



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»
(ДФУ)

ШКОЛА ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Согласовано
Руководитель ОП «Биологические
системы: структура, функции,
технологии»

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий кафедрой

(кафедра биохимии, микробиологии и
биотехнологии)


(подпись)
« 12 »

Кирсанова И.А. _____
(Ф.И.О. рук. ОП)
_____ сентября _____ 2018 г.



Костецкий Э.Я.
(Ф.И.О. зав. каф.)
« 12 » сентября _____ 2018 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЫ

Иммуногенетика и основы патологии

Направление подготовки: 06.04.01 Биология

магистерская программа «Биологические системы: структура, функции, технологии»

Форма подготовки: очная

Курс 2, семестр 3

лекции – нет

практические занятия – 36 час.

лабораторные работы - нет

в том числе с использованием МАО пр. 8 час.

в том числе в электронной форме - нет.

всего часов аудиторной нагрузки – 72 час.

в том числе с использованием МАО – 8 час.

в том числе контролируемая самостоятельная работа 36 час.

в том числе в электронной форме - нет.

самостоятельная работа – 72 час.

в том числе на подготовку к экзамену – 36 час.

курсовая работа / курсовой проект - нет

экзамен – 3 семестр

зачет – нет

Рабочая программа составлена в соответствии с требованиями образовательного стандарта, самостоятельно устанавливаемого ДВФУ, утвержденного приказом ректора № 12-13-592 от 04.04.2016 г.;

Рабочая программа обсуждена на заседании кафедры
протокол 1 12 сентября
№ _____

Биохимии, микробиологии и биотехнологии
_____ 2018 г.

Заведующий кафедрой – Э.Я. Костецкий
Составитель: А.В. Цыбульский

Оборотная сторона титульного листа РПУД

I. Рабочая программа пересмотрена на заседании кафедры:

Протокол от «_____» _____ 20__ г. № _____

Заведующий кафедрой _____

(подпись)

(И.О. Фамилия)

II. Рабочая программа пересмотрена на заседании кафедры:

Протокол от «_____» _____ 20__ г. № _____

Заведующий кафедрой _____

(подпись)

(И.О. Фамилия)

ABSTRACT

Master's degree in 06.04.01 «Biology».

Master's Program “Biological systems: structure, function, technology”

Course title: « Immunogenetics and the foundations of pathology»

Variable part of Block, 3 credits

Instructor: Tsybulsky AV

At the beginning of the course a student should be able to: Readiness to perform standard basic procedures for providing individual, group, organization. Readiness to apply the basic knowledge of philosophy, diversity of biological sciences, obtained in the previous level of education.

Learning outcomes: Ability to work in project interdisciplinary teams, including as a leader; ability to free scientific and professional communication in a foreign environment; readiness for communication in oral and written forms in the state language of the Russian Federation and in a foreign language for solving problems of professional activity; readiness to lead a team in the sphere of their professional activity, tolerantly accepting social, ethnic, confessional and cultural differences; ability to use knowledge of the basics of the biosphere theory, understanding of modern biosphere processes for a systematic assessment of geopolitical phenomena and forecasting the consequences of implementing socially significant projects.

Course description:

The teaching materials on the course « Immunogenetics and immunological engineering foundations, molecular and cellular basis of pathology, selected chapters of immunology and immunochemistry» are designed for 1nd year students of the Bachelor's Program in «Master of biology». Full-time program. Language of the program – Russian. The teaching materials are written in Russian.

The contents of the teaching materials on the course are based on modern science and educational practice. This course provides a detailed description of the genetic mechanisms of specialized immunological mechanisms and systems of general physiological regulation providing initiator and regulatory action on immunogenesis (eg, kallikrein - kinin system, the coagulation, acute phase proteins of inflammation and heat shock proteins, prostaglandins, etc.). This approach helps students to understand more precisely the mechanisms of regulation of the immune system at the molecular level. Section discipline dedicated to the basics of modern immunological engineering provides students with knowledge of the technologies of immunologically active

compounds having given immunoregulatory properties that can generate more intelligently targeted - oriented approaches to immunotherapy and vaccine prophylaxis.

Main course literature:

1) Belotsky SM Inflammation. Cell mobilization and clinical effects. M., Bean. 2008. 239 P.

2) Vaccines and vaccination. National leadership. Ed. V.V. Zvereva, B.F. Semenova, R.M. Haitov. M., GEOTAR-Media. 2011. 880 P.

3) Immunology. Workshop. Tutorial. M., GEOTAR-Media. 2012. 176 P.

Form of final knowledge control: exam

Аннотация к рабочей программе дисциплины «Иммуногенетика и основы патологии»

Рабочая программа учебной дисциплины «Иммуногенетика и основы патологии» составлена в соответствии с требованиями образовательного стандарта, самостоятельно разработанного ДВФУ по направлению 06.04.01 Биология, магистерская программа «Биологические системы: структура, функции, технологии». Дисциплина предназначена студентам 2-го курса и реализуется в рамках учебного цикла Б1.В.ДВ – дисциплины, вариативная часть, дисциплины по выбору.

Общая трудоемкость освоения дисциплины составляет 3 зачётные единицы (108 часов). Учебным планом предусмотрены практические занятия (36 часов) и самостоятельная работа (72 часа, в том числе и подготовка к экзамену 45 часов).

