфера или дистиллированной водой и доводят до объема рабочих разведений. Объем компонентов, вносимых поэтапно в лунки планшета, равен между собой и составляет 0,1 мл. Этапы постановки реакции:

1. Сенсibilизация планшета. В лунки планшета вносят специфические антитела (иммуноглобулины) в рабочем разведении, указанном на этикетке. Планшет с антителами инкубируют в термостате 3 ч при 37 °С или 18 ч при 4 °С. По окончании инкуба-

ции планшеты промывают раствором фосфатного буфера с твином (ФБТ) 3...4 раза, предварительно встряхнув содержимое лунок. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.

2. Внесение антигенов. В лунки планшета, сенсibilизированные специфическими антителами, вносят контрольные положительный и отрицательный антигены и исследуемую пробу в разведениях от 1:10 до 1:1280 и инкубируют в термостате 1 ч при 37 °С. По истечении срока инкубации проводят трехкратную отмывку лунок планшета от несвязавшихся с антителом антигенов и подсушивают на фильтровальной бумаге.

3. Внесение пероксидазного антивидового конъюгата в разведение с целью выявления комплекса антиген + антитело. Залитые планшеты помещают на 1 ч в термостат при 37 °С. Затем лунки трехкратно отмывают раствором ФБТ и подсушивают.

4. Внесение субстратной смеси. Для проявления реакции в лунки планшета вносят раствор субстрата (индикатора пероксидазы) – ортофенилдиамина, к раствору которого добавляют 3%-й раствор пероксида водорода для выявления комплекса антиген + антитело + конъюгат. Планшеты закрывают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 15...30 мин.

5. Учет реакции проводят визуально или спектрофотометрически.

При визуальной оценке реакцию учитывают по числу крестов:

++++ – интенсивное окрашивание;

+++ – оранжевое окрашивание;

++ – бледно-оранжевое окрашивание;

+ – желтое окрашивание.

Пробу считают положительной при оценке в два креста и более. За титр антигена принимают наивысшее разведение, при котором в реакции со специфическим антителом наблюдается бледно-оранжевое окрашивание (++) , значительно превосходящее по интенсивности окрашивание контрольных лунок планшета.

При спектрофотометрическом учете результатов реакции производят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном. Реакцию считают положительной, если коэффициент специфично-

сти не ниже 2,1, и отрицательной, если ниже 2,1.

Техника постановки иммуноферментного анализа для обнаружения (или титрования) антител выполняется так же, как при обнаружении и идентификации микробного антигена, с той разницей, что материалом служит исследуемая сыворотка крови.

### Задания

1. Используя вводные пояснения и дополнительную информацию, заполните таблицу 8.

*Таблица 8 – Серологические реакции*

Название реакции	Суть реакции	Компоненты	Положительный результат	Разновидности

2. Самостоятельно проведите и составьте схемы реакций агглютинации и преципитации, используя следующую методику.

### Ход работы

1. Постановка реакции капельной пластинчатой агглютинации: Возьмите 4 предметных стекла, предварительно высушив их, пронумеруйте и нанесите на каждое стекло 0,04; 0,02; 0,01 и 0,005 мл исследуемой сыворотки крови. Затем к каждой сыворотке добавляют по одной капле раствора антигена. Постепенно смешайте капли антигена с сывороткой, используя каждый раз чистую стеклянную палочку. Условно считают, что сыворотка в первой капле соответствует разведению 1:50, во второй – 1:100, в третьей – 1:200, в четвертой – 1:400. Через 2...3 мин произведите учет результата. Для ускорения реакции стекло можно слегка подогреть, держа высоко над пламенем горелки. Заполните таблицу 9.

*Таблица 9 – Учет результатов реакции агглютинации (РА)*

Разведение сыворотки	Наблюдаемый результат	Вывод

2. Постановка реакции кольце преципитации: В пробирку поместите 0,5 мл исследуемой сыворотки. Затем осторожно добавляют (наслаивают) 0,5 мл антигена по стенке пробирки, не касаясь пипеткой сыворотки. Пробирку следует держать прямо. Оставить пробирку в штативе на 1–3 минуты, после чего провести учет результата реакции. Схематично изобразите полученный результат, используя рисунок 7, и сделайте вывод.

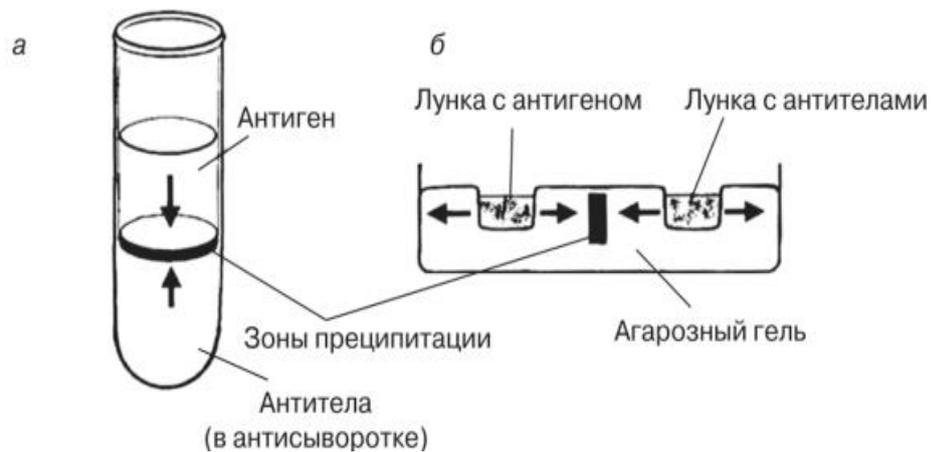
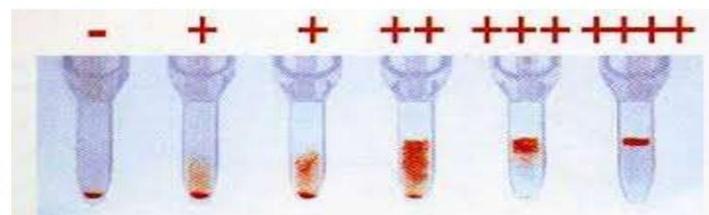


Рисунок 7 – Схема реакции преципитации: а) в пробирке; б) в геле

3. Нарисуйте схему реакции гемагглютинации, используя рисунок 8.



Результаты смешивания иммунной сыворотки (Аг) с эритроцитами (Аг)

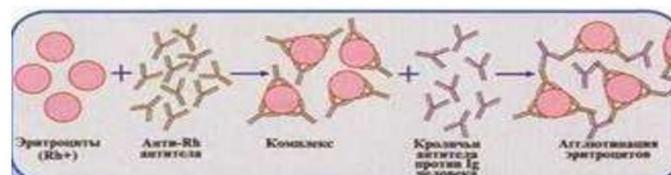


Рисунок 8 – Схема реакции гемагглютинации

4. Самостоятельно выполните тестовое задание:

1. К наиболее широко применяемым методам серологических исследований относятся:

а) реакции диффузной преципитации в геле;

- б) реакция преципитации;
- в) иммуноферментный метод;
- г) реакция пассивной гемагглютинации;
- д) реакция агглютинации;
- е) реакция связывания комплемента.

2. Реакцией непрямой (пассивной) гемагглютинации называется:

- а) специфическое склеивание и осаждение корпускулярных антигенов под действием антител в присутствии электролита;
- б) осаждение антигена из раствора под действием антител в присутствии электролита;
- в) реакция с использованием эритроцитарных диагностикумов.

3. Перечислите положения, справедливые для иммуносерологической диагностики инфекционных заболеваний:

- а) анализ сыворотки крови;
- б) ретроспективность;
- в) необходимость выделения микробных культур;
- г) абсолютная чувствительность и специфичность;
- д) обязательное использование методов иммунохимического анализа.

4. Латекс-агглютинацией называют реакцию, в которой:

- а) в качестве носителя Аг или Ат используются частицы латекса;
- б) в качестве носителя Аг или Ат используются эритроциты;
- в) специфически связываются корпускулярные антигены под действием антител в присутствии электролита;
- г) происходит лизис эритроцитов.

5. В непрямом конкурентном формате ИФА используются:

- а) иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом;
- б) меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель;
- в) препарат с антигеном и известную, предположительно соответствующую ему, люминесцирующую сыворотку.

6. Укажите фазы серологической реакции:

- а) специфическая;
- б) иммунологическая;
- в) неспецифическая;
- г) неиммунологическая.

7. Реакция нейтрализации основана на:

- а) способности специфически склеивать и осаждать корпускулярных антигенов под действием антител в присутствии электролита;
- б) способности антител иммунной сыворотки нейтрализовать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов;
- в) осаждении антигена из раствора под действием антител в присутствии электролита.

8. Укажите компоненты, используемые в иммуносеродиагностике инфекционных заболеваний:

- а) культуральные свойства бактерий;
- б) фрагменты геномных молекул;
- в) антигены;
- г) антитела;
- д) цитокины;

9. Реакция торможения гемагглютинации, вызываемой вирусами, используется для:

- а) выявления вируса в курином эмбрионе без определения вида;
- б) выявления вируса в культуре клеток без определения вида;
- в) идентификации вируса;
- г) определение цитопатогенного действия.

10. Для серодиагностики инфекционного заболевания в качестве исследуемого материала от больного берут:

- а) выделенную чистую культуру;
- б) сыворотку крови ;
- в) дефибрированную кровь;
- г) материал из пораженной ткани

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое серологические реакции и для чего их используют?
2. Чем отличаются диагностические сыворотки от диагностикумов?
3. В чем суть реакции агглютинации?
4. Какие существуют разновидности реакций агглютинации и гемагглютинации?
5. Чем характеризуется реакция связывания комплемента?
6. Какие серологические реакции можно использовать для экспресс-диагностики заболеваний?
7. В чем преимущества и недостатки иммуноферментного анализа?

# Оценка гуморального иммунитета

## Вводные пояснения

К гуморальным факторам иммунной системы относятся находящиеся во внеклеточных жидких средах организма (плазма крови, лимфа, межклеточная жидкость) вещества, способствующие обезвреживанию чужеродных тел, а также влияющие на активность иммунных реакций.

К древнейшим химическим участникам неспецифических реакций относятся *опсонины*. Эти вещества после оседания на поверхности подлежащих уничтожению частиц, активируют фагоциты, повреждают мембраны бактерий и делают их менее устойчивыми к разрушению.

Благодаря опсонизации обезвреживаются даже те клетки, которые в отсутствие опсопинов не фагоцитируются клетками иммунной системы.

Важнейшим гуморальным фактором первой линии защиты организма высокоразвитого животного от биологической агрессии является *система комплемента*. У позвоночных животных она представлена несколькими десятками сложных глобулинов (преимущественно синтезируются печенью и макрофагами), в плазме крови, в других внеклеточных жидких средах организма и на поверхности некоторых клеток.

К факторам антимикробного действия относятся следующие вещества:

*Лизоцим* (мурамидаза) – муколитический фермент, секретиремый в основном макрофагами, а также выделяющийся при разрушении гранулоцитов (до их разрушения лизоцим оказывает внутриклеточное действие на фагоцитированные структуры). Лизоцим разрушает погибшие собственные клетки и, преимущественно грамположительные, бактерии. Он гидролизует муреин, являющийся важным компонентом всех бактериальных стенок. Однако на грамотрицательные бактерии лизоцим действует только после активации системы комплемента в присутствии антител. Дело в том, что у этих патогенов муреин закрыт дополнительной оболочкой. На ней, в местах связывания антител, комплемент образует отверстия, через которые лизоцим проникает к муреину и разрушает его.

Наряду с плазмой и межклеточными жидкостями, лизоцим присутствует во внешних секретах (например, в пищеварительных

соках, слезной жидкости, сперме, моче, молозиве и молоке). Благодаря этому, он повышает бактерицидность покровов тела, а также облегчает удаление с них патогенных факторов и собственных погибших клеток.

*Лактоферрин* – белок (синтезируется гранулоцитами), конкурирующий с бактериями за необходимое для их размножения железо и усиливающий эффекты антител. Его бактериостатическая роль особенно важна в период получения новорожденным с молоком высоких концентраций IgA.

*Лактопероксидаза* – фермент, который в комплексе с тиоцианатом и перекисью водорода проявляет бактерицидное действие. Он обнаружен в слюне животных уже в первые месяцы жизни, активен при pH от 3,0 до 7,0 и устойчив к действию пищеварительных ферментов.

*Сиалин* нейтрализует преимущественно кислые продукты жизнедеятельности микрофлоры в полостях (например, в ротовой полости препятствуют образованию зубных бляшек и благодаря этому обладает сильным противокариозным действием).

В крови животных присутствуют также *естественные или природные антитела*. Они, как правило, являются низкоаффинными и полиспецифичными иммуноглобулинами, способными связывать наиболее часто встречающиеся антигены (например, полисахариды бактериальных оболочек) и вызывать при этом выработку высокоспецифичных антител, о которых упоминалось в предыдущих темах. Однако их выработка, как и образования белков воспаления, является примером взаимодействия клеточных и гуморальных факторов неспецифического иммунитета.

Клеточные и гуморальные факторы неспецифической защиты всегда участвуют в реакциях воспаления, а антитела и лимфоциты – лишь при наличии в очаге повреждения чужеродных антигенов. Центральное место отводится гуморальным факторам, которые расширяют капилляры, а также увеличивают их проницаемость для других биологически активных веществ и клеток, способствуют миграции лейкоцитов в места воспаления, а также расщеплению фибрина (это необходимо для успешного заживления ран) и т.п. К ним относятся гистамин, гепарин, простагландины, цитокины и др. вещества.

## Задания

1. Определить бактерицидную активность сыворотки крови чашечным методом.

Принцип метода: Показатель бактерицидной активности сыворотки крови более полно отражает состояние естественной резистентности организма. Он указывает на состояние всего комплекса факторов врожденного иммунитета, и клеточных и гуморальных. Высокий титр бактерицидной активности говорит о наличии контакта с патогеном, если животное больное, или о хорошей естественной резистентности организма, если животное не болеет. Низкий титр, соответственно, о низкой резистентности организма.

Нормативы для крупного рогатого скота составляют 1:8, 1:16.

## Ход работы

1. Суточную бульонную культуру (или смыв) *E. Coli* развести 0,5 % физраствором 1:100.

2. Приготовить двукратные разведения испытуемой сыворотки 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 по 1 мл:

- взять 6 пробирок пронумеровать и в каждую внести по 1 мл стерильного физиологического раствора;

- в первую пробирку внести 1 мл исследуемой сыворотки крови тщательно перемешать и 1 мл перенести во вторую, снова перемешать и так последовательно переносить до 6 пробирки.

3. В каждое разведение сыворотки внести по капле культуры, тщательно перемешать.

4. В чашку с МПА, расчерченную на 6 секторов по соответствующим разведениям сыворотки, внести по капле смеси каждого разведения петлей, размазать в виде бляшка диаметром 2-2,5 см. После просыхания бляшек поставить в термостат при 37 °С.

5. Учет проводят на следующем занятии (не менее чем через 24 ч) по наличию роста *E. Coli* в секторах. Определяют титр бактерицидной активности – наибольшее разведение, исследуемой сыворотки крови, подавляющее рост *E. Coli* на питательной среде.

6. Сделайте вывод.

2. Определите лизоцимную активности сыворотки крови.

Принцип метода: Производное фагоцитов и др. клеток вещество – лизоцим, содержащийся в крови и слизистых секретах, расщепляет

пептидогликаны клеточной стенки *Micrococcus lysodecticus* и других микробов с последующим лизисом клеток. В результате в жидких смесях сыворотка + культура тест-микроба снижается оптическая плотность.

Лизоцимная активность сыворотки должна быть в пределах нормы. Нормативы для крупного рогатого скота – 25-33 %.

Превышение показателя говорит о повышении активности врожденного иммунитета, что может быть связано с контактом организма и патогена (если животное болеет). Либо, если животное здорово внешне, то о скрытом инфекционном процессе (латенции или персистенции).

Если организм животного подвергался иммуностимуляции каким-либо препаратом – это свидетельствует о благоприятном влиянии данного препарата на факторы клеточные врожденного иммунитета, так как именно клетки вырабатывают лизоцим.

Снижение показателя ниже нормы свидетельствует о низкой активности врожденного иммунитета животного – иммунодефицитом состояния.

### **Ход работы**

1. Из культуры тест-микроба *Micrococcus lysodecticus* приготовить 1млрд взвесей на 0,5 % растворе NaCl (физиологический раствор) по стандарту мутности 10 ед.

2. Внести в 2 стерильные пробирки по 4,9 мл взвеси культуры тест-микроба.

3. В одну добавить 0,1 мл испытуемой сыворотки и тщательно перемешать. В другую, для контроля, к взвеси тест-микроба(4,9 мл) добавить 0,1 мл 0,5 %-го раствора NaCl вместо сыворотки.

4. Тотчас определить оптическую плотность смесей на спектрофотометре при фильтре 492. Записать оптическую плотность образца сыворотки (ОПо1) и контроля (ОПк1)

5. Смеси инкубировать 1 час при 37 °С и вновь определить оптическую плотность на спектрофотометре при фильтре 492.

6. Сравнить показатель оптической плотности контроля до (ОПк1) и после инкубации (ОПк2). Если она возрастает, то реакцию считают достоверной.

7. Рассчитать лизоцимную активность сыворотки крови по формуле 2:

$$x = \frac{O_{Po1} - O_{Po2}}{O_{Po1}} \times 100, \quad (2)$$

где X - % лизоцимной активности;

O<sub>Po1</sub> – оптическая плотность образца сыворотки до инкубации;

O<sub>Po2</sub> - оптическая плотность образца сыворотки после инкубации.

8. Результат сравнить с нормой и сделать вывод.

### **Контрольные вопросы**

1. Назовите бактерицидные вещества сыворотки крови и, какова их роль?
2. Что такое лизоцимная активность сыворотки крови и как ее определить?
3. О чем говорит низкая лизоцимная активность сыворотки крови?
4. Из чего формируется бактерицидность активность сыворотки крови?
5. Какие вещества, кроме лизоцима, относятся к гуморальным факторам иммунитета?