Содержание дисциплины направлено на усвоение магистрами системы современных знаний, характеризующих молекулярно-генетические и клеточные механизмы функционирования иммунной системы как ключевой физиологической системы охраны антигенно-структурного гомеостаза и состояния здоровья в целом. Рассматриваются механизмы нарушения функционирования иммунологических механизмов, ассоциированные с развитием воспаления как универсальной ответной реакции на патогенные воздействия инфекционной и неинфекционной природы, а также – роль нарушений иммунологического надзора в патогенезе онкологических заболеваний. Иммунология, как одна из наиболее динамично развивающихся наук, имеет, наряду с фундаментальными аспектами, и очевидное практическое значение. В современных технологиях биотерапии различных патологических состояний человека и животных большое значение имеют различные иммунологически активные препараты (моноклональные антитела, минимальные, химерные и гуманизированные антитела, рекомбинантные препараты цитокинов и др.), получаемые методами генной инженерии. Такие

препараты позволяют таргетно-ориентированно воздействовать на иммунную систему, вызывая изменения ее активности в заданном направлении, т.е. представляют собой инструмент иммунологической инженерии. Технологии получения иммунологически активных препаратов современными биотехнологическими методами представляют собой систему знаний, которую специалистам биологического и биомедицинского профиля необходимо знать. Знания этих технологий и продуктов этих технологий позволит магистрам, прошедшим данный учебный курс, более грамотно ориентироваться в современных биотехнологиях, в методах анализа, связанных с применением продуктов этих технологий, а также окажет позитивную роль в профессиональной ориентации магистров-биологов как будущих ученых и сотрудников биотехнологических производств.

В ходе изучения дисциплины студенты получают теоретические знания о генетических механизмах клеточных и гуморальных реакций неспецифической резистентности и специфического иммунного ответа, а также об основных современных методах иммуногенетического анализа и методах иммунологической инженерии – биотехнологических приемов, основанных на получении и использовании моноклональных и поликлональных антител и их производных, цитокинов и других иммуноактивных препаратов.

Дисциплина «Иммуногенетика и основы патологии» рассматривает генетические механизмы регуляций функций иммунной системы, а также – современные биотехнологические подходы регуляции этих функций и получения различных иммуноактивных препаратов. Учебная программа «Иммуногенетика и основы иммунологической инженерии, молекулярные и клеточные основы патологии, избранные главы иммунологии и иммунохимии» носит междисциплинарный характер: включает иммунохимию, иммунопатологию, иммунологию опухолей, трансплантационную иммунологию. Рассматриваются молекулярные и клеточные механизмы патогенеза различных патологических состояний, связанных с нарушениями процессов клеточной дифференцировки, регуляции клеточной пролиферации,

межклеточного взаимодействия, с нарушениями в структуре поверхностных клеточных рецепторов.

Иммуногенетика является пограничной областью знаний между иммунологией и генетикой. Эта наука занимается изучением следующих вопросов:

А) Генетика тканевой совместимости. Полиморфизм генов тканевой совместимости. HLA-антигены.

Б) Гены иммуноглобулинов: структура, механизмы транскрипции и трансляции генов иммуноглобулинов.

В) Генетические механизмы, обеспечивающие генерацию разнообразия специфичностей антиген-распознающих рецепторов В- и Т-лимфоцитов (BCR и TCR).

Г) Гены и антигены групп крови и резус-фактора.

Д) Генетические механизмы, лежащие в основе предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям и неопластическим процессам (в т.ч., вопросы корреляции различных гаплотипов по генам HLA и предрасположенности к различным заболеваниям).

Е) Генетический контроль иммунологической реактивности (в том числе, механизмов индукции и развития иммунопатологических реакций).

Иммунологическая инженерия базируется на достижениях иммунологии, иммуногенетики и технологий генной инженерии и является технологическим направлением, имеющем целью разработать и внедрить в практику клинической иммунотерапии эффективные, высоко-селективные (таргетно-ориентированные) воздействия на иммунную систему с целью достижения четко-прогнозируемого эффективного клинического эффекта. Достижения иммунологической инженерии могут быть использованы в таких медицинских дисциплинах как клиническая онкология, инфекционные болезни, клиника различных иммунопатологических, аллергических и аутоиммунных заболеваний.

Иммунологическая инженерия имеет как профилактическое, так и терапевтическое направления. В рамках профилактики используются иммуногенетические подходы для конструирования вакцин нового поколения – противoinфекционных и противоопухолевых субъединичных, ДНК-вакцин, синтетических вакцин и препаратов, полученных с использованием метода трансгенеза. В рамках терапевтического направления иммунологической инженерии разрабатываются методы генной и эпигеномной иммунотерапии различных заболеваний.

Дисциплина «Иммуногенетика и основы патологии» логически связана с предшествующими и параллельными курсами обучения студентов: «Цитология», «Молекулярная биология», «Генная инженерия», «Биотехнология», «Молекулярная биотехнология», «Вирусология», «Иммунология», «Микробиология», «Гормоны и цитокины». Совместно с другими дисциплинами магистерского учебного плана такими, как «Клетки, как жидко-кристаллические комплексы, с едиными принципами формирования белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и других органических соединений», «Жидкие кристаллы в живых системах», «Современное представление о структуре клеток, как жидко кристаллическом комплексе, с едиными метаболическими принципами формирования белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и других органических соединений», «Биологическая активность и механизмы действия природных соединений», «Спецглавы физических и химических наук. Термодинамика и биоэнергетика живых систем» и др. формирует у магистров биохимиков общекультурные и профессиональные компетенции и составляет важную часть профессиональной подготовки магистрантов - биохимиков.

Цель освоения дисциплины «Иммуногенетика и основы патологии» - состоит в изучении генетических механизмов индукции факторов неспецифической резистентности и специфического иммунного ответа гуморального и клеточного типа, для чего необходимо знание химического строения основных классов молекул, участвующих в процессе иммунитета

(белков системы комплемента, лизоцима, дефензинов и других факторов неспецифической резистентности, иммуноглобулинов различных изотипов, антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов, различных корецепторных молекул, молекул межклеточной адгезии, цитокинов и их рецепторов, HLA-антигенов и т.п.), знание молекулярного механизма их взаимодействия друг с другом, с иммунокомпетентными и другими типами клеток.

Задачи:

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

- Знать основные молекулярные механизмы специфической и неспецифической защиты макроорганизма от агентов, нарушающих антигенно-структурный гомеостаз организма;

- Знать молекулярный механизм иммунологических феноменов (специфичность антител, синтез и секреция антител, изотипы, аллотипы и идиотипы антител, механизмы переключения синтеза антител разных классов, реакции антиген-специфической и антиген-неспецифической клеточной цитотоксичности, иммунохимические феномены различных стадий фагоцитоза, механизмы активации системы комплемента, хемотаксис и хемокинез иммунокомпетентных клеток, процессинг и презентация антигенов, роль молекул межклеточной адгезии в иммуногенезе и др.);

- Знать современные методы анализа реакций специфического иммунитета и неспецифической резистентности;

- Знать современные технологии получения препаратов поликлональных и моноклональных антител, рекомбинантных иммуноактивных препаратов (цитокинов);

- Знать современные технологии получения вакцинных препаратов, в том числе – основанных на использовании адъювантов и субъединичных антигенов;

- Уметь планировать иммуногенетический эксперимент для определения генетических механизмов контролч иммунологической реактивности по отношению к различным тест-антигенам, и анализировать его результаты;

- Уметь планировать иммунохимический эксперимент для оценки технологии, перспективной в плане иммунологической инженерии, и анализировать его результаты;

- Владеть методами иммунофенотипирования на основе знания номенклатуры дифференцировочных мембранных CD-антигенов.

Для успешного изучения дисциплины «Иммуногенетика и основы патологии» у обучающихся должны быть сформированы следующие предварительные компетенции:

- способность использовать знание основ учения о биосфере, пониманием современных биосферных процессов для системной оценки геополитических явлений и прогноза последствий реализации социально-значимых проектов

- способность профессионально оформлять, представлять и докладывать результаты научно-исследовательских и производственно-технологических работ по утвержденным формам

- способность творчески использовать в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность (профиль) программы магистратуры

- способность руководить рабочим коллективом, обеспечивать меры производственной безопасности

Планируемые результаты обучения по данной дисциплине (знания, умения, владения), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы, характеризуют этапы формирования следующих компетенций (общекультурные/ общепрофессиональные/ профессиональные компетенции (элементы компетенций)):

Код и формулировка компетенции	Этапы формирования компетенции	
ПК-1 способностью творчески использовать в научной и	Знает	основные понятия; достоинства и недостатки методов современной биологии

производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность (профиль) программы магистратуры	Умеет	применять теоретические знания в решении исследовательских задач
	Владеет	современным представлением о методах исследования гуморальных и клеточных механизмов иммунитета, генетических механизмов иммуногенеза, а также механизмов патогенеза различных патологических состояний человека и животных
ПК-13 готовностью использовать в педагогической деятельности знания об истории развития морской биологии на Дальнем Востоке, вкладе дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-производственный потенциал страны	Знает	современные методы и информационно-коммуникационные технологии для использования в педагогической деятельности
	Умеет	использовать современные методы исследования в области иммунологии, генетики, биохимии, микробиологии
	Владеет	современными методами и информационно-коммуникационными технологиями для педагогической деятельности, разъясняет слушателям вклад дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-производственный потенциал страны

Для формирования вышеуказанных компетенций в рамках дисциплины «Иммуногенетика и основы патологии» применяются следующие методы активного/ интерактивного обучения: практические занятия, дискуссии, подготовка и защита рефератов.

I. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ЧАСТИ КУРСА

Полномасштабные лекции учебным планом не предусмотрены.

II. СТРУКТУРА И СОДЕРЖАНИЕ ПРАКТИЧЕСКОЙ ЧАСТИ КУРСА

(36 часов)

Раздел 1. Генетические механизмы иммунитета (32 часа).

Занятие 1. Основные требования к курсу «Иммуногенетика и основы иммунологической

инженерии». (4 часа).

Понятие об иммунитете как механизме контроля антигенно-структурного и генетического гомеостаза. История возникновения и развития иммунологии. Теории иммунитета. Предмет и задачи молекулярной иммунологии и иммуногенетики. Иммуногенетика как научное направление, изучающее генетическую обусловленность факторов иммунитета, внутривидовое разнообразие и наследование тканевых антигенов, генетические и популяционные аспекты взаимоотношений макро- микроорганизмов и тканевую несовместимость. Иммунологическая инженерия: от иммуномодулирующей терапии и трансфер-фактора к таргетно-ориентированной высокоселективной иммунотерапии.

Занятие 2. Основные понятия об антигенах и антителах. Общее представление о генетических механизмах, обеспечивающих вариабельность антител (4 часа).

Понятие об иммунном ответе как комплексе реакций специфического реагирования на конкретные антигены. Полные и неполные антигены. Химическая природа антигена. Понятия антигенности и иммуногенности. Эпитопы и паратопы. Т-зависимые и Т-независимые антигены. МНС-антигены. Иммуноглобулины. Молекулярная структура и функции. Молекулярные механизмы специфичности антител. Изотипы, аллотипы, идиотипы антител. Валентность антител. Классификация иммуноглобулинов: классы иммуноглобулинов и их отличия по физико-химическим и биологическим характеристикам. Fab-, F(ab)₂, Fc-фрагменты иммуноглобулинов. Домены. Функциональное значение разных участков молекулы иммуноглобулинов. Аффинность и авидность антител. Иммунологические феномены, основанные на взаимодействии антител с антигенами: применение в лабораторной практике. Идиотопы и идиотипы. Общее представление о генетических механизмах, обеспечивающих вариабельность изотипов и идиотипов антител. Характеристика кластеров генов, кодирующих синтез легких цепей иммуноглобулинов.