## **Неспецифические факторы иммунитета**

### **Вводные пояснения**

Медиаторы межклеточных взаимодействий, именуемые цитокинами, определяют как реакции врожденного и приобретенного иммунитета, так и ряд других жизненно необходимых функций организма, значение которых выходит за рамки иммунологии. Цитокинами называют гормоноподобные медиаторы, продуцируемые разными клетками организма и способные повлиять на функции других или этих же групп клеток. Цитокины – пептиды или гликопротеиды, действующие как аутокринные, паракринные или межсистемные сигналы. Цитокины формируются как активированными или поврежденными клетками, так и клетками без дополнительной стимуляции. Регуляторами продукции цитокинов могут быть другие цитокины, гормоны, простагландины, антигены и многие другие агенты, воздействующие на клетку.

Цитокины составляют обширный класс медиаторов различного

происхождения, обладающих разными свойствами. Их классификация носит условный характер, так как многие из них обладают одновременно несколькими свойствами и могут быть отнесены к разным группам. Цитокины объединены в группы в зависимости от их происхождения (лимфокины, монокины), от характера эффекта (провоспалительные, противовоспалительные). Цитокины, регулирующие взаимодействия лейкоцитов между собой и другими клетками, называют *интерлейкинами* (ИЛ). Большинство цитокинов именуется по действию, которое было впервые обнаружено. Однако дальнейшие исследования раскрыли новые свойства многих из них. Так, например, «фактор некроза опухоли» превратился в группу цитокинов, обладающих способностью не только индуцировать гибель (апоптоз) опухолевых клеток, но и стимулировать активность нейтрофильных лейкоцитов, макрофагов и других клеток иммунной системы.

*Группа интерлейкинов* включает 17 цитокинов, большинство из которых играет ключевую роль в развитии специфического иммунного ответа.

Продуцируемый макрофагами и моноцитами ИЛ-1 обуславливает пролиферацию лимфоцитов при индукции иммунного ответа, а также активирует Т-лимфоциты, увеличивает продукцию антител. ИЛ-1 действует на нейтрофилы, способствуя хемотаксису, активации метаболизма, выходу из клеток лизоцима и лактоферрина. Этот цитокин вызывает лихорадку за счет воздействия на гипоталамический центр терморегуляции.

ИЛ-2 продуцируется Т-лимфоцитами (в основном Тх1), активированными антигеном, собственным ИЛ-2, другими интерлейкинами: ИЛ-1, ИЛ-6, интерфероном, фактором некроза опухоли (ФНО). Без ИЛ-2 позитивный иммунный ответ на антиген не возникает, стимулированный антигеном лимфоцит гибнет, что может привести к развитию толерантности к данному антигену. Интерлейкины ИЛ-4 и ИЛ-10 подавляют продукцию ИЛ-2. Это способствует развитию эффекторов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), формированию киллеров из CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, усилению действия ЕК. Все это стимулирует противоопухолевый иммунитет и позволяет рекомендовать рекомбинантный ИЛ-2 для лечения онкологических больных.

ИЛ-3 стимулирует пролиферацию стволовых и ранних предшественников гемопоэтических клеток. Он перспективен как радиопротекторное средство.

ИЛ-4, или фактор роста В-лимфоцитов, стимулирует антитело-

образова-ние, продукцию IgE, активирует Тх2-лимфоциты, способствует формированию ИЛ-5 и ИЛ-10, подавляющих активность Тх1 и, следовательно, формирование клеточных реакций иммунитета.

ИЛ-5 близок по способности стимулировать гуморальный ответ к ИЛ-4. Он получил название «Т-замещающий фактор», так как способствует продукции антител без участия Тх.

ИЛ-5, как и ИЛ-4, способствует развитию аллергических реакций. ИЛ-4 усиливает продукцию IgE, а ИЛ-5 стимулирует предшественников эозинофилов и базофилы, клетки, реализующие эти реакции.

ИЛ-6 и ИЛ-7 активируют В-клетки и гуморальные формы иммунного ответа. ИЛ-6 используется как фактор роста гибридом в биотехнологии. Он также способствует дифференцировке Т-клеток в цитотоксические, активирует ЕК и кератиноциты.

ИЛ-8 – мощный провоспалительный фактор, индуктор острых и хронических воспалительных реакций.

ИЛ-9 – регулятор пролиферации Т-лимфоцитов. В этом ему подобны ИЛ-15 и ИЛ-16. ИЛ-10 относится к противовоспалительным и иммуноподавляющим цитокинам. Он подавляет продукцию провоспалительных интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5,  $\gamma$ ИФ и других, а также экспрессию МНС на антигенпредставляющих клетках и тем самым препятствует индукции иммунного ответа.

ИЛ-11 относится к стимуляторам гемо- и лимфопоэза через активацию стволовых клеток.

ИЛ-12 считается функциональным антагонистом ИЛ-10, он активирует Тх1 и ЕК.

ИЛ-13 по ряду эффектов близок к ИЛ-4, но не активирует Т-лимфоциты. Его мишенями являются моноциты, макрофаги, В-клетки и ЕК.

ИЛ-14 обеспечивает длительную пролиферацию активированных В-лимфоцитов, способствует формированию В-клеток памяти.

ИЛ-15 сходен по действию с ИЛ-2. Фактор роста Т-лимфоцитов и ЕК ИЛ-16 секретируется СВ8+-лимфоцитами. Подавляет репликацию вирусов, в частности вируса иммунодефицита человека.

ИЛ-17 способствует продукции ИЛ-6, ИЛ-8 и молекул адгезии ICAM.

*Интерфероны (ИФН)* были открыты в 1957 г. А. Айзексом и Ж. Линдеманоном при изучении интерференции вирусов (от лат. *inter* – между, *ferens* – несущий). Интерференция – это явление, когда ткани,

инфицированные одним вирусом, становятся устойчивыми к заражению другим вирусом. Было установлено, что такая резистентность связана с продукцией зараженными клетками особого белка, который и был назван интерфероном.

В настоящее время интерфероны хорошо изучены. Они представляют собой семейство гликопротеидов с молекулярной массой от 15 000 до 70 000. В зависимости от источника получения эти белки делят на интерфероны I и II типов.

I тип включает ИФН  $\alpha$  и  $\beta$ , которые продуцируются инфицированным вирусом клетками: ИФН- $\alpha$  – лейкоцитами, ИФН- $\beta$  – фибробластами. В последние годы описаны три новых интерферона: ИФН- $\tau/\epsilon$  (трофобластный ИФН), ИФН- $\lambda$  и ИФН-К. В противовирусной защите участвуют ИФН- $\alpha$  и  $\beta$ .

Механизм действия ИФН- $\alpha$  и  $\beta$  не связан с прямым влиянием на вирусы. Он обусловлен активацией в клетке ряда генов, блокирующих репродукцию вируса. Ключевое звено - индукция синтеза протеинкиназы R, которая нарушает трансляцию вирусной мРНК и запускает апоптоз зараженных клеток через Bcl-2 и каспазазависимые реакции. Другой механизм – это активация латентной РНК-эндонуклеазы, которая вызывает деструкцию вирусной нуклеиновой кислоты.

II тип включает интерферон  $\gamma$ . Он продуцируется Т-лимфоцитами и естественными киллерами после антигенной стимуляции.

Интерферон синтезируется клетками постоянно, его концентрация в крови в норме мало меняется. Однако продукция ИФ усиливается при заражении клеток вирусами или действии его индукторов-интерфероногенов (вирусной РНК, ДНК, сложных полимеров).

В настоящее время интерфероны (как лейкоцитарные, так и рекомбинантные) и интерфероногены широко применяются в клинической практике для профилактики и лечения острых вирусных инфекций.

*Цитотоксины.* Такое название получили цитокины группы *факторов некроза опухолей (ФНО)*, который был впервые обнаружен как компонент сыворотки крови животных, стимулированных бактериальным токсином, вызывающий некротические процессы в опухолевой ткани. ФНО служит медиатором ответа организма на микробную инвазию. Эндотоксины (липиполисахариды) микробов стимулируют клетки-продуценты к образованию ФНО, который, в свою очередь,

обеспечивает хемотаксис фагоцитов в инфицированную ткань и усиливает фагоцитоз возбудителей. В настоящее время известно, что ФНО составляют по крайней мере две группы (альфа и бета) медиаторов, продуцируемых активированными макрофагами, естественными киллерами, а также лимфоцитами, нейтрофилами и тучными клетками. ФНО- $\alpha$  вызывает некроз опухолей и нарушает обменные процессы, что определило его название «кахектин», т.е. вызывающий кахексию. Этот эффект связан с угнетением синтеза основного фермента липогенеза в организме - липопроотеинкиназы.

ФНО- $\beta$ , продуцируемый преимущественно Т-лимфоцитами, обладает свойствами лимфотоксина, обуславливающего цитотоксическое действие лимфоцитов – эффекторов иммунологических реакций. Введение *извне* или выброс большого количества эндогенного ФНО вызывает картину септического шока с геморрагическими повреждениями, распадом тромбоцитов, освобождением медиаторов.

В ходе развития защитных воспалительных реакций после инфицирования или повреждения, а также при онкогенезе и беременности в организме начинается усиленная продукция *белков острой фазы*. Так называли большую группу белков, обладающих антимикробным действием, способствующих фагоцитозу, активации комплемента, формированию и ликвидации воспалительного очага. Белки острой фазы продуцируются в печени при действии цитокинов, в основном ИЛ-1, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6. Основную массу белков острой фазы составляют С-реактивный белок и сывороточные амилоиды А и Р. Другие группы белков острой фазы составляют факторы свертывания крови, металлосвязывающие белки, ингибиторы протеаз, компоненты комплемента и некоторые другие. При воспалении содержание в крови большинства белков многократно возрастает, и определение С-реактивного белка входит в число общепринятых методов диагностики воспалительных процессов.

С-реактивный белок относится к *системе комплемента*, которая играет важную роль в реализации иммунного ответа. Термин был предложен в 1899 г., когда комплемент под названием «алексин» был описан французским микробиологом Ж. Борде, а затем немецким микробиологом П. Эрлихом (*complement* – дополнение) как фактор, дополнительный к антителам, вызывающим лизис клеток.

Системой комплемента называют многокомпонентную самособирающуюся систему белков сыворотки крови, которая играет важную роль в поддержании гомеостаза. Она способна активироваться в

процессе самосборки, т.е. последовательного присоединения к образующемуся комплексу отдельных белков, которые называются компонентами, или фракциями комплемента. Таких фракций известно девять. Они продуцируются клетками печени, мононуклеарными фагоцитами и содержатся в сыворотке крови в неактивном состоянии.

Исходные белки системы комплемента обозначаются прописной латинской буквой (например, С и В), а каждый компонент «С» сопровождается арабской цифрой. Входящие в состав этих макромолекул субъединицы дополнительно обозначаются строчными буквами (например, С1q).

Активация системы комплемента происходит на поверхности чужеродной или подлежащей разрушению собственной клетки и сопровождается лавинообразным расщеплением ранее не обладающих ферментативными свойствами белков на субъединицы. На каждом этапе этого процесса появляются ферменты, действующие на очередной компонент системы. Образующиеся в конечном итоге вещества способны выполнять свои функции самостоятельно (повреждают клеточные мембраны, повышают активность фагоцитов, стимулируют развитие воспаления и выход зрелых нейтрофилов из красного костного мозга, а также способствуют хемотаксису лейкоцитов к месту развития воспаления.), но наиболее эффективны при взаимодействии с другими участниками иммунных реакций.

Несмотря на одинаковые заключительные эффекты, существуют три разных пути активации системы комплемента (классический, лектиновый и альтернативный). Каждый из них имеет собственный механизм запуска, а завершается образованием конвертаз, которые, в свою очередь, вызывают развитие общего пути и, в конечном итоге, формируют мембраноатакующий комплекс.

*Классический путь* активируется при взаимодействием С1 и комплекса патогена с несколькими молекулами IgG или одним IgM. Образующийся при этом С1q активирует С1r и С1s, которые расщепляют С4 и С2 на компоненты, необходимые для образования комплекса С4b2a (*С3-конвертаза классического пути*). Этот фермент, уже в общем пути, расщепляет С3 с образованием С3b, который затем активирует остальные компоненты комплемента.

В сыворотке животных содержится маннансвязывающий лектин. По своей структуре он сходен с С1q и активирует *лектиновый путь* системы комплемента при взаимодействии с остатками маннозы

в полисахаридах на поверхности бактерий. Это приводит к образованию конвертазы классического пути.

*Альтернативный путь* активации комплемента наиболее важен при защите организма от грамотрицательных бактерий. Находящиеся на их поверхности липополисахариды вызывают расщепление C3 на субъединицы, а затем связываются с C3b. Образующийся при этом комплекс взаимодействует с фактором В и расщепляется (под влиянием фактора D) на Vb и Va. Затем, на бактериальной клетке формируется C3bVb (*C3-конвертаза альтернативного пути*). Этот комплекс стабилизируется пропердином (фактором P), а в отсутствие последнего быстро разрушается.

Альтернативный путь является самым мощным гуморальным механизмом защиты у низкоорганизованных многоклеточных животных, а у позвоночных эту функцию с большей эффективностью выполняет классический путь.

Однако альтернативный и лектиновый пути участвуют в нейтрализации патогена сразу после его попадания в организм позвоночных животных, а классический – лишь после накопления антител. Следовательно, альтернативный и лектиновый пути активации системы комплемента являются гуморальными механизмами быстрой неспецифической защиты, а классический путь развивается медленнее и относится к гуморальным механизмам специфической защиты.

Кроме того, активация классического и лектинового путей предотвращает осаждение иммунных комплексов на собственных нормальных клетках, а альтернативного – способствует их растворению и удалению иммунокомпетентными клетками. Так система комплемента предотвращает повреждение иммунными комплексами собственных здоровых тканей.

*Общий путь* активации комплемента начинается с расщепления C3 конвертазами любого из путей. Образующийся при этом C3b является мощнейшим опсоином и облегчает фагоцитоз чужеродных частиц. Кроме этого, связывание C3b с C4b2a приводит к образованию C4b2a3b (C5-конвертаза классического пути), с фактором В – C3bVb (C3-конвертаза альтернативного пути), с C3bVb – C3bVb3b (C5-конвертаза альтернативного пути). Перечисленные конвертазы и C8 вызывают медленное разрушение мембраны клетки-мишени, а после присоединения к ним C5b, C6, C7 и C9 образуется *мембраноатакующий комплекс*. Он формирует в клеточной мембране канал, который резко увеличивает ее проницаемость. Подвергшаяся

такому воздействию клетка набухает, ее мембрана разрывается, а содержимое цитоплазмы выходит в окружающую среду. Описанные механизмы лежат в основе некроза и развития воспаления. Этому способствуют образующиеся в ходе реакций общего пути системы комплемента активаторы воспаления, фагоцитоза и аллергических реакций. Например, C3a, C4a и C5a вызывают хемотаксис нейтрофилов, способствуют образованию в фагоцитах метаболитов кислорода, а также индуцируют выделение тучными клетками и базофилами содержимого гранул.

В дополнение к этому, компоненты C3 регулируют регенерацию долгоживущих В-клеток, продукцию антител к тимусзависимым антигенам, а также взаимодействие лимфоцитов друг с другом и с макрофагами.

Таким образом, активация системы комплемента вызывает лизис чужеродных клеток, усиление фагоцитоза, развитие воспаления, а также регулирует активность лимфоцитов.

В здоровом организме идет довольно интенсивное потребление комплемента за счет постоянного формирования иммунных комплексов, например с антителами против антигенов бактериальной аутофлоры. Поэтому белки системы комплемента быстро обновляются, отличаясь высокой скоростью катаболизма. Потребление комплемента может резко возрастать при разных видах патологии, связанных с усиленным образованием иммунных комплексов при инфекциях и иммунопатологических состояниях.

### Задания

1. Изучите классификацию и функции интерлейкинов, интерферонов и факторов некроза опухолей, используя вводные пояснения и дополнительную литературу, и заполните таблицу 10.

*Таблица 10 – Характеристика неспецифических факторов иммунитета*

Фактор	Группа	Чем продуцируется	Функция

2. Определить количество С3 компонента комплемента в сыворотке крови, используя следующую последовательность действий.

Принцип метода: В настоящее время считается, что роль системы комплемента в защите от патогенов заключается, в первую очередь, в опсонизации клеток-мишеней, что делает их доступными для действия эффекторных клеток, прежде всего фагоцитов. Наиболее распространены рецепторы для С3b (субкомпонента С3) и его фрагментов С3d, что свидетельствует об особой функциональной значимости С3. Кроме того фрагменты С3 и его субкомпонент С3a регулируют интенсивность иммунного ответа-синтез антител. Поэтому по его содержанию в крови можно судить о состоянии всей системы комплемента и соответственно об иммунологической защите организма в целом.

В норме содержание компонента комплемента С3 составляет 0,8-2 г/л.

Определения содержания компонента С3 заключается в постановке реакции иммунодиффузии (РИД). Сущность РИД заключается в том, что один компонент вносится в агаровый гель, а остальные в лунки, вырезанные в этом геле. При специфическом взаимодействии компонентов реакции, находящихся в лунках и агаровом геле происходит образование осадка в виде зоны преципитации вокруг лунки. По диаметру преципитата определяется концентрация компонента находящегося в лунке.

### **Ход работы**

1. В пробирку с расплавленным агаровым гелем (5 мл) температурой 48-50 °С внести 0,2 мл (4 капли) антисыворотки к С3 и тщательно перемешать.

2. Смесь вылить в чашку Петри и дать застыть .

3. Пробойником в застывшем агаре прорезать 4 лунки на расстоянии 0,5 см друг от друга.

4. В лунки внести положительный, отрицательный контроли и исследуемые сыворотки (по 2 капли в лунку).

5. Для построения калибровочного графика в отдельной чашке Петри со смесью агара и антисыворотки к С3 вырезать 7 лунок и внести стандарты содержащие С3 компонент в концентрации 1-0 г/л, 2 - 0,2 г/л, 3-0,5 г/л, 4-1,0 г/л, 5-1,5г/л, 6-2,0 г/л, 7-2,5 г/л (по 40 мкл. (2капли в лунку).

6. Чашки Петри закрыть крышкой и оставить при комнатной температуре на 30 минут.