Занятие 3. Генетические основы синтеза легких (L) и тяжелых (H) цепей иммуноглобулинов (4 часа).

Хромосомная локализация у человека и мыши кластеров V-, J- и C-генетических сегментов, кодирующих L-цепи молекул иммуноглобулинов. Хромосомная локализация у человека и мыши кластеров V-, D-, J- генетических сегментов, кодирующих V-область H-цепей. Перестройки ДНК лимфоидных клеток зародышевой линии, в результате которых образуется функциональный ген тяжелой цепи в В-клетках. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза и образование N-участков в составе H-цепи как фактор значительного увеличения вариабельности V_H-области.

Занятие 4. Клеточные элементы иммуногенеза (4 часа).

Рецепторы Т- и В-лимфоцитов. Хелперные и супрессорные субпопуляции Т-лимфоцитов. Механизмы МНС-рестрикции иммунного ответа. Роль молекул межклеточной адгезии во взаимодействии иммунокомпетентных клеток и эндотелиоцитов. Генетические механизмы, обеспечивающие вариабельность специфичности антиген-распознающих рецепторов В- и Т-лимфоцитов.

Занятие 5. Иммуногенетика и иммунохимия факторов неспецифической резистентности (4 часа).

Молекулы HLA III класса и генетика системы комплемента. Белки острой фазы воспаления, ферменты, лизоцим, пропердин, лактоферрин, дефензины: эффекторная и регуляторная роль при инфекционных болезнях бактериальной и вирусной природы. Гены и псевдогены дефензинов и человека как пример генетической детерминации врожденного иммунитета к различным инфекциям.

Занятие 6. Молекулярные взаимодействия в межклеточной кооперации при иммунном ответе (4 часа).

Гены иммунного ответа. HLA-типирование лимфоцитов как один из методов выявления факторов риска в отношении некоторых патологий человека. Специфичность иммунного ответа, иммунологическая память, толерантность. Роль молекул межклеточной адгезии в регуляции межклеточной кооперации и реализации иммунологических механизмов.

Занятие 7. Воспаление. Особенности генетической конституции иммунной системы и их влияние на вектор, интенсивность воспалительной реакции и ее исход (4 часа).

Признаки воспаления и физиологическое значение этого процесса. Контроль и регуляция воспаления медиаторами и регуляторами различного типа. Медиаторы воспаления: гистамин, серотонин, кинины, анафилатоксины. Участие системы комплемента в развитии воспаления. Классический и альтернативный пути активации комплемента. Участие клеток СМФ в развитии и контроле воспалительных процессов. Генетический контроль механизмов неспецифического киллинга и фагоцитоза и методы их изучения. Практическое выявление методами проточной лазерной цитофлуориметрии экспрессии маркеров активации иммунокомпетентных клеток – продуктов генов CD25, HLA-DR, CD-95.

Занятие 8. Цитокиновые механизмы регуляции иммуногенеза (4 часа).

Классификация цитокинов. Гены цитокинов и их рецепторов. Методы изучения полиморфизма генов цитокинов. Методы изучения экспрессии генов цитокинов и их

рецепторов. Хемоаттрактанты, интерлейкины, колоние-стимулирующие факторы, факторы некроза опухоли, интерфероны. Характеристика механизмов продукции и действия цитокинов.

Раздел 2. Основы иммунологической инженерии (4 часа).

Занятие 1. Технологии иммунологической инженерии, направленные на модуляцию реакций специфического иммунитета и неспецифической резистентности (4 часа).

Технология получения моноклональных антител и их различных производных. Химерные и минимальны антитела. Абзимы. Получение и испытания вакцинных и сывороточных препаратов.

Вакцины на основе индивидуальных и субъединичных антигенов возбудителей инфекционных заболеваний. Получение рекомбинантных антигенов патогенных бактерий и вирусов.

Адьюванты. Получение иммуноактивных препаратов методами генной инженерии.

Цитокины, их рецепторы (мембранные, растворимые) и рецепторные антагонисты как мишень для селективных технологий иммунологической инженерии.

III. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ

Трудоемкость контактной работы по дисциплине «Иммуногенетика и основы патологии»: 108 часов работы, из них 36 часов аудиторной работы, включая аудиторную работу в контакте с преподавателем – 36 часов, а также внеаудиторная часть самостоятельной работы обучающегося – 36 часов.

Содержание и тематика самостоятельных работ по дисциплине «Иммуногенетика и основы патологии»: Теоретико-типологический анализ подборки периодической литературы по изучаемой дисциплине. По проработанному материалу должны быть подготовлены 3 сообщения в семестр, которые включаются в общий рейтинг дисциплины. Составление глоссария терминов по изучаемой дисциплине. Подготовка реферата по теме, предложенной преподавателем или самостоятельно выбранной студентом и согласованной с преподавателем.

Представление реферата в виде презентаций с использованием мультимедийного оборудования.

Темы для самостоятельной работы:

Тема 1. Главный комплекс гистосовместимости. МНС I-II-III классов. Роль генов главного комплекса гистосовместимости в регуляции иммунологических процессов.

Тема 2. Генетические механизмы, обеспечивающие вариабельность специфичностей В- и Т-клеточных антиген-распознающих рецепторов.

Тема 3. Механизмы внутриклеточного сигналинга, участвующие в реализации иммунорегулирующей активности интерлейкинов. Роль STAT-белков в контроле экспрессии генов, необходимых для инициации лимфоцитарных механизмов иммунитета.

Тема 4. Генетические механизмы контроля системы комплемента. Продукты МНС III класса.

Тема 5. Изучение полиморфизма гена ИЛ-28 человека как технология оценки прогноза эффективности интерферонотерапии вирусных гепатитов.

Тема 6. Современные подходы к иммунологической инженерии иммунопатологических состояний человека. Методы фенотипической коррекции и генной терапии этих патологических состояний.

Тема 7. HLA-типирование. HLA и болезни. HLA и антропология.

Тема 8. Полиморфизм генов иммунного ответа как фактор, обеспечивающий выживание вида *Homo sapiens* в условиях агрессивной окружающей среды.

Учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы обучающихся по дисциплине «Иммуногенетика и основы иммунологической инженерии» представлено в Приложении 1 и включает в себя:

план-график выполнения самостоятельной работы по дисциплине, в том числе примерные нормы времени на выполнение по каждому заданию;

характеристика заданий для самостоятельной работы обучающихся и методические рекомендации по их выполнению;

требования к представлению и оформлению результатов самостоятельной работы;

критерии оценки выполнения самостоятельной работы.

III. КОНТРОЛЬ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕЙ КУРСА

пп/п	Контролируемые разделы / темы дисциплины	Коды и этапы формирования компетенций		Оценочные средства - наименование	
				Текущий контроль Вопросы к экзамену 1-80	Промежуточная аттестация
1	1. Раздел Генетические механизмы иммунитета. Иммуногенетика как научное направление, изучающее генетическую обусловленность факторов иммунитета	ПК-1 ПК-8 ПК-13	Знает Умеет Владеет	Вопросы 1-61	УО-1
				Вопросы 1-61	УО-3 УО-4
				Вопросы 1-61	УО-1
				Вопросы 1-61	УО-1
2	Раздел II. Основы патологии	ПК-1 ПК-8 ПК-13	Знает Умеет Владеет	Вопросы 17-18 29-34 36, 38, 39 53, 58 61-80	УО-1 УО-3 УО-4

Типовые контрольные задания, методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений и навыков и (или) опыта деятельности, а также критерии и показатели, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и характеризующие этапы формирования компетенций в процессе освоения образовательной программы, представлены в Приложении 2.

V. СПИСОК УЧЕБНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Основная литература (электронные и печатные издания)

- 1) Анохина Н.В. Общая и клиническая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Н.В. Анохина. — Электрон. текстовые данные. — Саратов: Научная книга, 2012. — 159 с. — 2227-8397. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/8213.html>
- 2) Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М., Бином. 2008. 239 с. Экз. на кафедре.
- 3) Геномная нестабильность и нарушение репарации ДНК как факторы наследственной и соматической патологии человека [Электронный ресурс] / Р.И. Гончарова [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — Минск: Белорусская наука, 2015. — 283 с. — 978-985-08-1859-1. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/50805.html>
- 4) Глотов А.В. Основы иммунологии, иммуногенетики и иммунобиотехнологии. Часть 1. Общая иммунология [Электронный ресурс] : учебное пособие / А.В. Глотов, М.Г. Потуданская. — Электрон. текстовые данные. — Омск: Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского, 2009. — 119 с. — 978-5-7779-1043-1. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/24910.html>
- 5) Основы клинической иммунологии и аллергологии [Электронный ресурс] : учебное пособие / А.А. Алексеева [и др.]. — Электрон. текстовые данные. — М. : ПедиатрЪ, 2016. — 152 с. — 978-5-906332-32-5. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/70801.html>
- 6) Пальцев М. А., Хаитов Р. М., Алексеев Л. П. Иммуногенетика человека и биобезопасность. Издательство: Медицина, 2009. 256 с. Экз. на кафедре.
- 7) Хаитов Р.М. Иммунология. Учебник. М., ГЭОТАР-Медиа. 2013. 528 с. Экз. на кафедре.
- 8) Хаитов Р.М. Иммунология. Структура и функции иммунной системы. 2013.
- 9) Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология. Атлас. – М., ГЭОТАР-Медиа. 2011. 624 с. Экз. на кафедре.
- 10) Ярилин А.А. Иммунология. М., ГЭОТАР-Медиа. 2010. 752 с. <https://studfiles.net/preview/6379935/>
- 11) Молекулярный канцерогенез. Под ред. М. Красильникова и И. Зборовской. 2016. 418 С. Экз. на кафедре.
- 12) Ветеринарная микробиология и иммунология : учебник для вузов ч. 2 . Иммунология / В. Н. Кисленко, Н. М. Колычев ; [ред. Е. В. Ярных] Москва : КолосС, 2007. 224 с. <http://lib.dvfu.ru:8080/lib/item?id=chamo:351436&theme=FEFU>

1. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М., Мед, 2004

<https://www.onkonature.ru/2014/07/10/%D0%BA%D0%B0%D0%BD%D1%86%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D0%B7-%D0%B0%D0%B2%D1%82%D0%BE%D1%80-%D0%B4-%D0%B3-%D0%B7%D0%B0%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B7%D0%B5-%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F-%D0%BA%D0%BD%D0%B8%D0%B3%D0%B0-%D0%B2-%D0%B1%D0%B8%D0%B1%D0%BB%D0%B8%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B5/>

2. Анохина Н.В. Общая и клиническая иммунология. Учебное пособие.