7. Провести учет реакции.

7.1 Определить наличие колец преципитации в реакции с положительным контролем и в реакции со стандартами. С отрицательным контролем кольца преципитации быть не должно.

7.2 С помощью лупы и линейки определить диаметр колец преципитации в реакции со стандартами и построить калибровочный график зависимости диаметра преципитата (вместе с лункой) от концентрации компонента С3 (г/л). Для этого по оси абсцисс отложить диаметры колец преципитатов (мм), а по оси ординат – соответствующие им концентрации стандартов.

7.3 Определить наличие кольца преципитации и его диаметр в реакции с исследуемыми сыворотками крови и вычислить концентрацию С3 компонента, используя калибровочный график. Для этого по оси абсцисс отложить диаметр преципитата исследуемых образцов, провести линию до пересечения со стандартной калибровочной кривой, точку пересечения спроецировать на ось ординат и определить концентрацию в сыворотках компонента С3.

8. Сравнить содержание компонента комплемента С3 в исследуемых сыворотках крови с нормой и сделать вывод о состоянии системы комплемента.

3. Нарисуйте схему путей активации системы комплемента, используя рисунок 9.

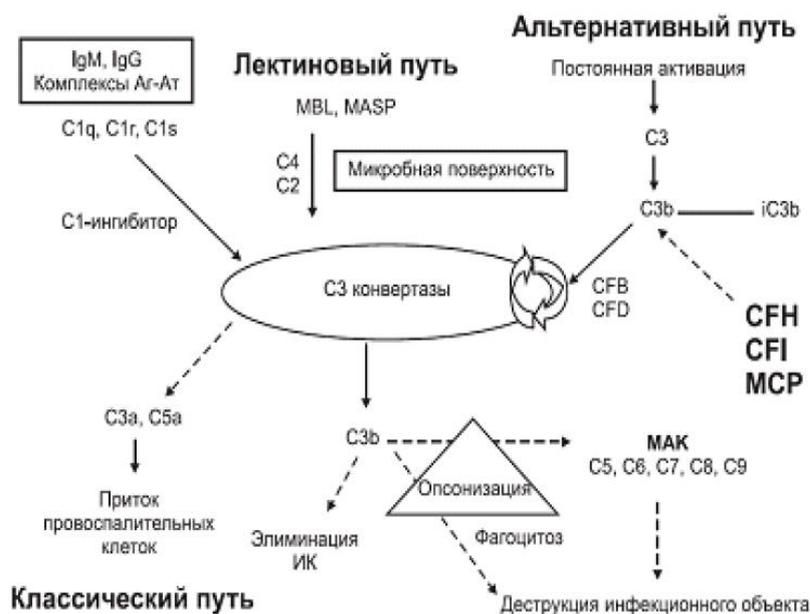


Рисунок 9 – Схема активации системы комплемента

## **Контрольные вопросы**

1. Что такое комплимент и, как осуществляется его активация?
2. Какова роль цитокинов и интерферонов в формировании иммунного ответа?
3. Какие виды интерлейкинов вам известны и какова их роль в иммунной регуляции?
4. Почему количество СЗ является методом диагностики воспалений?
5. Какие белки и почему вырабатываются в ходе онкогенеза?

## **Фагоцитоз и фагоцитарная активность**

### **Вводные пояснения**

Фагоцитоз одно из самых блестящих открытий XIX века, сделанное в 1882 г. И.И. Мечниковым. Вонзая в прозрачное тело личинки морской звезды шип розы, он наблюдал, что через несколько часов шип был окутан слоем «подвижных клеток». Если заноза была предварительно обмазана порошком кармина или краски индиго, то надвинувшиеся клетки оказывались наполненными этими красками. По выражению И.И. Мечникова: «Клетки эти очень прожорливы и вбирают в себя все, что только могут захватить». Он назвал эти клетки макрофагами и указал на их связь с моноцитами крови. Позднее, основываясь на своих исследованиях, он сформулировал фагоцитарную теорию иммунитета.

Фагоцитоз – это процесс распознавания, поглощения и переваривания фагоцитами различных чужеродных корпускулярных объектов диаметром до 0,5 мкм. Способностью к фагоцитозу обладают иммунные клетки крови и тканей. В крови, это нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы и В2 лимфоциты. Наиболее активными фагоцитами являются нейтрофилы и моноциты. В тканях это макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки и В2 лимфоциты. Кроме клеток иммунной системы к фагоцитозу способны эндотелиальные и эпителиальные клетки после их стимуляции. Их называют факультативными фагоцитами.

Различают несколько стадий фагоцитоза (рисунок 10):

- приближение к объекту фагоцитоза в результате хемотаксиса;
- адгезия (прилипание к объекту);

- активация мембраны;
- погружение объекта в цитозоль и образование фagosомы;
- слияние фagosомы и лизосомы;
- киллинг и расщепление объектов фагоцитоза;
- выброс продуктов расщепления.

Фагоцитоз является основой, как врожденного иммунитета, так и пусковым механизмом адаптивного. Так как именно после фагоцитоза фагоциты тканей презентуют антиген лимфоцитам и развивается иммунный ответ.

Таким образом, фагоциты являются важным звеном клеточного иммунитета и их активность является показателем состояния естественной резистентности организма и соответственно иммунитета в целом.



*Рисунок 10 – Этапы фагоцитоза*

Нарушение фагоцитоза встречается довольно часто и может быть как врожденным, так и приобретенным. При этом снижается естественная резистентность организма, уменьшается образование антител, что ведет к частым заболеваниям и слабому формированию иммунного ответа.

Расстройства фагоцитарной активности могут быть обусловлены различными причинами, в том числе нарушениями образования и разрушения лейкоцитов, дефицитом опсонизирующих факторов, функциональными нарушениями фагоцитов из-за генетических мутаций, а также изменением гормонального фона организма,

действием лекарственных препаратов или токсинов, выделяемых некоторыми бактериями.

Для оценки активности фагоцитов используют следующие показатели, вычисление которых проводится по формулам 3 и 4:

1) *фагоцитарный показатель* (Фи) – процент фагоцитирующих клеток от общего числа учтенных нейтрофильных лейкоцитов;

2) *фагоцитарное число* (Фч) – среднее число микробных клеток, поглощенных одним лейкоцитом (характеризует интенсивность фагоцитоза):

$$\text{Фи} = \frac{\text{Фа}}{\text{Фп}} \times 100 \% , \quad (3)$$

$$\text{Фч} = \frac{\text{Мф}}{\text{Фа}} , \quad (4)$$

где Фа – количество активных лейкоцитов;

Фп – общее число лейкоцитов;

Мф – число фагоцитированных микробов.

В норме показатели фагоцитоза составляют Фи = 18-30 %, Фч=2,55-2,70

*Фагоцитарное число* определяют в мазках, которые были приготовлены для определения фагоцитарного показателя, подсчитывают 100 нейтрофильных лейкоцитов и суммарное количество захваченных ими бактериальных клеток, затем определяют фагоцитарное число. Например, 100 лейкоцитов поглотили 500 бактериальных клеток, следовательно, фагоцитарное число равно  $500 : 100 = 5$ .

Интенсивность фагоцитоза повышается благодаря антителам и другим опсонинам, взаимодействующим с микробными клетками. Чтобы определить *опсоно-фагоцитарный индекс*, сравнивают активность фагоцитов в нормальной и исследуемой (иммунной) сыворотках.

Опсоно-фагоцитарный индекс показывает, во сколько раз процесс фагоцитоза в иммунной сыворотке интенсивнее, чем в исследуемой пробе. Его вычисляют делением фагоцитарного числа иммунной сыворотки на фагоцитарное число нормальной сыворотки. Например, в 100 лейкоцитах нормальной сыворотки фагоцитировано 200 бактерий, следовательно, фагоцитарное число  $200 : 100 = 2$ . В 100 лейкоцитах исследуемой иммунной сыворотки захвачено 500 бактерий и фагоцитарное число  $500 : 100 = 5$ . В приведенном примере опсоно-фагоцитарный индекс составит  $5,0 : 2,0 = 2,5$ .

При патологии происходит изменение показателей фагоцитарной активности. Так, повышение показателей отмечается при инфекционных (бактериальных) воспалительных процессах, лейкоцитозе, аллергических реакциях, аутоиммунных заболеваниях. Понижение показателей фагоцитарной активности происходит при тяжелых интоксикациях, радиоактивном облучении, первичных (врожденных) иммунодефицитах и некоторых аутоиммунных заболеваниях, таких как хронический гепатит, цирроз печени.

### **Задания**

1. Подготовить материал для определения фагоцитарной активности. В качестве тест-объекта для этого используют суточную культуру кишечной палочки или стафилококка в концентрации 1 млрд/мл. В качестве исследуемого материала берется проба крови животного. Для подготовки тест объекта используйте следующую методику.
- 2.

### **Ход работы**

1. Соблюдая технику безопасности в пробирку с культурой, выращенной на скошенном агаре, над пламенем горелки внести 2 мл физраствора и закрыть резиновой пробкой.

2. Вращательными движениями между ладонями смыть культуру с агара, а затем взвесить перелить в чистую пробирку.

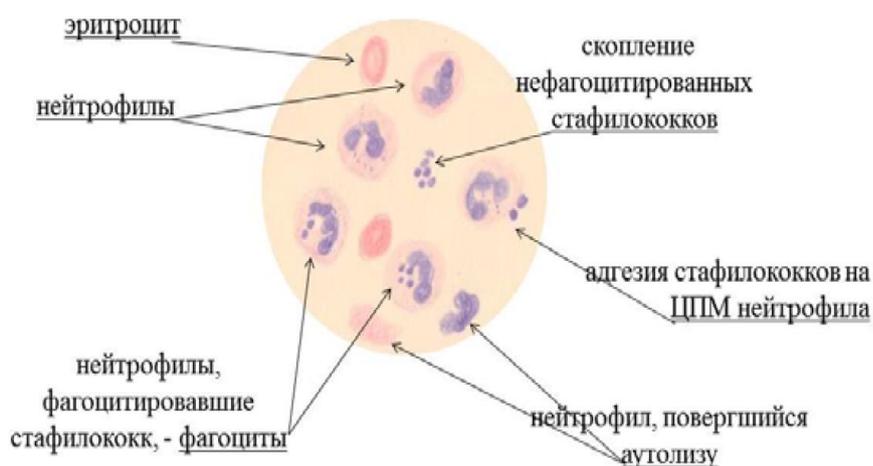
3. Используя стандарт мутности, довести концентрацию микроорганизма 0,9 %-м раствором хлорида натрия (физраствором) до 1 млрд/мл.

4. Подготовить 0,5 мл дефибрированной крови животного. Если кровь взята непосредственно перед проведением исследования, её помещают в колбу, встряхивают в течение 10-15 минут, а затем фильтруют через марлю, удаляя образующийся сгусток. Фильтрат используют для дальнейших исследований.

2. Провести оценку фагоцитарной активности, используя следующую методику.

## Ход работы

1. В полученную дефибрированную кровь внести 0,3 мл изготовленной взвеси тест-микроба и тщательно перемешать.
2. Поместить пробирку в термостат и при 37 ° С на 30 минут, периодически встряхивая (через каждые 5 минут).
3. Приготовить мазки крови, по методике отработанной ранее. На краю мазка простым карандашом написать группу и инициалы.
4. Мазки зафиксировать в смеси Некифорова 10 минут и Окрасить синькой Мансона 7 минут или в краской Романовского 40 мин.
5. Мазки промыть и высушить.
6. Микроскопировать мазки крови. В каждом поле зрения подсчитать количество не активных лейкоцитов (не принявших участие в фагоцитозе), количество активных лейкоцитов (принявших участие в фагоцитозе), количество фагоцитированных микроорганизмов в каждом активном лейкоците (рисунок 11).
7. При проведении подсчета, равномерно двигайте мазок, подсчитывая показатели в разных полях зрения. Результаты занесите в таблицу 11. Подсчет ведется до тех пор, пока общее количество лейкоцитов не составит 100 клеток.



*Рисунок 11 – Поле зрения при подсчете фагоцитарной активности*

Таблица 11 – Подсчет фагоцитарной активности

Поле зрения	Неактивные лейкоциты	Активные лейкоциты (Фа)	Число фагоцитированных микробов (Мф)	Общее число лейкоцитов (Фп)
1	5	6	5,7,5,8,9,7	11
Итого				100

8. На основании данных таблицы 11 рассчитайте показатели фагоцитарной активности и сделайте вывод, сравнив полученный результат с нормативом.

### Контрольные вопросы

1. Кем было открыто явление фагоцитоза и какие клетки его осуществляют?
2. Какие этапы выделяют в ходе фагоцитоза?
3. Что означает термин фагоцитарная активность и каковы ее показатели?
4. На что указывает фагоцитарное число?
5. При какой патологии происходит повышение фагоцитарной активности?
6. При какой патологии происходит понижение фагоцитарной активности?

## Оценка клеточного иммунитета

### Вводные пояснения

Важная роль в деятельности иммунной системы принадлежит иммунокомпетентным клеткам. Т-лимфоциты обеспечивают клеточные формы иммунного ответа, В-лимфоциты отвечают за активность гуморального иммунитета.

Определение уровней Т- и В-лимфоцитов входит в комплекс тестов, используемых для оценки иммунного статуса организма. Изменение числа этих клеток иммунитета может быть связано с угнетением или стимуляцией их образования в центральных органах иммунной системы (тимус, костный мозг), с нарушением их

дифференцировки, изменением количественного соотношения отдельных субпопуляций и т.д.

Иммунологические методы оценки клеточного звена иммунитета, используемые в экспериментальных исследованиях и клинической практике, представлены в таблице 12. Они позволяют достаточно точно определить функциональное состояние лимфоцитов. Это является важным для диагностики различных патологий иммунной системы, в том числе иммунодефицитов и гиперчувствительности. С их помощью можно осуществлять контроль за восстановлением иммунологической компетентности организма в процессе лечения методами иммунотерапии.

*Таблица 12 – Некоторые лабораторные тесты характеризующих функциональное состояние Т- и В-звеньев иммунитета.*

Тип клеток	Количественные методы	Методы определения функциональной активности
Т-лимфоциты	Лейкограмма; метод спонтанного розеткообразования	Реакция гиперчувствительности замедленного типа; реакция бласттрансформации-лимфоцитов (РБТЛ)
В-лимфоциты	Реакция иммунофлюорисценции (РИФ); метод комплементарного розеткообразования; метод гемолитических бляшек; реакция иммунодиффузии (РИД); иммуноэлектрофорез ИФА	Иммунный ответ на антиген; РБТЛ с лаконосом; метод определения циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

Лимфоциты в своей жизни проходят 2 периода деления:

Первый период связан с выработкой новых лимфоцитов в костном мозге. Лимфоциты вырабатываются в костном мозге из стволовых клеток и проходят несколько стадий деления. Делящиеся в костном мозге клетки называют «бластами». Лимфоциты делятся, дифференцируются и созревают в костном мозге В-клетки или в

тимусе Т-клетки до того момента, пока станут «зрелыми» и смогут распознавать и бороться с различными антигенами. Тогда они покидают костный мозг и выходят в циркуляцию по организму.

Второй период деления лимфоцитов связан с их реакцией на антигены. Если способность к бласттрансформации нарушена или вообще утрачена, то в организме не сможет образоваться нужного количества защитных клеток и организм не сможет победить проникшую в него инфекцию.

Некоторые инфекции – вирусы, например инфекционного мононуклеоза, лейкоза и др., сами по себе вызывает массовую бласттрансформацию лимфоцитов разной антигенной специфичности. Такая патологическая бласттрансформация называется *поликлональной*.

Способность к бласттрансформации отражает функциональную активность иммунокомпетентных клеток, поэтому *реакция бласттрансформации лимфоцитов* (РБТЛ) используют для оценки иммунного статуса организма.

Для этого из пробы крови пациента выделяют лимфоциты, их обрабатывают специальными веществами – стимуляторами бласттрансформации, которые подразделяются на специфические и неспецифические стимуляторы или *митогены*. К *неспецифическим митогенам* относятся полисахариды грамотрицательных бактерий, туберкулин микобактерий, животного происхождения (иммуноглобулин, выделенный из гетерологичной иммунной сыворотки) и растительного происхождения (фитогемагглютинин – ФГА, лаконос). Неспецифические стимуляторы вовлекают в процесс бласттрансформации большую часть лимфоцитов независимо от их иммунологической специфичности. Причем одни из них активируют только Т-клетки (ФГА), другие преимущественно В-клетки (туберкулин, липополисахариды). Общепринято использовать фитогемагглютинин (ФГА) для бласттрансформации Т-лимфоцитов и конканавалин А (кон А, кон А) для бласттрансформации В-лимфоцитов, но могут использоваться и другие митогены.

*Специфическими митогенами* являются растворимые и корпускулярные антигены, которые вовлекают в процесс бласттрансформации иммунные к ним Т- и В-лимфоциты. В отличие от неспецифических стимуляторов антигены активируют только те лимфоциты, которые несут специфические к нему рецепторы.

При поражении конкретного пациента конкретной инфекцией (например, при рецидивирующей стафилококковой инфекции), можно проверить способность лимфоцитов к бласттрансформации с антигеном стафилококка (т.е. к моноклональной бласттрансформации). Если лимфоциты пациента не реагируют бласттрансформацией на антиген конкретной инфекции, говорят об изолированной иммунной толерантности к данному антигену (или об изолированном иммунодефиците к данному антигену).