Издательство: Научная книга. 2012. <http://www.iprbookshop.ru/8213.html>

3. Глушков А.Н. Основы канцерогенеза, прогнозирования, профилактики, иммунодиагностики и биотерапии злокачественных опухолей [Электронный ресурс] : учебное пособие по онкологии для клинических ординаторов, интернов и врачей / А.Н. Глушков. — Электрон. текстовые данные. — Кемерово: Кемеровская государственная медицинская академия, 2002. — 90 с. — 2227-8397. — Режим доступа: <http://www.iprbookshop.ru/6181.html>

Журналы по иммунологии:

- Иммунология ISSN 02064952
- Клиническая иммунология. Аллергология. Медицинская иммунология ISSN 15630625
- Российский аллергологический
- Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology ISSN 10623345
- Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology ISSN 15284050
- International Journal of Immunogenetics ISSN 1744313X
- Immunogenetics ISSN 00937711
- Journal of Immunology ISSN 00221767
- Journal of Immunotherapy ISSN 15249557
- Nature Reviews Immunology ISSN 14741733
- Journal of Allergy Clinical Immunology ISSN 10976825
- Allergy ISSN 01054538
- Clinical & Experimental Allergy ISSN 13652222
- International Archives of Allergy and Immunology ISSN 10182438
- Pediatric Allergy and Immunology ISSN 09056157
- Annals of Allergy and Asthma Immunology

- Clinical Review of Allergy Immunology ISSN 10800549
- Contact Dermatitis ISSN 01051873
- Journal of Asthma ISSN 11786965
- Allergy Asthma Proceedings ISSN 15396304
- World Allergy Organization Journal ISSN 19394551

Программное обеспечение и Интернет-ресурсы

1. Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова Аллергология и иммунология. 2011-
Режим доступа - <http://www.booksmed.com/allergologiya-immunologiya/2011-klinicheskaya-immunologiya-i-allergologiya-s-osnovami-obshhej-immunologii-kovalchuk-uchebnik.html>
2. Галактионов В.Т. Иммунология: Учебник.1998. - 480 с. Режим доступа - <http://www.twirpx.com/file/36340/>
3. М.М. Авербах, А.М. Мороз, А.С. Апт, Б.В. Никоненко Иммуногенетика инфекционных заболеваний 1985. – 256 с. Режим доступа - <http://medobooks.net/5811-immunogenetika-infekcionnyh-zabolevanij-m-m.html>

Интернет-ресурсы:

<http://laboratory.rusmedserv.com/immunstatus/citokin/>

<http://medbookaide.ru/books/fold9001/book2032/p7.php>

<http://www.primer.ru/manuals/immunologia/obzor/default.htm>

<http://www.immunology.klimov.tom.ru/>

<http://immuninfo.ru/immunologiya/citokiny/>

<http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/0014293f.htm>

<http://www.cytokines.ru/>

VI. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ

Рекомендации по самостоятельной работе студентов

Самостоятельная работа студентов состоит из подготовки к практическим занятиям, работы над рекомендованной литературой, подготовки презентаций и защиты рефератов, решения задач.

При организации самостоятельной работы преподаватель должен учитывать уровень

подготовки каждого студента и предвидеть трудности, которые могут возникнуть при выполнении самостоятельной работы. Преподаватель дает каждому студенту индивидуальные и дифференцированные задания. Некоторые из них могут осуществляться в группе (например, подготовка доклада и презентации по одной теме могут делать несколько студентов с разделением своих обязанностей – один готовит научно-теоретическую часть, а второй проводит анализ практики).

Задания для самостоятельного выполнения

1. Теоретико-типологический анализ подборки периодической литературы по изучаемой дисциплине. По проработанному материалу должны быть подготовлены 3 сообщения в семестр, которые включаются в общий рейтинг дисциплины.
2. Составление глоссария терминов по изучаемой дисциплине.
3. Подготовка реферата по теме, предложенной преподавателем или самостоятельно выбранной студентом и согласованной с преподавателем. Представление реферата в виде презентаций с использованием мультимедийного оборудования.

Методические указания к выполнению реферата

Цели и задачи реферата

Реферат (от лат. *refero* — докладываю, сообщаю) представляет собой краткое изложение проблемы практического или теоретического характера с формулировкой определенных выводов по рассматриваемой теме. Избранная студентом проблема изучается и анализируется на основе одного или нескольких источников. В отличие от курсовой работы, представляющей собой комплексное исследование проблемы, реферат направлен на анализ одной или нескольких научных работ.

Целями реферата являются:

развитие у студентов навыков поиска актуальных проблем современной иммуногенетики и учения о фундаментальных основах патологии;

развитие навыков краткого изложения материала с выделением лишь самых существенных моментов, необходимых для раскрытия сути проблемы;

развитие навыков анализа изученного материала и формулирования собственных выводов по выбранному вопросу научным, грамотным языком.

Задачами подготовки и защиты реферата являются:

научить студента максимально верно передать мнения авторов, на основе работ которых студент готовит свой реферат;

научить студента грамотно излагать свою позицию по анализируемой в реферате проблеме;

подготовить студента к дальнейшему участию в научно – практических конференциях, семинарах и конкурсах;

помочь студенту определиться с интересующей его темой, дальнейшее раскрытие которой возможно осуществить при написании курсовой работы или диплома;

уяснить для себя и изложить причины своего согласия (несогласия) с мнением того или иного автора по данной проблеме.

Основные требования к содержанию реферата

Студент должен использовать только те материалы (научные статьи, монографии, пособия), которые имеют прямое отношение к избранной им теме. Не допускаются отстраненные рассуждения, не связанные с анализируемой проблемой. Содержание реферата должно быть конкретным, исследоваться должна только одна проблема (допускается несколько, только если они взаимосвязаны). Студенту необходимо строго придерживаться логики изложения (начать с определения и анализа понятий, перейти к постановке проблемы, проанализировать пути ее решения и сделать соответствующие выводы). Реферат должен заканчиваться выводами по теме.

Реферат должен быть представлен в виде презентации.

Общие требования к презентации:

- презентация не должна быть меньше 10 слайдов;
- первый лист – это титульный лист, на котором обязательно должны быть представлены: название проекта; фамилия, имя, отчество автора;
- следующим слайдом должно быть содержание, где представлены основные этапы (моменты) презентации; желательно, чтобы из содержания по гиперссылке можно перейти на необходимую страницу и вернуться вновь на содержание;
- дизайн-эргономические требования: сочетаемость цветов, ограниченное количество объектов на слайде, цвет текста;
- последними слайдами презентации должны быть глоссарий и список литературы.

Выступление по реферируемой теме не должно превышать 15 минут, 5 минут дополнительно отводится на вопросы по теме.

Порядок сдачи реферата и его оценка

Реферат готовится студентами в течение триместра в сроки, устанавливаемые преподавателем по конкретной дисциплине, и сдается преподавателю, ведущему

дисциплину.

По результатам проверки студенту выставляется определенное количество баллов, которое входит в общее количество баллов студента, набранных им в течение триместра. При оценке реферата учитываются соответствие содержания выбранной теме, четкость структуры работы, умение работать с научной литературой, умение ставить проблему и анализировать ее, умение логически мыслить, владение профессиональной терминологией, грамотность изложения.

Тематика рефератов

Тема 1. Гены главного комплекса гистосовместимости и регуляторная роль их продуктов в иммунологических процессах.

Тема 2. Генетические механизмы, обеспечивающие вариабельность специфичностей В- и Т-клеточных антиген-распознающих рецепторов.

Тема 3. Механизмы внутриклеточного сигналинга, участвующие в реализации иммунорегулирующей активности интерлейкинов. Роль STAT-белков в контроле экспрессии генов, необходимых для инициации лимфоцитарных механизмов иммунитета.

Тема 4. Генетические механизмы контроля системы комплемента.

Тема 5. Изучение полиморфизма гена ИЛ-28 человека как технология оценки прогноза эффективности интерферонотерапии вирусных гепатитов.

Тема 6. Современные подходы к иммунологической инженерии иммунопатологических состояний человека. Методы фенотипической коррекции и генной терапии этих патологических состояний.

Тема 7. HLA и болезни. HLA и антропология.

Тема 8. Полиморфизм генов иммунного ответа как фактор, обеспечивающий выживание человека, как вида в условиях агрессивной окружающей среды

VII. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Методическое обеспечение дисциплины:

Учебно-тематический план курса “ Иммуногенетика и основы иммунологической инженерии, молекулярные и клеточные основы патологии, избранные главы иммунологии и иммунохимии ”.

Технические средства обеспечения дисциплины:

1. Ноутбук, мультимедийный проектор
2. Компьютерная база данных в Интернете.



МИНИСТЕРСТВО

ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ

ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«Дальневосточный федеральный университет»
(ДФУ)

ШКОЛА ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ
САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩИХСЯ
по дисциплине «Иммуногенетика и основы патологии»**

Направление подготовки –06.04.01 Биология
магистерская программа «Биологические системы: структура,
функции, технологии»
Форма подготовки очная

Владивосток
2017

Самостоятельная работа студента включает:

- 1) библиотечную или домашнюю работу с учебной литературой и конспектом лекций;
- 2) самостоятельное изучение отдельных тем дисциплины;
- 3) подготовку к коллоквиумам и контрольным;
- 4) подготовку к экзамену.

Порядок выполнения самостоятельной работы должен соответствовать календарно-тематическому плану дисциплины, в котором установлена последовательность проведения лекций, лабораторных занятий, коллоквиумов и контрольных мероприятий.

План-график выполнения самостоятельной работы по дисциплине «Иммуногенетика и основы патологии»

№ п/п	Дата/сроки выполнения	Вид самостоятельной работы	Примерные нормы времени на выполнение	Форма контроля
1	На протяжении всего курса	Подготовка к практическим занятиям, решение задач.	24 часа.	Практические занятия. Проверка решенных задач.
2	На протяжении всего курса	Работа над рекомендованной литературой.	24 часа.	Текущие вопросы в процессе выполнения практических и лабораторных работ.
3	В конце 3 семестра	Подготовка презентаций	24 часа	Защита рефератов. Экзамен

Примерные варианты тестовых заданий по курсу для проверки качества знаний:

Тест 1 по теме «Иммуногенетика»

Выберите 1 правильный ответ.

1) Главная функция молекул HLA:

- a) регуляция антителообразования;
- b) регуляция пролиферации и дифференцировки Т –лимфоцитов.
- c) участие в презентации процессированного антигена;

2) Гены HLA разделены на:

- a) 5 основных классов;
- b) множество классов и подклассов.
- c) 3 основных класса;

3) Выберите 1 правильный ответ. Пациент с HLA гаплотипом В8DR3 отличается:

- a) средним уровнем иммунного ответа;
- b) высоким уровнем иммунного ответа.
- c) низким уровнем иммунного ответа;

4) При пересадке органов и тканей необходимо, чтобы:

- a) донор и реципиент были родственниками.
- b) донор и реципиент максимально совпадали по генам HLA;
- c) донор и реципиент не имели одинаковых аллельных вариантов HLA.

5) Система генов HLA является:

- a) низкополиморфной системой;
- b) консервативной системой.
- c) высоко полиморфной системой;

6) Молекулы HLA экспрессированы на:

- a) клеточной мембране всех ядродержащих клеток в организме человека;
- b) клеточной мембране только лимфоидных клеток.
- c) клеточной мембране только клеток крови;

7) Разнообразие аллельных вариантов генов HLA – это:

- a) проявление нормального популяционного полиморфизма;
- b) результат неблагоприятного экологического воздействия на половые клетки предыдущего поколения.
- c) следствие возникновения и закрепления патологических мутаций;

8) Оценка популяционного полиморфизма генов системы HLA:

- a) сравнение частот аллельных вариантов генов системы HLA в разных популяциях невозможно.
- b) расы и популяции характеризуются одинаковой частотой аллельных вариантов генов

системы HLA;

с) расы и популяции различаются частотами аллельных вариантов генов системы HLA;

9) Для определения HLA-антигенов серологическими методами используют:

а) образцы сыворотки мышей разных линий;

б) образцы сыворотки крови родственников больного.