*Метод розеткообразования (РОК)* – это реакция иммунофенотипирования, которая была одной из первых, применяемых для иммунодиагностики. Однако в настоящее время комплекс реакций розеткообразования постепенно выводится из иммунодиагностической практики. К её положительным чертам относятся простота, отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании и невысокая стоимость. Однако розеткообразование в качестве процедуры иммунофенотипирования позволяет определить лишь незначительное количество мембранных рецепторов, воспроизводимость полученных результатов невысокая, а следовательно и диагностическая информация не отличается значимостью. В то же время реакции розеткообразования сохраняют свое значение при проведении экспериментальных исследований в области иммунологии. Так, если суспензию Е-РОК наслоить на градиент плотности фиколл-верографин и подвергнуть центрифугированию, то на дно пробирки седиментируют лишь Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер CD2. Другие популяции лимфоцитов будут задерживаться в интерфазе. Соответственно, такой подход позволяет провести выделение клеток в виде гомогенной популяции. Кроме этого, возможности реакций розеткообразования могут быть расширены. Дело в том, что истинное розеткообразование характерно лишь для двух типов рецепторов. Но их можно использовать в качестве пассивного носителя антител к рецепторам, помогающего визуализации взаимодействий между клетками. Так, были разработаны реакции розеткообразования для выявления рецептора к комплементу на В-лимфоцитах (ЕАС-РОК: Е-эритроцит, А-антитело к эритроциту, С-комплемент), рецептора к Fc-фрагменту IgG (Fcγ-РОК) и Fc-фрагменту IgM (Fcμ-РОК), характерных для Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов и В-лимфоцитов. Эта же реакция оказалась полезной для определения числа В-лимфоцитов, несущих

Ig разной классовой принадлежности.

Классическая реакция розеткообразования основана на присоединении Т-лимфоцитов к эритроцитам барана, а В-лимфоцитов к эритроцитам мыши. Эритроциты за счет присутствующих на их поверхности молекул (рецепторов) избирательно сорбируются на лимфоцитах, образуя «розетки».

*Другие методы* основаны на выявлении рецепторов к Fc-фрагментам иммуноглобулинов и иммуноглобулиновых детерминант на поверхности В-клеток. Рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулинов способен связывать агрегированный  $\gamma$ -глобулин, меченный флуорохромом, что можно в последующем установить при помощи флуоресцентного анализа.

Используя меченные флуорохромом антиглобулиновые сыворотки или антисыворотки против иммуноглобулинов отдельных классов, например моноклональные антитела, можно определить общее содержание В-клеток и дифференцировать клетки, несущие IgG-, IgA-, IgM-детерминанты.

### **Задания**

1. Проведите реакцию бласттрансформации (РБТЛ) с использованием следующей методики.

### **Ход работы**

1. Кровь для исследования в количестве 1–2 мл берут из вены в пробирку с раствором гепарина. Для отделения лейкоцитов от эритроцитов пробу крови осторожно наслаивают на раствор, содержащий смесь фиколл-верографин или фиколл-гипак (плотность раствора 1,077 г/мл) и центрифугируют при 1,5 тыс об/мин в течение 40 минут. Эритроциты оседают на дно пробирки, а лейкоциты, обладающие меньшей плотностью, остаются в верхней части пробирки в виде мутного кольца. Фракцию лейкоцитов осторожно отсасывают пипеткой и двукратно отмывают путем центрифугирования средой 199. К полученной клеточной взвеси лейкоцитов добавляют питательную среду (199 с добавлением сыворотки 20-30 %) до концентрации 1млн. клеток /мл.

2. Взвесь лейкоцитов разливают по пробиркам по 1-2 мл. В опытные (5шт) добавляют специфический митоген – антиген (вирусный, бактериальный, протозойный, аллерген в концентрации

не токсичной для лимфоцитов). В 1 контроль - фитогемагглютинин, во 2 контроль находится только культура лимфоцитов.

Пробирки в закрытом виде инкубируют в термостате при 37° С 4-7 суток в зависимости от вида антигена его способности вызывать бластогенез. При изучение неспецифической бласттрансфрмации, достаточно 2-3 дней.

3. Пробирки после инкубации встряхивают и центрифугируют при 2000 об/мин. Надосадок сливают, осадок заливают сывороткой и вновь центрифугируют. Полученный осадок лимфоцитов ресуспензируют в остатках жидкости и готовят мазки. Мазки фиксируют в метаноле и окрашивают смесью азур-эозиновой 15-20 мин, промывают водой, высушивают и микроскопируют.

4. Микроскопируют контрольные и опытные мазки подсчитывая в них не менее 1000 клеток. Учитывают 3 категории клеток: 1-истинные бласты, 2-переходные формы и 3-нетрансформированные лимфоциты.

Истинные бласты это клетки округлой формы, увеличенные в размерах, свыше 15 мкм в диаметре, с неровными краями, с базофильной цитоплазмой, содержащей светлые вакуоли и окружающей со всех сторон крупное ядро. В ядре на фоне сетчатой структуры хроматина видно одно или несколько ядрышек. Обнаруживаются и делящиеся клетки (рисунок 12).

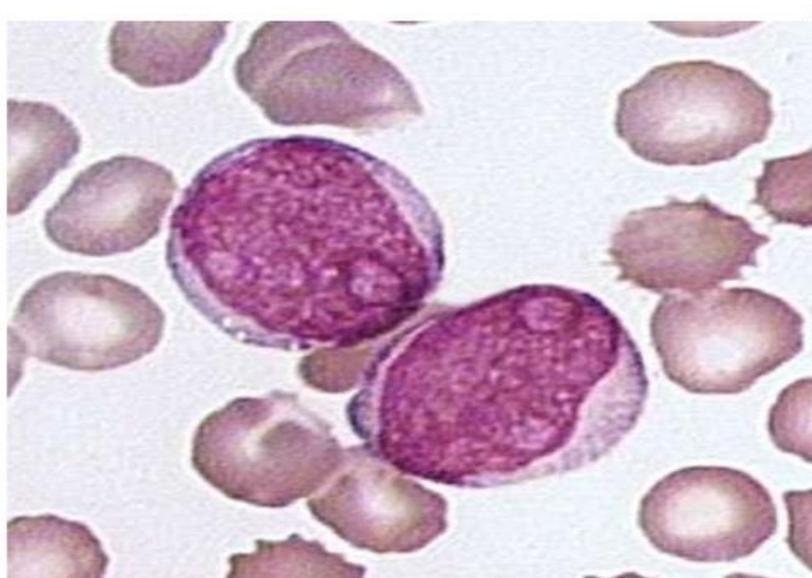
Переходные формы имеют менее развитую цитоплазму, более интенсивно окрашенное ядро и меньшие по размерам ядрышки.

Нетрансформированные лимфоциты диаметр менее 10 мкм ядро интенсивно окрашено занимает почти всю клетку, цитоплазма базофильная в виде тонкого ободка.

Контроль 1 позволяет оценить иммунологический статус организма – реакцию бласттрансформации на неспецифический митоген (фитогемагглютинин) и правильность постановки РБТЛ. ФГА вызывает бласттрансформацию у 40-90 % лимфоцитов.

Затем определяют процент трансформации. В контроле 2 бласттрансформации быть не должно.

Реакция считается положительной, если в опыте присутствует 7 % и более бласттрансформированных клеток.



*Рисунок 12 – Морфология бластных клеток в центре поля зрения*

5. Провести подсчет бластных клеток, используя на менее 10 полей зрения, и сделать вывод.

2. Провести оценку Т-системы иммунитета с помощью реакции «спонтанных розеток» (Е-РОК). Т-Лимфоциты несут на своей поверхности рецепторы, реагирующие с мембранными структурами эритроцитов барана. После сорбции эритроцитов Т-клетки приобретают форму «розетки», что позволяет выявлять их в популяции лимфоцитов. Реакцию проводят в три этапа.

### **Ход работы**

1. В центрифужную пробирку наливают 2 мл разделяющего раствора, состоящего из 9% водного раствора фиколла и визотраста-370, доведенного до плотности 1,077 г/мл (соотношение 8:2). Затем на разделяющий раствор осторожно наслаивают 2...4 мл исследуемой крови с гепарином (100 МЕ/мл), разведенной средой Игла в соотношении 1:2...1:4. Смесь центрифугируют при 600 оборотах 10 минут и температуре 20 °С. Лимфоциты, сконцентрированные в виде беловатого слоя над разделяющим раствором, отсасывают пастеровской пипеткой и отмывают средой Игла несколько раз. Средой Игла концентрацию лимфоцитов доводят до  $3 \cdot 10^6$ /мл.

2. Готовят суспензию эритроцитов барана. Эритроциты отмыв-

вают 0,15 М раствором хлорида натрия (три раза), затем из них готовят 0,5%-ю суспензию в среде Игла. Далее смешивают по 0,5 мл суспензии лимфоцитов и эритроцитов, смесь центрифугируют при 200 оборотах 5 мин и оставляют при 4 °С на 18 ч.

3. Проводят учет реакции. Для этого осторожно берут каплю суспензии, не перемешивая осадок. Делают мазок и микроскопируют, либо каплю суспензии вносят в счетную камеру и исследуют методом фазово-контрастной микроскопии. Подсчитывают те клетки, к поверхности которых прикреплено более трех эритроцитов (рисунок 13).

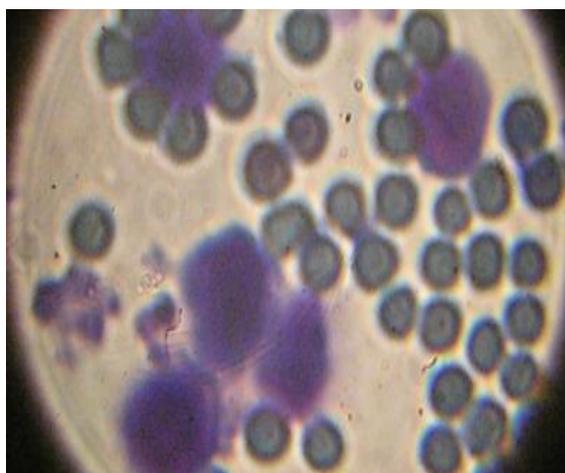
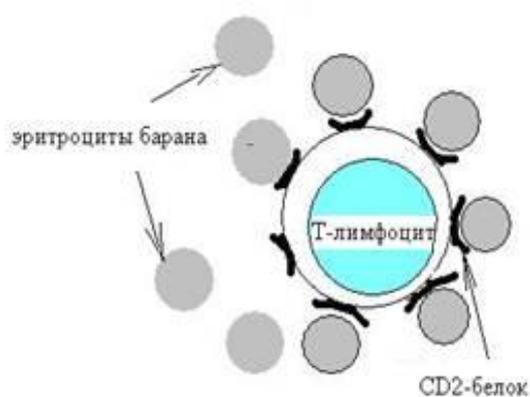


Рисунок 13 – Реакция розеткообразования

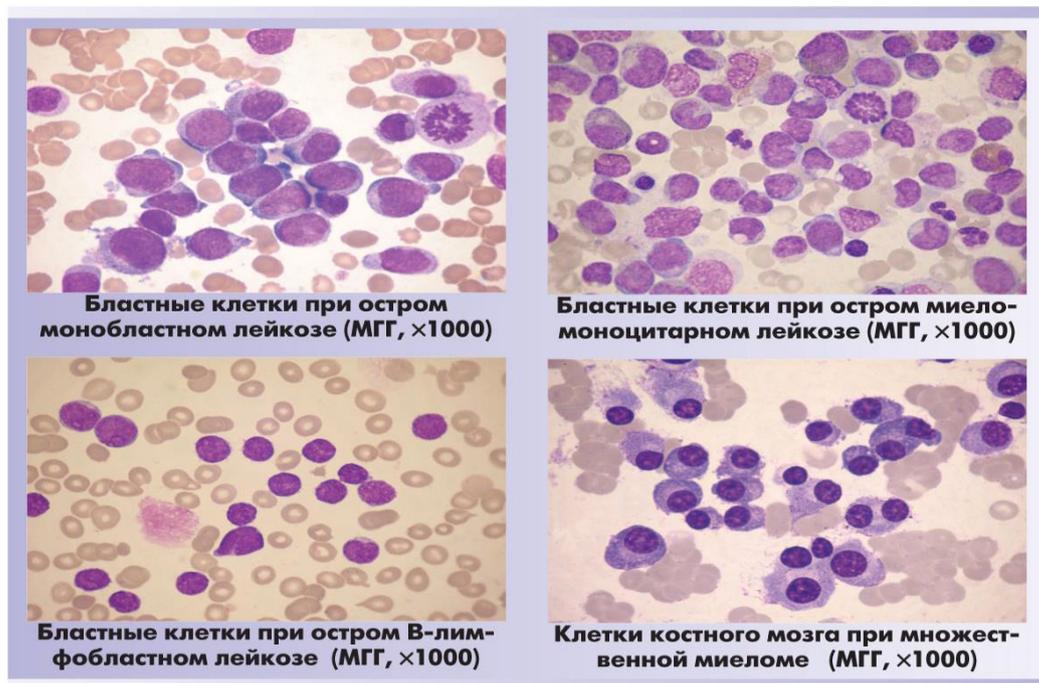
4. Проведите подсчет активных Т-лимфоцитов (которые присоединили не менее 3 эритроцитов) и неактивных лимфоцитов (не образовавших розетки) в 10 полях зрения, последовательно передвигая препарат. Результаты подсчета занесите в таблицу 13.

Таблица 13 – Учет реакции розеткообразования

Поле зрения	Число активных Т-лимфоцитов	Число неактивных Т-лимфоцитов
ИТОГО		

5. Определите % активных лимфоцитов по отношению к общему числу и сделайте вывод.

3. Используя рисунок 14, проведите подсчет бластных клеток, определите их % к общему числу лимфоцитов и сделайте вывод.



*Рисунок 14 – Бластные клетки в поле зрения*

### **Контрольные вопросы**

1. С помощью каких методов определяют функциональное состояние Т- и В-лимфоцитов?
2. В чем сущность реакции бласттрансформации и для чего ее используют?
3. Что такое митогены? Приведите примеры.
4. На чем основан принцип розеткообразования?
5. Какие разновидности реакции розеткообразования используются в иммунологии?
6. Почему в современной иммунодиагностике мало используется классическая реакция розеткообразования?

## **Механизмы иммунного ответа**

### **Вводные пояснения**

Жизнь животного невозможна без нормального функционирования всех систем организма, в том числе и иммунной. Формирование резистентности, как при реализации врожденного, так и приобре-

теного иммунитета осуществляется с помощью определенных механизмов, обеспечивающих взаимодействие клеточных и гуморальных факторов.

Те или иные механизмы иммунной защиты есть практически у всех животных. Эти механизмы сильно различаются по своей структуре, сложности, эффективности и, главное, по соотношению врожденных и приобретенных компонентов. Например, у беспозвоночных преобладает врожденный иммунитет, хотя это далеко не абсолютное правило, а у позвоночных дополнительно к врожденным защитным механизмам развилась сложная адаптивная иммунная система, способная приспосабливаться (адаптироваться) к всевозможным новым инфекциям.

У всех высших позвоночных основными компонентами адаптивной иммунной системы являются лимфоциты двух типов: В и Т (см.: В cell, Т cell). Как уже упоминалось, каждый зрелый лимфоцит производит один (и только один) тип рецепторов, причем каждый рецептор способен распознавать чужеродные молекулы (антигены) строго определенного типа. Рецепторы В-лимфоцитов называются антителами, они могут отделяться от поверхности лимфоцита и самостоятельно атаковать «врагов» (антигены). Рецепторы Т-лимфоцитов (Т-клеточные рецепторы) по своей структуре похожи на антитела, но они прочно приделаны к поверхности Т-лимфоцита и не распливаются свободно в окружающей среде, подобно антителам.

В ходе развития (созревания) лимфоцитов происходит сложная перестройка их генома. Суть ее состоит в том, что из имеющегося в геноме набора «заготовок» комбинаторным путем формируются зрелые, готовые к использованию гены антител или Т-клеточных рецепторов (приложение 1). Возникает огромное разнообразие лимфоцитов, производящих сотни тысяч и миллионы разных иммунных рецепторов. Среди этих рецепторов неизбежно появляются и опасные для организма, готовые наброситься на свои собственные антигены. Лимфоциты, производящие такие рецепторы, отбраковываются; остальные сохраняются.

В результате организм получает огромный набор лимфоцитов, способных распознавать чуть ли не любые чужеродные белки и углеводы. Когда в организм проникает инфекция (например, бактерии), те В-лимфоциты, чьи антитела проявляют наибольшее сродство к поверхностным веществам (антигенам) данной бактерии, дополнитель-

но «подгоняют» гены своих антител к этим антигенам путем соматического гипермутирования.

T- и В-лимфоциты высших позвоночных обмениваются между собой разнообразными химическими сигналами (в том числе с помощью *интерлейкинов*). В соответствии с этим у разных типов лимфоцитов активны строго определенные гены, ответственные за прием и передачу этих сигналов.

При развитии иммунного ответа T- и В-лимфоциты взаимодействуют между собой и другими клетками, прежде всего макрофагами. Последним отводится большая роль в обработке антигена и передаче информации иммунокомпетентными лимфоцитами.

При возникновении гуморального иммунитета В-лимфоциты под влиянием антигена и медиаторов, выделяемых T-лимфоцитами, трансформируются в антителозависимые клетки. Образованные ими антитела обладают сильными агглютинирующими и комплементсвязывающими, слабыми преципитирующими и антитоксическими свойствами.

Из активизированных T- и В-лимфоцитов образуются также клетки – носители иммунной памяти об антигене, от которых зависит длительность сохранения потенциального иммунитета к ранее встречавшимся антигенам. Благодаря постоянной рециркуляции лимфоцитов, в том числе и клеток иммунной памяти, происходит интегрированная перестройка всей иммунной системы, и на всех путях возможного попадания антигенов химического и биологического происхождения воздвигаются мощные защитные барьеры.

Итак, при поступлении в организм антигена, в бой в первую очередь вступают клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы, базофилы и эозинофилы. Они выделяют вовне содержимое своих гранул, способное повредить клеточную стенку, например бактерий, а также, усилить кровоток, чтобы как можно больше лейкоцитов поступило в очаг инфекции.

Одновременно с этим дендритная клетка или макрофагитирующая клетка, поглотившая патоген, спешит в ближайший лимфоузел, где передает информацию о нём находящимся там T- и В-лимфоцитам. Те активируются и путешествуют до местонахождения патогена. T-киллеры при контакте с зараженной клеткой убивают ее, T-хелперы помогают макрофагам и В-лимфоцитам осуществлять их механизмы защиты. В итоге патоген гибнет, а победившие клетки погибают, но некоторые становятся клетками памяти, которые поселяются

в костном мозге и ждут, когда их помощь снова понадобится организму.

Контакт антигена с организмом в зависимости от его состояния и условий иммунизации может привести к образованию не только иммунитета, но и вызвать состояние реактивности – *иммунологическую толерантность*. Она может быть врожденной и приобретенной. Иммунологическая толерантность – важнейший феномен иммунорегуляции. С врожденной иммунной толерантностью связано в норме отсутствие иммунного ответа на антигены собственных тканей. Потеря иммунной толерантности к собственным тканям приводит к развитию аутоиммунной патологии.

Кроме того, в зависимости от вида антигена в формировании иммунитета принимают участие различные компоненты системы иммунитета. Например, при формировании антибактериального иммунитета ведущими являются гуморальные факторы, а формирование противовирусного иммунитета – клеточные фактора.

В современной медицине и ветеринарии широко используются методы иммунной профилактики и лечения некоторых инфекционных заболеваний. При формировании активного и пассивного искусственного иммунитета задействованы те же механизмы взаимодействия иммунокомпетентных клеток и гуморальных факторов.

В 70-е годы XX века в фармакологии выделена отдельная область под названием иммунофармакология. В России ветеринарные препараты с иммуномодулирующими свойствами производятся более 20 лет. Их состав и спектр активности отличается большим разнообразием.

Нередко термином «*иммуномодулятор*» называют вещества, которые напрямую на иммунитет не воздействуют. Так обстоят дела с кормовыми добавками и ветеринарными препаратами, содержащими витамины, некоторые пробиотики и пребиотики, которые на самом деле являются в большей степени иммунобиологическими препаратами, улучшающими функции обмена веществ, пищеварения, или адаптогенами. Есть данные, что некоторые бактерии (в том числе лактобактерии), обитающие в ЖКТ животных, размножаясь в кишечнике, стимулируют местную лимфоидную ткань. Активированные в пейеровых бляшках, лимфоциты мигрируют и заселяют другие органы, что обуславливает возможность развития системных иммунных реакций. Таким образом, ряд энтеробиот обладают иммуномодулирующим эффектом.

Наиболее широко истинные иммуномодуляторы применяются для лечения собак и кошек. В животноводстве иммуномодуляторы используют с лечебной и профилактической целью для повышения естественной резистентности, стимуляции роста и развития молодняка (например Гамавит, стимулирующий выработку гормона роста), при патологических состояниях, сопровождающихся снижением иммунореактивности, в том числе при вирусных и бактериальных заболеваниях, для нормализации формулы крови, профилактики и коррекции стресса и его последствий, для детоксикации и др.

Действие иммуномодуляторов зависит от состава, дозы, спектра активности (некоторые средства особенно эффективны при профилактике и лечении вирусных инфекций, другие против бактериальных и др.). Различают препараты естественного (природного) происхождения, а также синтетические и комплексные иммуномодуляторы.

По происхождению иммуномодуляторы можно разделить на микробные (лизаты бактерий и части клеточных стенок), тимические и тканевые (пептиды тимуса, плаценты), костномозговые препараты, цитокины (интерлейкины и интерфероны), нуклеиновые кислоты (натриевая соль рибонуклеиновой кислоты гриба *Saccharomyces cerevisiae*), растительные препараты, химически чистые вещества.

Для продуктивных животных иммуномодуляторы и эрготропики выпускаются в форме порошков, мазей и инъекционных растворов. Различают как самостоятельные препараты с одним действующим веществом, так и комплексные лекарственные средства.

В связи с распространением инфекционных заболеваний животных большой интерес вызывают видоспецифичные противовирусные препараты на основе рекомбинантных интерферонов. В России продаются лекарственные средства на основе как бычьего, так и свиного и лошадиного интерферонов. Они применяются в составе комплексной терапии с антибиотиками, что усиливает их противовирусный и снижает иммуносупрессивный эффект. Препараты интерферонов назначают при респираторных и гинекологических инфекциях, заболеваниях ЖКТ, в том числе смешанных – вызванных бактериями и вирусами одновременно. В России продаются двухкомпонентные средства, содержащие противобактериальный и рекомбинантный иммуномодулирующие агенты. Существует также комбинация на основе витаминов (Тетравитферон-Б).

Препараты на основе других цитокинов – интерлейкинов представлены в России препаратом Ронколейкин.

Лечение средствами на основе индукторов интерферона, которые мобилизуют собственные защитные функции в организме, является не менее эффективным. К таким препаратам относятся Максидин, Форвет и др.

Лактоферрин – уникальный полифункциональный белок молока. Принимает участие в системе врожденного и гуморального иммунитета, регулирует функции иммунных клеток, содержание железа в организме, а также рост костной ткани. Обладает антивирусной и противогрибковой активностью. На основе лактоферрина производится российский препарат Полиферрин-А.

Главными активаторами врожденного и индукторами приобретенного иммунитета в организме млекопитающих выступают антигены микробных клеток. Благодаря поиску отдельных веществ и молекул, активирующих данные процессы, ученым удалось создать ряд препаратов, обладающих противобактериальным эффектом. Таким свойством обладают иммуномодуляторы на основе полисахаридов клеточной стенки бактерий — Сальмозан (выпуск прекращен), Гликопин и др.

Инновационным способом лечения вирусных заболеваний рогатого скота, свиней и птицы, вызванных РНК-возбудителями, являются средства на основе синтетической низкомолекулярной рибонуклеазы. Этот фермент катализирует процесс разрушения вирусных структур.

Тканевые препараты представлены средствами на основе АСД и плаценты. Среди них есть комплексные иммуномодуляторы, содержащие витамины и минералы, а также органические кислоты.

Из препаратов растительного происхождения в животноводстве широко применяется Фоспренил (полипренилфосфат натрия, из хвои сибирской пихты), обладающий иммуномодулирующей, противовирусной, противовоспалительной, адьювантной и иными фармакологическими активностями.

Среди иммунобиологических препаратов перспективны препараты, включающие бутафосфан. В качестве синергиста в них вводится также витамин В<sub>12</sub>, активизирующий ряд ключевых реакций в организме. Бутафосфан улучшает утилизацию глюкозы в крови, активизирует функции печени, повышает неспецифическую резистентность организма, стимулирует остеогенез и образование скорлупы. Этими особенностями обусловлен широкий видовой (рогатый скот, птица,

свиньи) и возрастной диапазон применения данного лекарственного средства в животноводстве и птицеводстве.

Иммунотропными свойствами обладают также спорообразующие бактерии, которые активизируют фагоцитарную активность лимфоцитов. Их применение не имеет ограничений, кроме индивидуальной непереносимости. Препаратами нового поколения являются модифицированные спорообразующие бактерии, выделяющие в кишечнике животных рекомбинантный интерферон (Ветом 1.1 от НПФ «Исследовательский центр»). Эти микроорганизмы назначаются не только для нормализации микрофлоры ЖКТ при вирусных и бактериальных заболеваниях, но и при ухудшении качества кормового сырья, температурном и других стрессах.

Иммуномодулятор природного происхождения натрия нуклеинат, получаемый гидролизом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с последующей очисткой, содержит нуклеотиды, являющиеся активным биологическим компонентом. Препарат не обладает видовой специфичностью, являясь естественным компонентом организма, лишен побочного действия. На основе натрия нуклеината и низкомолекулярных полипептидов НПВиЗЦ «Ветзвероцентр» создан иммунокорригирующий препарат Риботан.

Всего в качестве иммуномодулирующих и иммунобиологических препаратов для сельскохозяйственных животных и птицы применяется более 50 ветеринарных средств, производства России, Беларуси, Испании, Китая и Кореи.

### Задания

1. Заполните таблицу 14. Охарактеризуйте преимущества и недостатки разных видов вакцин, использующихся для специфической иммунопрофилактики.
- 2.

Таблица 14 – Характеристика вакцин

	Живые	Убитые	Химические	Анатоксины	Рекомбинантные
Содержат					
Получены путем					
Применяются для					
Примеры					

2. Используя вводные пояснения и дополнительную литературу, заполните таблицу 15.

Таблица 15 – Особенности иммунитета в зависимости от вида инфекции

Вид иммунитета	Основные факторы защиты	Дополнительные факторы защиты	Преобладающий тип (клеточный или гуморальный)	Оценка напряженности
Антибактериальный				
Противовирусный				
Противогрибковый				
Антипротозойный				
Антигельминтный				

3. Используя вводные пояснения и дополнительную литературу, заполните таблицу 16.

Таблица 16 – Характеристика некоторых иммунных препаратов

Название препарата	Состав	Спектр активности	Применение

4. Используя рисунки 15, зарисуйте схему кооперации клеток иммунитета.

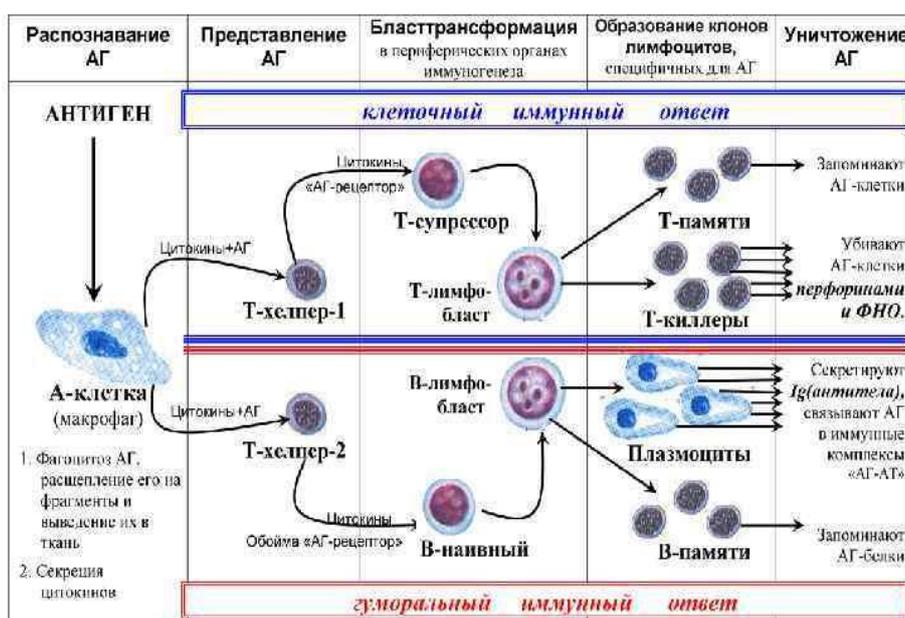


Рисунок 15 – Кооперация лимфоцитов в иммунном ответе

## Контрольные вопросы

1. Как осуществляется взаимодействие между клеточными и гуморальными факторами иммунитета?
2. Как формируется иммунный ответ на проникновение антигена и, какова роль клеток памяти?
3. Что такое иммунологическая толерантность и почему она возникает?
4. Что понимают под термином специфическая профилактика заболеваний?
5. В чем особенности формирования иммунного ответа на разные виды возбудителей?
6. Какие иммунные препараты вам известны, на чем основан принцип их действия?

## Патологии иммунной системы и их диагностика

### Вводные пояснения

При генетических нарушениях, а также изменениях в иммунной системе под влиянием экзогенных и эндогенных неблагоприятных факторов иммунная система может работать против самого организма, то есть развивается иммунопатология. Среди различных видов иммунопатологии наиболее часто встречаются иммунные дефициты, аутоиммунные, аллергические болезни, а также гипериммунные и пролиферативные болезни (избыточно активные иммунные состояния и пролиферативные заболевания иммунной системы).

*Иммунные дефициты* характеризуются тем, что организм не в состоянии реагировать полноценным иммунным ответом на чужеродные антигены. Они подразделяются на врожденные (первичные), возрастные (физиологические) и приобретенные (вторичные).

У сельскохозяйственных животных наиболее часто встречаются возрастные и приобретенные иммунные дефициты. В зависимости от того, какого компонента иммунной системы не хватает или он слабо активен, иммунные дефициты делят на следующие виды: недостаточность клеточного иммунитета (Т-системы лимфоцитов); недостаточность гуморального иммунитета (В-системы лимфоцитов); недостаточность системы фагоцитов (макро- и микрофагов); недостаточность системы комплемента; комбинированная иммунная недостаточность.

На фоне иммунной недостаточности могут появляться желудочно-кишечные, респираторные, септические, кожные и аутоиммунные болезни, а также может увеличиваться возможность появления опухолей.

Врожденные иммунные дефициты возникают вследствие генетически обусловленной неспособности организма животного реализовать иммунный ответ.

Приобретенные иммунные дефициты развиваются при нарушениях в кормлении, тяжелых заболеваниях органов пищеварения, выделения, дыхания, кожи, радиоактивном облучении, длительном воздействии лекарственных веществ (иммунодепрессантов, антибиотиков, сульфаниламидов, нитрофуранов и др.), обширной хирургической травме, лейкозах, доброкачественных опухолях, многих инвазиях и инфекциях. Способствует развитию иммунной недостаточности дефицит в рационах белков, незаменимых аминокислот, витаминов А, Е, С и группы В, микроэлементов: железа, меди, кобальта, цинка, селена, йода и др.

Возрастные иммунные дефициты чаще встречаются в раннем и старческом возрасте. Иммунная недостаточность у новорожденного молодняка возникает при дефиците в молозиве лейкоцитов и иммуноглобулинов, несвоевременном его поступлении, нарушении усвоения защитных факторов молозива при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. На 2-3-й неделе жизни у молодняка может развиваться возрастной иммунный дефицит, обусловленный повышенным расходом колостральных защитных факторов и недостаточностью собственного иммунопоэза. При хороших условиях кормления и содержания этот дефицит слабо выражен и может быть сдвинут на более позднее время. Третий возрастной иммунный дефицит возникает в период отъема при резком переводе молодняка на дефинитивный (обычный) корм. Вследствие кормового стресса истощаются механизмы местной и общей защиты, нарушается образование секреторного иммуноглобулина А. Ведущим в развитии возрастных иммунных дефицитов является недостаточность гуморального иммунитета.

Развитие иммунной недостаточности у старых животных связано с износом иммунной системы. Раньше возникает клеточная и несколько позже гуморальная иммунная недостаточность.

Общим клиническим проявлением всех иммунных дефицитов являются частые рецидивирующие инфекции, обусловленные ба-

нальной, условно-патогенной и патогенной микрофлорой, а также высокая предрасположенность к аутоиммунным болезням и злокачественным новообразованиям. При этом следует учитывать, что при недостаточности гуморального иммунитета и фагоцитарной системы наиболее часто отмечаются токсикозы и бактериальные инфекции, а при дефектах клеточного иммунитета – заболевания вирусной и грибковой этиологии.

Диагностика проводится комплексно и основана на тщательном анализе анамнестических и клинических данных, патоморфологических, цитологических и иммунологических изменений в тимусе, костном мозге, лимфоузлах, селезенке, других лимфоидных образованиях и крови.

Лечение животных с врожденным иммунным дефицитом малоэффективно и экономически нецелесообразно. Для лечения у молодняка возрастных иммунных дефицитов, имеющих преимущественно гуморальную направленность, наиболее широко используют заместительную иммунотерапию препаратами крови и молозива. Применяют иммуноглобулин неспецифический, лактоиммуноглобулины, специфические иммунные сыворотки против энтеропатогенной микрофлоры, которые первые 2~3 дня жизни целесообразно выпаивать в дозе 2-4 мл/кг массы. В этот период они способны проникать через слизистую оболочку в неизменном виде. В более поздние сроки вводят подкожно или внутримышечно в дозе 0,5-0,1 мл/кг. С этой целью назначают цельную кровь и лейкоцитарную плазму в дозах 0,5-1,0 мл/кг, которые инъецируют 2-3-кратно.

Для лечения и профилактики возрастных и приобретенных иммунных дефицитов гуморального типа у животных применяют иммуностимулирующую терапию. С этой целью используют внутримышечно липополисахариды бактерий (продигиозан, пирогенал и др.), вводят их 3-5-кратно с интервалом 3-5 дней в возрастающих дозах, начиная с 0,25 мл 0,005 %-го раствора, а также полисахарид сальмопул 0,1-0,2 мл/кг парентерально двукратно с интервалом 5-7 дней. С целью повышения местной защиты пищеварительного тракта задают внутрь 3-5-кратно лактобактерии, бифидумбактерин, энтеробифидин, бактрил и другие препараты из полезных микроорганизмов.

Выраженный стимулирующий эффект оказывают витамины А, Е, С и В12, незаменимые аминокислоты, железо, медь, кобальт, цинк, селен и йод. В промышленном животноводстве применяют их групповым способом с кормом. При наличии у животных желудочно-

кишечных заболеваний витамины вводят парентерально.

В последнее время в качестве адаптивной иммунорегулирующей терапии при врожденных, возрастных и приобретенных иммунных дефицитах назначают цитомедины тимуса (Т-активин, тимолин, тимозин, тимоген), костного мозга (В-активин), комбинированный препарат тимогемин и др. Препараты тимуса и костного мозга вводят парентерально в течение 3-5 дней подряд. При возрастных и приобретенных иммунных дефицитах с этой целью применяют гомогенат тимуса в дозе 0,2 мл/кг. Повторное введение делают через 10-14 дней. Вместе с тем следует учитывать, что многократное введение гомогенатов тимуса и других органов опасно, так как после второй инъекции у многих животных развиваются аутоиммунные реакции, обуславливающие повреждение соответствующих систем.

Для стимуляции клеточного иммунитета можно назначать левомизол (декарис) в дозе 1,0-1,5 мг/кг 3 дня подряд с перерывом 3-5 суток в течение 2-3 недель. Нередко его дают в комплексе с димексидом.

При тяжелых формах иммунодефицитов, особенно для стимуляции противоопухолевой и противовирусной защиты, показано применение медиаторов системы иммунитета – интерферонов (лейкоцитарного, фибробластного и иммунного) и интерлейкинов. В ветеринарии в качестве иммуностимулирующего, а также противоинфекционного и противопаразитарного средства используют ариветин (лекарственная форма рекомбинантного интерлейкина-I бета). Применяют его в виде курса из 3-6 ежедневных подкожных инъекций в дозе 10 мг/кг массы тела. Назначают и с профилактической целью в виде курса из 3-х подкожных инъекций в дозе 5-10 мг/кг массы тела животного через сутки, начиная с первых дней после рождения.

Профилактика дефицитов включает организационно-хозяйственные, зоотехнические и ветеринарные мероприятия. К ним относятся обеспечение маточного поголовья и растущего молодняка полноценным рационом, создание оптимальных условий содержания, снижение стрессовых воздействий, связанных с технологией производства.

*Аутоиммунные болезни* обусловлены атаками иммунной системы на органы и ткани собственного организма, в результате которых происходят их структурно-функциональное повреждение.

Они могут быть первичными и вторичными. Чаще встречаются вторичные аутоиммунные болезни, связанные с частичным измене-

нием собственных антигенов под воздействием токсинов, лекарственных веществ, микроорганизмов, паразитов, с денатурацией белков поврежденных клеток, тканей и другими факторами, а также с иммунизацией антигенами микроорганизмов, которые имеют сходные детерминанты с антигенами клеток животных.

Первичные аутоиммунные болезни связаны с нарушением иммунологического гомеостаза и высвобождением аутоантигенов, к которым нет иммунологической толерантности. Поэтому при нарушении биологических барьеров изоляции этих тканей происходит контакт их антигенов с лимфоцитами и развитие иммунного ответа.

Аутоиммунные заболевания могут возникать в результате врожденных или приобретенных нарушений в иммунной системе, сопровождающихся потерей толерантности иммунокомпетентных клеток к собственным антигенам и появлением запрещенных клонов лимфоцитов. Развитие аутоиммунной патологии возможно при нарушениях физиологической изоляции аутоантигенов, к которым отсутствует иммунологическая толерантность: хрусталик глаза, спермин, миелин, нерастворимый коллаген, скрытые детерминанты белков и клеток.

У новорожденного молодняка аутоиммунные заболевания возникают колостральным путем, когда через молозиво больных матерей ему передаются аутоантитела и лимфоциты, сенсibilизированные против антигенов определенных органов. У коров и свиноматок нередко регистрируются аутоиммунные поражения органов пищеварения, обусловленные глубокими нарушениями обмена веществ и кормовыми интоксикациями. Поэтому среди болезней этой группы у телят и поросят наиболее часто встречается диспепсия (диарея) аутоиммунного происхождения.

Характерным признаком аутоиммунных болезней является длительное волнообразное течение заболевания. У новорожденных животных заболевание развивается после приема молозива, содержащего аутоантитела и сенсibilизированные лимфоциты. Кроме того, у больных выявляются клинические симптомы, свойственные повреждению определенного органа или целой системы органов. В крови обнаруживаются циркулирующие аутоантитела и сенсibilизированные лимфоциты. В период обострения болезни можно выявить аутоантигены и иммунные комплексы антиген+антитело. На месте внутрикожного введения антигенов развивается положительная реакция.

Следует отметить, что при иммунопатологии, связанной с глубокими нарушениями белкового, углеводного и жирового обменов

веществ, наиболее выраженные иммунные реакции первоначально отмечаются на антигены печени, поджелудочной железы и значительно слабее кишечника, а при хронических кормовых интоксикациях – на антиген слизистой оболочки желудка, тонкого кишечника и печени. В последующем эти различия сглаживаются.

В пораженных органах отмечаются изменения, характерные для иммунного воспаления. В паренхиме их обнаруживаются дистрофические и атрофические изменения и фиксированные на клетках аутоантитела, в строме – сосудистые расстройства, экссудация и инфильтрация ее макрофагами, лимфоцитами, эозинофилами и нейтрофилами. Среди клеточного инфильтрата часто встречаются плазматические клетки, содержащие аутоантитела. Регионарные лимфатические узлы в состоянии гиперплазии с выраженной плазмоцитарной реакцией.

Диагноз аутоиммунных заболеваний ставится на основании анамнестических данных, клинического проявления болезни, результатов патологоанатомического вскрытия, гематологических, биохимических и специальных иммунологических исследований на обнаружение антигенов, антител, комплексов антиген+антитело и sensibilizированных лимфоцитов.

Решающее значение в прижизненной диагностике аутоиммунных болезней принадлежит обнаружению аутоантител и sensibilizированных лимфоцитов. Для выявления антител применяют реакции иммунной диффузии (РИД), непрямой гемагглютинации (РНГА), связывания комплемента (РСК), иммунофлуоресценции (РИФ), а sensibilizированных лимфоцитов – внутрикожную аллергическую пробу. В качестве антигенов используют фильтраты, полученные из гомогенатов органов здоровых животных. Наличие полос преципитации в РИД, агглютинации эритроцитов в разведении 1:32 и выше в РИГА, задержка гемолиза эритроцитов в титре 1:50 и выше в РСК, контурное свечение клеток в РИД, увеличение кожной складки на 2 мм и более на введенный антиген при внутрикожной пробе подтверждают аутоиммунное заболевание.

Эти же реакции можно использовать и для выявления антигенов и иммунных комплексов. Однако обнаружить их более сложно в связи с низкой концентрацией в биологических жидкостях.

При проведении диагностики аутоиммунной патологии необходимо учитывать, что органые антигены в крови, секрете молочных желез и моче обнаруживаются преимущественно при остром течении

и обострении хронического процесса.

При комплексном лечении больного животных с аутоиммунной патологией используют внутримышечно антилимфоцитарную сыворотку и антилимфоцитарный глобулин в дозе 1-2 мл/кг, кортикостероиды: гидрокортизон, кортизон по 0,5-1,0 ИЕ/кг и фолиевую кислоту по 0,1-0,2 мг/кг массы животного.

С учетом особенностей развития патологии и ее осложнений дополнительно назначают необходимое лечение.

В предупреждении колостральной иммунопатологии решающее значение имеет недопущение нарушений обмена веществ и кормовых интоксикаций на завершающем этапе беременности у маточного поголовья. С целью профилактики ее, в частности диспепсии аутоиммунного происхождения, применяют адсорбенты аутоантител и сенсibiliзованных лимфоцитов (порошок кутикулы мышечного желудка птиц, лигнин, порошок печени и др.), щадящий тип кормления, уменьшая норму выпойки молозива в 2-3 раза и добавляя соответствующее количество иммуноглобулинов или цельной крови здоровых животных. Таким животным обязательно назначают витаминные препараты согласно наставлениям. При массовом неблагополучии по этой патологии молодняк сразу же после рождения кормят заменителями молозива, обогащенными иммуноглобулинами, сывороткой или плазмой крови здоровых животных. На крупных фермах и комплексах молодняк от больных матерей нецелесообразно выращивать сразу же после рождения под матерями без указанной патологии.

Ведущее место в предупреждении аутоиммунных заболеваний имеет полноценное, физиологически обоснованное кормление и правильное содержание. Не допускается скармливание некачественных кормов, пораженных грибками, содержащих большое количество нитратов, масляной кислоты и других токсических веществ. Важное место в профилактике этой патологии занимает своевременное, научно обоснованное лечение больных животных с выраженными воспалительными процессами различного происхождения.

*Аллергия* по своей сущности – явление противоположное иммунитету, так как после контакта с антигеном (аллергеном) происходит специфическая сенсibiliзация организма с резко повышенной чувствительностью к повторному воздействию антигена.

Различают две группы аллергических воздействий, обусловленных гиперчувствительностью немедленного типа (ГНТ) и замедленного типа (ГЗТ). Реакции немедленного типа появляются через не-

сколько минут после повторного поступления антигена сенсibilизированному организму, замедленного типа – через несколько часов (16-48) после повторной встречи с аллергеном.

Заболевания, вызываемые аллергенами, имеют широкое распространение. В настоящее время известен широкий круг аллергических болезней, протекающих нередко с летальным исходом.

Сенсibilизирующими антигенами (аллергенами) в первую очередь являются чужеродные белки, а также высокомолекулярные соединения небелковой природы. Чаще всего аллергенами выступает пыльца растений, бытовая пыль, а для животных химические и лекарственные вещества, микробы и их токсины, продукты корма, а также собственные измененные белки. Многие аллергены – слабые антигены или гаптены. Они могут быть экзогенного и эндогенного происхождения.

В развитии аллергических заболеваний участвует пять типов иммунных реакций. Первые три относятся к реакциям немедленного типа, четвертый – к реакциям замедленного типа и пятый наблюдается при большинстве аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Немедленные реакции I типа являются анафилактическими и атопическими. Ведущее значение в их развитии принадлежит антителам класса IgE и в меньшей степени с тучными клетками и другими лейкоцитами. При поступлении в организм аллергена на поверхности этих клеток образуется комплекс антиген+антитело, который вызывает выделение из клеток биологически активных веществ: гистамина, серотонина, брадикинина, простагландинов, лейкотриенов и других факторов, вызывающих патологоанатомические изменения в тканях. Эти медиаторы обуславливают повышение проницаемости, изменение тонуса сосудов, сокращение гладких мышц, что ведет к развитию отека, зуда, падению артериального давления, сокращению гладкой мускулатуры бронхов и других органов.

Аллергические цитохимические немедленные реакции II типа развиваются при взаимодействии антител и комплемента с антигеном (гаптенем), прочно связанным с поверхностью клетки или являющимся составной ее частью. Это можно наблюдать при некоторых формах лекарственной аллергии, когда молекулы медикамента адсорбируются на поверхности клеток крови. Следствием этого может быть гемолитическая анемия, лейкопения, тромбоцитопения, агранулоцитоз. Примером реакций с антигеном собственной клетки являются осложнения при переливании несовместимой крови, когда изоан-

титела соединяются с изоантигеном эритроцитов, а также гемолитические анемии, связанные с адсорбированием аутоантител на эритроцитах.

Следовательно, цитотоксические реакции немедленного типа участвуют в патогенезе лекарственной аллергии, гемотрансфузий и аутоиммунных заболеваний. Непосредственное повреждающее действие в них оказывает активизирующийся комплемент, а также антителозависимые клетки-киллеры.

Аллергические иммунокомплексные реакции III типа обуславливают повреждение отложением иммунных комплексов антиген-антитело. Биологические свойства иммунных комплексов обусловлены во многом соотношением антиген-антитело. Иммунные комплексы, образовавшиеся при избытке антигена, имеют малые и средние размеры и нередко обладают токсическим действием. В то же время крупные иммунные комплексы, образующиеся на основе эквивалентности, не оказывают патологического действия, быстро фагоцитируются и удаляются из организма.

В образовании иммунных комплексов принимают участие иммуноглобулины IgM и IgO, которые связывают комплемент. В местах отложения иммунных комплексов происходит высвобождение биологически активных веществ, которые, повышая проницаемость сосудов и привлекая лейкоциты и тромбоциты, ведут к развитию воспаления и повреждению тканей.

Чаще всего иммунные комплексы в виде микропреципитинов откладываются под базальные мембраны и эндотелий капилляров. Если иммунные комплексы образуются в кровотоке, развивается васкулит, при образовании в тканях развивается реакция Артюса. Этот тип реакции имеет отношение к возникновению хронического полиартрита, аллергического альвеолита, иммунного гломерулонефрита и др.

Аллергические реакции IV типа принимают участие в развитии гиперчувствительности замедленного типа. Запускаются они после взаимодействия сенсibilизированных лимфоцитов со специфическим антигеном, в результате чего выделяются различные медиаторы: митогенные, хемотоксические, лимфотоксические и др. Они привлекают и активизируют другие лейкоциты и вместе с ними формируют клеточный инфильтрат. Этот тип реакции отмечается при туберкулезе, бруцеллезе, сапе, эхинококкозе и других инфекционных и парази-

тарных болезнях, аллергических процессах, при развитии трансплантационного и противоопухолевого иммунитета.

Смешанные аллергические реакции (V тип) включают различные варианты немедленных и замедленных процессов, которые наблюдаются при многих аллергических и аутоиммунных заболеваниях.

Из экзогенных аллергических заболеваний животных, особенно молодняка, встречается кормовая аллергия, обусловленная резким переходом от одного типа кормления к другому; сопровождается поражением желудочно-кишечного тракта и других органов; лекарственная аллергия, проявляющаяся поражением слизистых оболочек, кожи, внутренних органов, системы крови; анафилактический шок и сывороточная болезнь, которые связаны с введением вакцин, сывороток, укусами насекомых, физическими и другими факторами, сопровождаются поражением сердечно-сосудистой системы и других органов, слизистых оболочек и кожи; крапивница и дерматиты, обусловленные химическими и лекарственными веществами, физическими и бытовыми факторами; аллергические заболевания бронхов и легких, вызываемые бактериями, грибами, вирусами, химическими веществами и бытовыми факторами.

Кормовая аллергия – широко распространенное заболевание, особенно молодняка сельскохозяйственных животных. Она характеризуется развитием гиперчувствительности немедленного и реже замедленного типов, сопровождающейся поражением пищеварительной системы, сосудов, кожи и других органов. Заболевание встречается у всех видов молодняка, но наиболее часто у поросят после отъема.

Основными причинами кормовой аллергии являются избыток в рационе белка и гликопротеидов (концентраты, заменители молока с соей), к которым не адаптирована пищеварительная система молодняка; наличие в корме необычных для организма животных химических веществ, лекарственных препаратов, грибков и микроорганизмов.

При желудочно-кишечной форме аллергии у больных животных внезапно появляются абдоминальные боли, тошнота, рвота. Вследствие нарушения моторной и всасывательной функций развиваются поносы и запоры. Нередко появляется налет на языке. При кожной форме появляются отеки и сыпи и очаговое эритемное воспаление

кожи. Кроме того, может отмечаться и смешанное течение, проявляющееся симптомами гастроэнтерита и поражения кожи. В крови больных увеличивается количество эозинофилов, лимфоцитов, а также иммуноглобулинов, особенно IgE.

Лечение, прежде всего, предусматривает устранение причины аллергии. Больным животным назначают диетическое кормление и поддерживающую терапию. В начальный период при остром течении заболевания применяют внутримышечно антигистаминные препараты дипразин (пипольфен) 2-3 м/кг в виде 2,5%-го раствора, димедрол 2-3 мг/кг в 1%-м растворе, кортикостероиды: гидрокортизон и кортизон по 0,5-1,0 ИЕ/кг массы животного 2-3 раза в день, а также хлорид и глюконат кальция в принятых дозах.

Для повышения защиты и усиления регенерации поврежденных органов пищеварения назначают витамины А, Е, С и группы В.

Профилактика кормовых аллергий основана на соблюдении режима кормления, постепенном переходе от одного типа рациона к другому, недопущении скармливания недоброкачественного корма, пораженного грибами, содержащего повышенное количество удобрений, ядохимикатов, антибиотиков и других лекарственных препаратов. Поросят-сосунов нужно заблаговременно до отъема приучать к поеданию концентрированного корма, а телят – к заменителям цельного молока, особенно если основу их составляет соя.

Аллергические реакции на лекарственные вещества довольно частое, но слабо изученное у животных явление. Они возникают вследствие взаимодействия лекарственного препарата с антителами или сенсibilизированными лимфоцитами после предшествующего периода сенсibilизации. У молодняка сельскохозяйственных животных аллергия нередко отмечается после повторных курсов обработок одними и теми же препаратами.

*Гипериммунные и пролиферативные болезни* характеризуются неограниченным размножением клеток кроветворной и иммунной систем. Классификация этих заболеваний представляет определенные трудности. В основу ее положен клинико-морфологический критерий и иммунологические особенности лимфопролиферативных болезней. Среди них выделяют гиперлейкоцитозы, гипериммуноглобулинемии, лимфогрануломатоз, хронический лимфолейкоз, множественную миелому (плазмоцитому), макроглобулинемию и болезнь тяжелых цепей.

Этиология этих болезней изучена слабо. Считают, что основными причинами являются необычное действие на организм физических факторов (радиации), химических канцерогенов и биологических факторов (чаще вирусов).

Клиника зависит от вида иммуноактивного состояния и пролиферативных болезней. Гиперлейкоцитозы сопровождаются резким и длительным увеличением лейкоцитов в крови у большинства животных за счет нейтрофилов, а у крупного рогатого скота за счет лимфоцитов.

Кроме того, несмотря на высокое содержание лейкоцитов, отмечаются частые рецидивирующие инфекции. Гипериммуноглобулинемии свойственны стойкое увеличение иммуноглобулинов вследствие образования и отложения комплексов антиген+антитело, развивается иммунное воспаление, чаще всего в клубочках почек.

Лимфогрануломатоз проявляется недостаточностью клеточного иммунитета. Наблюдается злокачественное перерождение Т-лимфоцитов и неопластическая трансформация ретикулярных клеток. Одновременно в крови уменьшается содержание иммуноглобулинов. На фоне клеточной и слабее выраженной гуморальной иммунной недостаточности у животных часто возникают заболевания, обусловленные условно-патогенными микроорганизмами, проявляющиеся желудочно-кишечным, респираторным, кожным и септическими синдромами.

Лимфолейкоз характеризуется постепенным накоплением преимущественно малых, долгоживущих лимфоцитов в крови, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке и других тканях. Хронический лимфолейкоз связан с неконтролируемым размножением В-лимфоцитов, на поверхности которых находятся моноклональные иммуноглобулины М. Реже бывает острый Т-клеточный лейкоз. Множественная миелома (плазмоцитомы) клинически проявляется парапротеинемией, связанной с бурным размножением плазматических клеток, а также поражениями костной ткани плазматическими клетками и как следствие этого изменение скелета (остеопороз, спонтанные переломы).

Решающее значение в диагностике и дифференциальной диагностике пролиферативных заболеваний и связанных с ними иммунопатологических состояний имеют цитологические, иммунобиохимические исследования крови и пунктатов кроветворно-лимфоидных

органов, а также патоморфологические исследования в случае падежа или убоя животных.

Лечение малоэффективно и экономически нецелесообразно. С целью регуляции иммунного ответа и пролиферативных процессов, особенно ценным животным, применяют иммуномодуляторы и иммунодепрессоры с учетом диагноза и инструкций по их применению.

Основой предупреждения иммунопролиферативных болезней и иммунопатологических состояний является соблюдение правил кормления, содержания, эксплуатации животных. Важное значение имеет научно обоснованное применение лекарственных, биологических препаратов и физических средств

### Задания

1. Используя вводные пояснения и дополнительную литературу, заполните таблицу 17.

*Таблица 17 – Характеристика иммунопатологий*

Иммунопатология	Разновидности	Этиология	Патогенез	Профилактика и лечение
Иммунодефициты	Врожденные (первичные)			
	Возрастные (физиологические)			
	Приобретенные (вторичные)			

2. Подготовьте и сделайте доклады по иммунопатологическим состояниям у разных видов животных.

3. Используя вводные пояснения и дополнительную литературу, обобщите методы диагностики патологий иммунной системы и заполните таблицу 18.

*Таблица 18 – Диагностика иммунопатологий*

Иммунопатология	Разновидности	Характерные отклонения от нормы	Методы исследования

4. Изучите осложнения, которые могут возникать у животных при вакцинации и заполните таблицу 19.

*Таблица 19 – Осложнения при вакцинации*

Вид вакцины	Осложнения	Профилактика

### **Контрольные вопросы**

1. Какие иммунопатологии встречаются у животных?
2. Чем обусловлены приобретенные иммунодефициты у животных?
3. Какие возрастные иммунодефициты характерны для разных видов животных?
4. Что такое аллергии и как их классифицируют?
5. Чем могут быть обусловлены аутоиммунные заболевания и, в чем состоит их профилактика и лечение у животных?
6. Какие препараты относят к иммуномодуляторам и почему?
7. Какие диагностические исследования используют для выявления иммунопатологий?

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

### Варианты практических заданий

1. Рассчитайте показатели фагоцитоза, если установлено, что из 85 способных к фагоцитозу клеток хотя бы 1 микробную клетку поглотили 57. Общее число поглощенных микробных клеток 162.
2. Вставьте пропущенные термины: Препараты, содержащие антитела, называют \_\_\_\_\_, они подразделяются на \_\_\_\_\_ (перечислите несколько названий).
3. Перечислите классы иммуноглобулинов, встречающиеся у животных и человека.
4. Что такое комплемент? Перечислите пути активации комплемента.
5. Что такое иммунобласт, как он образуется? О чем свидетельствует наличие бластных клеток в мазках крови?
6. В чем суть метода розеткообразования? Для чего он используется?
7. Кто ввел термин гаптены и что он обозначает?
8. Какие клинические признаки могут свидетельствовать о наличии у пациента иммунодефицитного состояния и какие исследования нужно назначить?
9. Что такое моноклональные антитела и для чего они используются?
10. Какие факторы нужно учитывать при планировании проведения вакцинации? Перечислите подходы к классификации вакцин.
11. Рассчитайте показатели фагоцитоза, если установлено, что из 115 способных к фагоцитозу клеток хотя бы 1 микробную клетку поглотили 77. Общее число поглощенных микробных клеток 180.
12. Вставьте пропущенные термины: Препараты, содержащие антигены, называют \_\_\_\_\_, они подразделяются на \_\_\_\_\_ (перечислите несколько названий).
13. Перечислите название белковых цепей, входящих в состав иммуноглобулинов, и название участков этих цепей с выполняемыми ими функциями.
14. В чем заключается различие между первичным и вторичным иммунными ответами?
15. Опишите суть реакции по Манчини. Что можно определить с ее помощью?

16. С помощью какого метода можно определить активность комплимента? В чем суть и принцип метода?
17. Кто открыл феномен «опсонизации» и, что он обозначает?
18. Какие клинические признаки могут свидетельствовать о наличии у пациента аллергии и какие исследования нужно назначить?
19. Какие исследования позволяют оценить функциональное состояние Т-лимфоцитов?
20. Какие показатели необходимы для оценки антителообразования?

### Тестовые задания

1. Центральным органом иммунной системы является:
  - А. тимус; Б. миндалины; В. аппендикулярный отросток; Г. селезенка; Д. лимфатический узел; Е. красный костный мозг.
2. Главной клеткой иммунной системы является.
  - А. макрофаг; Б. полипотентная стволовая клетка; В. дендритная клетка; Г. лимфоцит; Д. тимоцит
3. Аналог бursы Фабрициуса у человека:
  - А. печень; Б. тимус; В. костный мозг; Г. селезенка; Д. лимфатический узел
4. Антигенраспознающие рецепторы на своих мембранах имеют:
  - А. Т-лимфоциты; Б. макрофаги; В. НК-клетки; Г. эритроциты; Д. В-лимфоциты
5. Молекулы HLA-II класса обнаруживаются на мембранах:
  - А. дендритных клеток; Б. Т-лимфоцитов; В. В-лимфоцитов; Г. макрофагов; Д. нейтрофилов
6. Объектом распознавания для антиген распознающего рецептора Tc (CD8)- лимфоцита:
  - А. антиген чужеродный; Б. MHC-II; В. комплекс MHC-I с антигеном; Г. комплекс MHC-II с антигеном; Д. MHC-I
7. Для В-лимфоцитов конечным этапом дифференцировки является:
  - А. пре-В-лимфоцит; Б. плазматическая клетка; В. полипотентная клетка; Г. поздняя про-В-клетка; Д. незрелая В-клетка
8. Какие мембранные маркеры характерны для следующих клеток?
  1. Регуляторные Т-лимфоциты - ?
  2. Цитотоксические Т-лимфоциты - ?
  3. В-лимфоциты - ?
9. Перечислите важнейшие функции макрофагов:
  - А. синтез монокинов; Б. фагоцитоз; В. процессинг антигенов; Г. син-

тез ферментов; Д. выработка иммуноглобулинов

10. Th2-лимфоциты продуцируют:

А. ИЛ-2, у-ИФН, лимфотоксин; Б. ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10; В. ИЛ-1; Г. гистамин;

Д. иммуноглобулины

11. Th2-лимфоциты участвуют в реакции:

А. гиперчувствительности немедленного типа; Б. гиперчувствительности немедленного и замедленного типа; В. гиперчувствительности замедленного типа; Г. агглютинации; Д. преципитации

12. Назовите основной мембранный маркер Т-хелперов:

А. CD-1; Б. CD-4; В. CD-5; Г. CD-19; Д. CD-20

13. Мишенями для естественных киллеров являются

А. грамположительные микробы; Б. аллергены; В. трансформированные (инфицированные вирусом, опухолевые) и быстро пролиферирующие клетки; Г. В-лимфоциты; Д. Т-лимфоциты

14. В-лимфоциты участвуют в:

А. гуморальном иммунном ответе; Б. клеточном иммунном ответе; В. фагоцитозе; Г. активации системы комплемента; Д. противопаразитарной защите

15. Предшественником макрофага является:

А. моноцит; Б. эритроцит; В. эозинофил; Г. нейтрофил; Д. тимоцит

16. Активированный макрофаг продуцирует:

А. монокины; Б. иммуноглобулины; В. ферменты; Г. гистамин;

Д. гормоны

16. Молекула CD 8 является маркером:

А. НК-клеток; Б. Т-цитотоксических клеток; В. Т-хелперов; Г. базофилов; Д. макрофагов

17. Назовите метод количественного определения В-лимфоцитов:

А. ИФА; В. НСТ-тест; Г. ИФА; Д. методом проточной цитофлюориметрии

18. CD 19 является маркером:

А. зрелых В-лимфоцитов; Б. Т-хелперов; В. нейтрофилов; Г. цитотоксических лимфоцитов; Д. В-лимфоцитов

19. Цитотоксические лимфоциты распознают:

А. комплекс вирусного антигена и антигена МНС класса I; Б. комплекс вирусного антигена и антигена МНС класса II; В. Вирусный антиген; Г. антиген МНС класса I; Д. антиген МНС класса II

20. ИЛ-I продуцируют:

А. Т-лимфоциты; Б. макрофаги; В. В-лимфоциты; Г. эозинофилы; Д.

эритроциты

21. Продуктом иммуноглобулинов заданной специфичности является:

А. базофил; Б. лимфоцит; В. плазматическая клетка; Г. эозинофил; Д. нейтрофил

22. Двойным распознаванием в иммунном ответе называется:

А. распознавание молекулы МНС-II; Б. распознавание МНС-I; В. распознавание молекулы МНС-II и пептида-антигена; Г. распознавание пептида-антигена; Д. распознавание В-лимфоцита и иммуноглобулина

23. Для плазматической клетки характерно:

А. продукция иммуноглобулинов; Б. продукция иммуноглобулинов не зависит от контакта с антигеном; В. в них невозможно переключение классов иммуноглобулинов; Г. на их мембране нет антигенов МНС-II класса; Д. все ответы верны

24. Собственно антиген распознающая часть Т-клеточного рецептора состоит:

А из полипептидных цепей типа  $\alpha$  и  $\beta$ ; Б. из полипептидных цепей типа  $\alpha$ ; В. из полипептидных цепей типа  $\beta$ ; Г. из Ig M; Д. из Ig D

25. Перечислите основные функции макрофагов:

А. синтез иммуноглобулинов; Б. процессинг и представление антигенов иммунокомпетентным клеткам; В. контактный цитоллиз клетки-мишени; Г. участие в фагоцитозе; Д. синтез монокинов

26. Рассчитайте показатели фагоцитоза, если установлено, что из 85 способных к фагоцитозу клеток хотя бы 1 микробную клетку поглотили 57. Общее число поглощенных микробных клеток 162.

27. Вставьте пропущенные термины: Препараты, содержащие антитела называют \_\_\_\_\_, они подразделяются на \_\_\_\_\_ (перечислите несколько названий).

28. Перечислите классы иммуноглобулинов, встречающиеся у животных и человека.

29. Что такое комплемент? Перечислите пути активации комплемента.

30. Что такое иммунобласт, как он образуется? О чем свидетельствует наличие бластных клеток в мазках крови?

31. В чем суть метода розеткообразования? Для чего он используется?

32. Кто ввел термин гаптены и что он обозначает?

33. Какие клинические признаки могут свидетельствовать о наличии у пациента иммунодефицитного состояния и какие исследования нужно назначить?
34. Что такое моноклональные антитела и для чего они используются?
35. Какие факторы нужно учитывать при планировании проведения вакцинации? Перечислите подходы к классификации вакцин.

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ (ГЛОССАРИЙ)

**Агглютинация** – склеивание антителами взвешенных корпускул, несущих антигены.

**Агглютинин** – антитела или антителоподобные структуры, агглютинирующие корпускулярные антигены.

**Агглютиноген** – антиген, с помощью которого происходит реакция агглютинации.

**Антиантитело** – антитело, направленное к антигенным детерминантам другого антитела.

**Антиген** – а) вещество, способное специфически стимулировать иммунокомпетентные клетки с формированием иммунного ответа или толерантности; б) вещество, выявляемое антителами или иммунокомпетентными клетками; в) вещество, используемое для определения силы и направленности реакций гуморального и клеточного иммунитета; г) маркер иммунокомпетентных и других клеток.

**Антигенная детерминанта** – часть молекулы антигена, непосредственно взаимодействующая с иммуноглобулиновыми рецепторами В-лимфоцитов.

**Антигенная презентация** – механизм передачи информации о природе антигена от клеток врождённого иммунитета (или В-лимфоцитов) к Т-хелперам; непосредственно в процессе антигенной презентации принимают участие антиген-распознающий рецептор со стороны Т-лимфоцита и комплекс молекула гистосовместимости II класса – иммуногенный пептид со стороны антиген-презентирующей клетки.

**Антигенная специфичность** – представляет собой уникальное биологическое явление, которое лежит в основе иммунологических взаимодействий в организме

**Антигенность** – способность вещества вызывать иммунную реакцию и специфически взаимодействовать с антителами и сенсibilизированными лимфоцитами. Антигенными свойствами обладают биополимеры белки, их комплексы с углеводами (гликопротеиды), липидами (липопротеиды) нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеиды), а также сложные полисахариды, липополисахариды.

**Антигенпредставляющие клетки** – различные дендритные клетки лимфоидных тканей, клетки Лангерганса в коже и др., представляющие антиген на своей поверхности, что необходимо для активации Т- и В-лимфоцитов.

**Антиген–распознающие рецепторы** – рецепторы лимфоцитов, которые способны специфически взаимодействовать с тем или иным антигеном; они обеспечивают фундаментальное свойство иммунного ответа – специфичность, т.е. направленность исключительно против конкретного антигена.

**Антигены гистосовместимости системы HLA** – биомолекулы во всех ядродержащих клетках, синтез которых контролируется генами.

Антигены корпускулярные – а) антигены, попадающие в организм в виде корпускул (бактерий, вирусов, чужеродных эритроцитов, лейкоцитов, простейших), иммунная реакция против них развивается после поглощения их макрофагами с последующей переработкой и представлением Т-хелперам и В-лимфоцитам.

Антигены растворимые – вантисы, растворимые в воде или жидкостях организма.

Антигены стадиоспецифические – антигены, которые появляются на поверхности клетки на различных стадиях ее дифференцировки.

**Аффинность** – степень сродства между антиген–распознающим рецептором (иммуноглобулином, иммуноглобулиновым рецептором В-лимфоцитов и Т-клеточным антиген–распознающим рецептором) и специфическим к нему лигандом (антигеном).

**Белки теплового шока** (heat shock protein – hsp) – белковые молекулы, появляющиеся на поверхности клеток при экстремальных изменениях среды обитания – повышении температуры, изменении осмотического давления и т.д. Получили название стрессовых белков. Появляются как на клетках хозяина, так и возбудителя, имея при этом порой высокую схожесть (гомологию) по аминокислотным остаткам.

**Большие гранулярные лимфоциты** – содержат в своей цитоплазме гранулы и функционируют как естественные киллеры и К-клетки. Активированные CD8<sup>+</sup> цитотоксические лимфоциты также имеют морфологическую картину больших гранулярных лимфоцитов.

**Валентность антител** – количество Fab–фрагментов, т.е. антигенсвязывающих участков в молекуле антитела; антитела различного класса имеют валентность, кратную 2: IgG – 2, IgA – 4-6, IgM – 10, что обеспечивает создание крупных иммунных комплексов, элиминированных из организма фагоцитами.

**Вариабельный домен** – регион молекулы иммуноглобулина, аминокислотные последовательности которого непостоянны и меня-

ются от одной молекулы иммуноглобулина к другой.

**В-лимфоцит** – популяция лимфоцитов крови, участвуют в выработке гуморальных факторов адаптивного иммунитета – антител.

**Гены иммунного ответа (IR-гены)** – совокупность генов, расположенных в ГКГ, функциональная активность которых суммарно обеспечивает степень иммунного ответа на конкретный антиген у конкретного индивидуума.

**Гистосовместимость** – совместимость по антигенам главного комплекса гистосовместимости, т.н. тканевая совместимость; обозначает способность реципиента воспринять трансплантат от донора. При определении гистосовместимости между донором и реципиентом выявляют их фенотипы по антигенам локусов А, В, С, DR, DP и DQ. Для этой цели используется как серологическое типирование, так и, в последнее время, ДНК-типирование с помощью полимеразной цепной реакции.

**Идиотипическая сеть** – регуляторное сетевое взаимодействие, основанное на том, что антиидиотипические антитела и идиотипы, имеющиеся на иммуноглобулинах и Т-клеточных распознающих рецепторах, взаимодействуют между собой. Таким образом, регулируется выраженность иммунного ответа.

**Изотип** – участок тяжёлой цепи константной зоны антитела, по которому определяют принадлежность этого антитела к определённому классу (M, G, A, E, D).

**Интерлейкины** – факторы гуморального иммунитета (ИЛ):

ИЛ-1 – продуцируется макрофагальными клетками. Известен ранее как эндогенный пироген. Под влиянием ИЛ-1 инициируются важные биологические эффекты. С точки зрения иммунного ответа, ИЛ-1 способствует тому, что Т-лимфоциты-хелперы начинают продуцировать ИЛ-2; одновременно с этим под влиянием ИЛ-1 на Т-лимфоцитах экспрессируется рецептор к ИЛ-2.

ИЛ-10 – супрессорный интерлейкин, продуцируется также, как ИЛ-4 и ИЛ-5, Т-лимфоцитами-хелперами 2-го типа. Является цитокином, подавляющим функционирование Т-лимфоцитов-хелперов 1-го типа.

ИЛ-2 – известен как фактор роста лимфоцитов, т. е. белок, способствующий пролиферации лимфоцитов. Продуцируется Т-лимфоцитами-хелперами 1-го типа.

ИЛ-3 – продуцируется активированными Т-клетками и обладает способностью усиливать пролиферацию всех гемопоэтических кле-

ток.

**ИЛ-4** – продуцируется Т-лимфоцитами хелперами 2-го типа. Основная его роль – усиление развития гуморального иммунного ответа и переключение продукции IgM на продукцию IgG4 или IgE. Таким образом, повышенная выработка ИЛ-4 способствует в свою очередь повышенной продукции IgE.

**ИЛ-5** – эозинофильный фактор. Способствует активации эозинофилов и удлиняет срок их персистенции в очагах эозинофильного воспаления.

**Иммунокомпетентные клетки** – клетки иммунной системы, способные развивать иммунную реакцию на антиген. К ним относятся Т-, В-, О-лимфоциты, НК- и К-клетки, антигенпредставляющие клетки.

**Иммунокорректоры животного происхождения** – (цитомедины, интерлейкины, интерфероны, факторы роста, гормоны /глюкокортикоиды и др).

**Иммуноциты** – клетки, участвующие в иммунном ответе, Т-, В-, О-лимфоциты, макрофаги, антигенпредставляющие клетки (купферовы клетки печени, клетки Лангерганса кожи, клетки нейроглии).

**Интерферон** – группа цитокинов, которые увеличивают резистентность клеток к вирусной инфекции, обладают антипролиферативным эффектом, а также способны регулировать иммунный ответ. Различают три вида интерферонов: а – продуцируемый лейкоцитами; Р – продуцируется фибробластами и у – продуцируемый Т-лимфоцитами-хелперами 1-го типа.

**К-клетка** – одна из популяций лимфоидных клеток, обладающих киллинговым эффектом. Реализует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность. Имеет на своей поверхности рецептор к Fc-фрагменту Ig, но не имеет Т-клеточного распознающего рецептора.

**Комплемента система** – группа сывороточных белков, которые в процессе их активации превращаются в эффекторные молекулы, приводящие к развитию воспаления (C3a, C4a, C5a), фагоцитозу (C3b) и разрушению клеток (C6 – C9). Таким образом, белки комплемента участвуют в развитии воспалительных реакций, реакций опсонизации и лизиса клеточных мембран.

**Лангерганса клетки** – антигенпредставляющие дендритные клетки кожи, которые обладают рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулинов имеют на своей поверхности антигены гистосовместимости

мости класса II и CD

**Лектины** – семейство белков, как правило растительного происхождения, которые связывают специфические сахара на гликопротеинах и гликолипидах. Некоторые лектины, прежде всего фитогемагглютинин и конканавалин А, являются митогенами для Т-лимфоцитов; митоген лаконоса является митогеном для В-лимфоцитов.

**Лизоцим** – антибактериальный фермент, присутствующий в гранулах фагоцитирующих клеток, в слезной жидкости и слюне, который расщепляет пептидогликаны мембраны бактериальной клетки.

**Лимфокины** – цитокины, продуцируемые лимфоцитами.

**Макрофаг** – большая тканевая клетка, удаляющая из организма поврежденные ткани, клетки, бактерии и другие материалы; захваченные и переработанные антигены макрофаг представляет Т- и В-лимфоцитам; из всех клеток, участвующих в иммунном ответе, макрофаги отличаются наиболее выраженной полифункциональностью. Фагоцитирующая клетка, которая происходит из моноцита периферической крови и может функционировать как антигенпредставляющая клетка и клетка, опосредующая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.

**Маркер** – хелперные Т-лимфоциты распознают антиген, который презентруется молекулами гистосовместимости класса

**Маркеры** – характерный признак биомолекул, на основе маркеров построена идентификация клеток, например, маркерами Т-лимфоцитов являются рецепторы к эритроцитам барана и гемагглютинину, дифференцированный антиген CD4 – маркер Т-хелперов, CD8 – Т-супрессоров, CD19 и CD20 – маркеры В-лимфоцитов.

**Мембраноатакующий комплекс** – комплекс поздних компонентов комплемента C5b–C9, который обладает способностью образовывать поры в мембране клеток-мишеней, что в конечном итоге приводит к лизису клеток.

**Миелоидная стволовая клетка** – (колоннеобразующая единица гранулоцитов–эритроцитов–моноцитов–мегакариоцитов) – предшественник всех нелимфоидных линий: гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, мегакариоцитов

**Мимикрия (подобие)** – одна из многих причин развития аутоиммунных процессов. Доказано, что некоторые инфекционные возбудители имеют структуры (эпитопы), подобные антигенным детерминантам тканей хозяина. Образовавшиеся после иммунного ответа

антитела и цитотоксические Т-лимфоциты за счет перекрестных реакций могут повреждать собственные ткани.

**Монокины** – цитокины, синтезируемые макрофагами–моноцитами и принимающие участие в регуляции, активации, пролиферации и дифференцировке Т- и В-клеток и других типов лимфоцитов.

**Натуральные киллеры** – лимфоцитоподобные клетки, лишенные признаков Т- и В-лимфоцитов; способны уничтожать опухолевые клетки и клетки, инфицированные вирусами.

**Плазматическая клетка** – конечный этап антигенной дифференцировки В-лимфоцитов; активно секретирует большое количество антител.

**Поликлональная активация** – одновременная стимуляция большого количества лимфоцитов с образованием сразу многих клонов; вызывают растительные лактины, такие как конкавалин А, фитогемагглютинин, получившие название митогенов, так как первым проявлением активации является митоз

**Полипотентная стволовая клетка** – стволовая клетка костного мозга, существование которой доказано, но морфология ее недостаточно изучена

**Представление** – для реализации иммунного ответа макрофаг должен в особой форме представить антиген Т- и В-лимфоцитам; пример кооперации естественного и адаптивного механизмов защиты

**Распознавания антигена** – Реализуется с помощью так называемых костимуляционных молекул: например, для пары "макрофаг – Т-хелпер" – это CD80, 86–CD28, соответственно; для пары "Т-хелпер – В-лимфоцит" – это CD4 лиганд – CD40, соответственно. Таким образом, макрофаг дает костимуляционный сигнал Т-хелперу, а Т-хелпер – В-лимфоциту. В случае отсутствия такого сигнала наступает анергия клетки либо развивается апоптоз.

**Розетка** – частицы или клетки, прикрепляющиеся к поверхности лимфоцита и образующие вместе с ним характерную фигуру розетки, например, эритроциты барана вокруг человеческих Т-лимфоцитов.

**Т-лимфоциты–хелперы (CD4+ клетки)** – субпопуляция Т-лимфоцитов, которая оказывает помощь в реализации специфического иммунного ответа по гуморальному либо клеточному пути. В настоящее время различают Т-лимфоциты–хелперы 1–го и 2–го типа. Т-лимфоциты–хелперы 1–го типа участвуют и оказывают помощь в развитии Т-клеточных иммунных реакций, продуцируя ИЛ-2, гамма–

интерферон, ОНФа; Т-лимфоциты хелперы 2-го типа участвуют в реализации гуморальных реакций, продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13. Кроме того, продуцируя ИЛ-10, они способны подавлять функцию Т-лимфоцитов-хелперов 1-го типа. Такую же супрессорную функцию по отношению к Т-хелперам 2-го типа осуществляет гамма-интерферон. На поверхности Т-лимфоцитов-хелперов находится CD4

**Т-супрессоры** – субпопуляция Т-лимфоцитов рецептором CD8, осуществляют регуляцию ГЗТ, пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов и В-клеток. Разновидность Т-лимфоцитов, препятствующих (подавляющих) синтез антител (to suppress – англ. – "подавлять, пресекать, сдерживать, запрещать").

**Тучная клетка** – большая тканевая клетка, сходная с базофилом по морфологии и функции; ее гранулы содержат гистамин и вазоактивные амины; при повреждении тканей быстро инициирует воспалительный процесс; под влиянием антител выделяет эти медиаторы воспалительных процессов, повышающих проницаемость сосудов, чем обеспечивается проникновение комплемента и иммунокомпетентных клеток из кровотока в ткани.

Участок вариабельный (V) – антигенсвязывающий участок антител – терминальный отрезок H- и L-цепей, последовательность и петлеобразование аминокислот в Fab-фрагменте образует полость, которая способна распознать и специфически соединиться с антигеном.

Участок комплементсвязывающий – в Fc-фрагменте антитела расположен участок, к которому присоединяется комплемент.

**Хелперные факторы** – молекулы, продуцируемые Т-лимфоцитами хелперами, способствующие развитию иммунного ответа.

**Цепь легкая (L-цепь)** – часть антитела белковой природы, включает два домена – вариабельный (V) и константный (C), вариабельный имеет три гипервариабельные зоны, обеспечивающие контакт с антигеном.

**Цепь тяжелая (H-цепь)** – длинная гликопротеиновая цепь молекулы иммуноглобулина.

**Цитокины** – обширное семейство биологически активных пептидов, оказывающих гормоноподобное действие и обеспечивающих взаимодействие клеток иммунной, кроветворной, нервной и эндокринной систем. В зависимости от клеток, их синтезирующих, цитокины подразделяются на интерлейкины, монокины и лимокины.

**Цитотоксические Т-лимфоциты** – главные клетки противовирусного иммунитета, уничтожая инфицированную вирусом клетку–мишень, предотвращают репликацию вируса; они также обеспечивают отторжение чужеродного трансплантата; функцию осуществляют в комплексе с антигенами МНС.

**Шарнирная область** – участок аминокислот между Fab- и Fc-регионами иммуноглобулинов, который позволяет молекуле иммуноглобулинов быть подвижной при ее контакте с антигеном, благодаря чему обеспечивается более прочное связывание иммуноглобулиновой молекулы с антигеном.

**Эпитоп** – участок антигена (антигенная детерминанта), который распознается антигенраспознающим рецептором с последующим развитием специфического иммунного ответа.

## Принятые обозначения и сокращения

**CD антигены** – кластеры дифференцирования; так обозначены все мембранные молекулы лейкоцитов, характеризующие тип клетки, её функциональное состояние, принимающие участие в реализации межклеточных контактов и выполняющие другие функции.

**CD3**–комплекс, состоящий из  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ -цепей, который представляет собой неотъемлемую часть антигенраспознающего T-клеточного рецептора. Необходим для передачи (трансдукции) сигнала после связывания с антигеном в ядро T-клетки.

**CD4**–гликопротеин, – имеющийся на поверхности T-лимфоцитов хелперов, который распознает молекулы ГКГ класса II на антигенпредставляющих клетках.

**CD4**–корцептор, – взаимодействующий с молекулой главного комплекса гистосовместимости класса II; экспрессирован на T-хелперах, взаимодействует с B-лимфоцитами и макрофагами

**CD8** – гликопротеин, – имеющийся на поверхности цитотоксических T-лимфоцитов; распознает молекулы ГКГ класса I на клетках–мишенях.

**CDR** – гипервариабельный участок – антиген–распознающего рецептора; часть вариабельного (изменчивого) участка молекулы антитела или T-клеточного антиген–распознающего рецептора, которая непосредственно связывается с антигеном.

**CD8** – молекула – на поверхности цитотоксических T-лимфоцитов; распознает молекулу главного комплекса гистосовместимости класса I, что необходимо для уничтожения цитотоксическим T-лимфоцитом инфицированных вирусом клеток.

**Fab-фрагмент** (антигенсвязывающий) – фрагмент иммуноглобулинов, который связывает антиген. У IgG имеются два Fab-фрагмента, которые содержат обе легкие цепи, и N-концевые части обеих тяжелых цепей, связанных между собой дисульфидными мостиками. Fab-фрагменты определяют валентность иммуноглобулинов, т. е. то количество антигена, которое может связать данный конкретный иммуноглобулин.

**HLA** (human leukocyte antigens) – главный комплекс гистосовместимости (ГКГ) человека.

**HLA-рестрикция** (ограничение) – по антигенам ГКГ иммунологический феномен, заключающийся в том, что T-клетки распознают процессированный чужеродный антиген только в том случае, если

он презентуется собственными (аутологичными) HLA-молекулами.

**МАТ** – (мышинные антитела) для ИФА, иммуноблоттинга, ИФМ и пр. серологических реакций.

**МНС** (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости (ГКГ) – генный комплекс, расположенный на коротком плече 6-й хромосомы, который кодирует молекулы белков и отвечает за распознавание «своего», т.е. собственных клеток организма.

**Toll-like рецепторы** – это шаблон-распознающие рецепторы антиген-презентирующих клеток, которые способны специфически взаимодействовать с некоторыми консервативными молекулами микроорганизмов и снабжать тем самым клетку–носитель дополнительным, но принципиально важным сигналом к активации и дальнейшей антигенной презентации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дьячкова, С.Я. Иммунология: учебное пособие для вузов / С.Я. Дьячкова. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2022. – 168 с. – ISBN 978-5-8114-9986-1. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/208682>

2. Иммунология : учебное пособие / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, Р.Х. Равилов [и др.]. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург : Лань, 2022. – 188 с. – ISBN 978-5-8114-2593-8. – Текст: электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/212744>

3. Иммунология: методические указания / Петряков В.В. – Кинель : РИО СамГАУ, 2019 . – 26 с. – URL: <https://rucont.ru/efd/684486>

4. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Ч. 2. Иммунология: учебник / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – Москва : КолосС, 2007. – 224 с.

5. Клиническая иммунология и аллергология [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие / под ред. В. В. Климова. – Томск, 2008. – 173 с. – URL: <http://freeref.ru/wievjob.php?id=439073>

6. Магер, С.Н. Физиология иммунной системы [Электронный ресурс]: учеб. пособие / С.Н. Магер. Е.С. Дементьева. – Санкт-Петербург: Лань, 2014. – 192 с. – URL: [http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1\\_id=51937](http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=51937)

7. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник /Под. Ред. Проф. И.П. Кондрахина. – Москва: Колос С, 2004. – 492 с.

8. Мечников, И.И. Иммунология. Избранные работы / И.И. Мечников. – Москва: Издательство Юрайт, 2020. – 274 с. – ISBN 978-5-534-12700-3. – Текст: электронный // ЭБС Юрайт [сайт]. – URL: <https://urait.ru/bcode/448138>

9. Песнякевич, А.Г. Иммунология: учебное пособие / А.Г. Песнякевич. – Минск: БГУ, 2018. – 255 с. – ISBN 978-

985-566-628-9. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/180421>

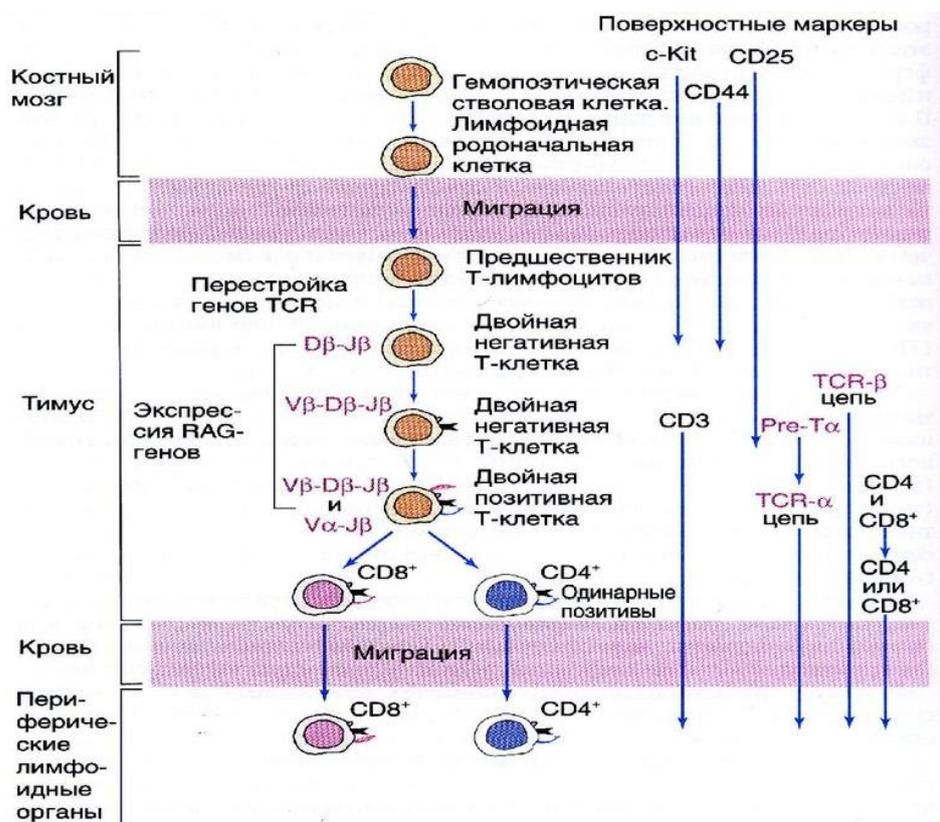
10. Потемкина, Е.Е., Пособие по лабораторной клинической иммунологии. / Е.Е Потемкина, Р.З. Позднякова, Л.М. Манукян – Москва: Изд-во РУДН, 2003. – 230 с.

11. Теоретическая и практическая иммунология: учеб. пособие / М.Ш. Азаев [и др.]. – Санкт-Петербург: Лань, 2015. – 320 с. URL: <https://e.lanbook.com/book/60033>

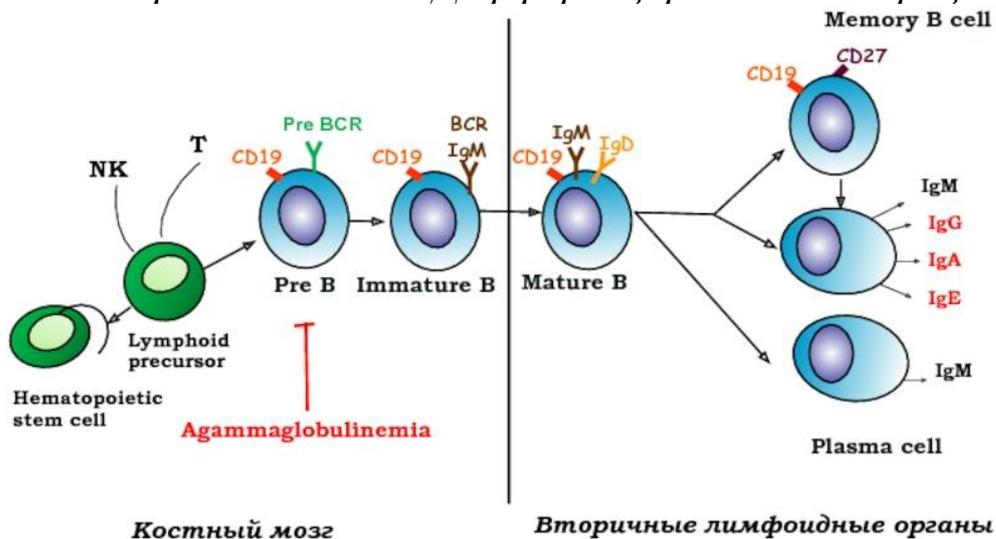
## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Иммунологическая лаборатория и иммунодиагностика.....	6
Иммунная система, её функции и виды иммунитета.....	11
Клетки иммунитета.....	19
Антигены и антитела.....	29
Серологические реакции в иммунологии.....	37
Оценка гуморального иммунитета.....	53
Неспецифические факторы иммунитета.....	57
Фагоцитоз и фагоцитарная активность.....	67
Оценка клеточного иммунитета.....	72
Механизм иммунного ответа.....	80
Патологии иммунной системы и их диагностика.....	88
Задания для самостоятельной работы.....	102
Словарь терминов (Глоссарий).....	107
Принятые обозначения и сокращения.....	115
Литература.....	117
Оглавление.....	119
Приложения.....	120

## Приложение 1 – Дифференцировка T-лимфоцитов



## Приложение 2 – Дифференцировка B-лимфоцитов



*Учебное издание*

Светлана Анатольевна Сашенкова  
Галина Викторовна Ильина  
Дмитрий Юрьевич Ильин

## **ИММУНОЛОГИЯ**

Практикум

Компьютерная верстка С.А. Сашенковой  
Корректор Л.Н. Каменская

Дата подписания к использованию 25.09.2025 Уч.изд.л. 5,4  
№ 14 в реестре электронных ресурсов ПГАУ  
Объем издания 2,03 Мб.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пензенский государственный аграрный университет» 440014, Пенза, ул. Ботаническая, 30 [www.pgau.ru](http://www.pgau.ru)