с) набор донорских сывороток, специфических к различным HLA-антигенам;

10) проведение HLA-генотипирования это:

а) модуляция HLA-генотипа человека методами генной инженерии.

б) определение вариантов HLA – генов методами молекулярно- генетического анализа;

с) определение различных HLA – антигенов, экспрессированных на мембране клеток серологическими методами;

11) Причиной патологического течения и невынашивания беременности может быть:

а) совпадение супругов по генам HLA– DR;

б) несовпадение антигенов матери и плода по системе HLA– DR.

с) несовпадение супругов по антигенам системы HLA–DR;

12) МНС (Главный комплекс гистосовместимости) – это:

а) совокупность всех клеток иммунной системы.

б) комплекс генов, обеспечивающий генетический контроль механизмов индукции и реализации иммунного ответа;

с) комплекс генов, определяющий мультигенный характер наследования иммунодефицитных состояний;

13) Комплекс генов МНС у человека картирован на:

а) длинном плече 1 хромосомы;

б) коротком плече 6 хромосомы.

с) длинном плече 21 хромосомы;

.

14) Антигены МНС-I отсутствуют на клеточной мембране:

а) лейкоцитов человека;

б) эпителиальных и эндотелиальных клеток человека,

с) эритроцитов и клеток ворсинчатого трофобласта.

15) Классический иммуногенетический маркер европеоидной расы это

а) гаплотип HLA-A1-B8-DR3.

б) гаплотип HLA-A1-B4-DR3.

с) гаплотип HLA-A1-B1-DR3.

16. Гены, кодирующие легкие цепи λ -типа молекулы иммуноглобулина человека расположены на:

- А.) 22 хромосоме
- Б.) 2 хромосоме
- В.) X-хромосоме
- Г.) 6-хромосоме

17. Гены для синтеза тяжелых цепей молекул IgM собираются их генных сегментов:

- А.) VD + C μ
- Б.) DJ + C μ
- В.) VDJ + C μ
- Г.) VJ + C μ

18. В формировании генов, кодирующих легкие цепи λ -типа молекулы Ig участвуют генные сегменты:

- А.) V-D-J-C
- Б.) V-J-C
- В.) V-D-J
- Г.) D-J-C

19. При перестройке D с J на 12 хромосоме в стволовой кроветворной клетке:

- А.) Синтез иммуноглобулинов не происходит
- Б.) Синтезируется тяжелая цепь μ -типа
- В.) Синтезируется молекула иммуноглобулина
- Г.) Синтезируется связанная с мембраной форма иммуноглобулина

20. Гены, кодирующие альфа-цепь TCR (Т-клеточного антиген-распознающего рецептора) у человека локализованы на хромосоме:

- А.) 14
- Б.) 7
- В.) 2
- Г.) 22

21. Ген β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) состоит из

А.) Генов переменных участков ($V\beta$) и константных участков ($C\beta1, C\beta2$)

Б.) Генов переменных участков ($V\beta$), соединительного участка ($J\beta1, J\beta2$) и константных участков ($C\beta1, C\beta2$)

В.) Удвоенных наборов генов участка разнообразия ($D\beta1, D\beta2$), соединительного участка ($J\beta1, J\beta2$) и константных участков ($C\beta1, C\beta2$)

Г.) Генов переменных участков ($V\beta$) и удвоенных наборов генов участка разнообразия ($D\beta1, D\beta2$), соединительного участка ($J\beta1, J\beta2$) и константных участков ($C\beta1, C\beta2$)

22. Полигенность молекул комплекса МНС означает:

А.) Наличие нескольких неаллельных близкосцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции

Б.) Наличие нескольких близкосцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции

В.) Наличие нескольких неаллельных близкосцепленных генов, белковые продукты которых различны в структурном отношении и выполняют идентичные функции

Г.) Наличие нескольких аллельных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции

23. HLA-DR локус хромосомы, гены которых контролируют синтез "классических" молекул (антигенов):

А.) I класса

Б.) III класса

В.) II класса

Г.) I и II класса

Обведите кружком номера всех правильных ответов:

1. Продукты генов HLA I класса отвечают за:

1) Локомоторные функции иммунокомпетентных клеток,

2) Синтез гемоглобина,

3) Кооперацию антиген-презентирующих клеток и CD4+ лимфоцитов

4) Кооперацию антиген-презентирующих клеток и CD8+ лимфоцитов

5) Участвуют в презентации антигенов,

- 6) Контроль биосинтеза белка.
- 7) Контроль митотической активности клеток.

2. Синтез легких цепей молекул иммуноглобулинов контролируется следующими кластерами генов:

- 1) V
- 2) J
- 3) D
- 4) C \square
- 5) C \square

3) Иммуногенетика изучает:

- 1) генетические механизмы естественного иммунитета,
- 2) генетические механизмы адаптивного иммунного ответа,
- 3) генетические основы синтеза молекул иммуноглобулинов,
- 4) генетику рецепторов Т-Лф,
- 5) механизмы развития наследственных иммунодефицитов,
- 6) роль генов главного комплекса гистосовместимости в контроле иммуногенеза,
- 7) механизм серологических реакций,
- 8) Гены цитокинов и их рецепторов, механизмы контроля их экспрессии,
- 9) роль полиморфизма генов цитокинов в контроле иммунологической реактивности.

4) Антигены HLA II класса участвуют в обеспечении:

- 1) контроля пролиферации клеток,
- 2) фагоцитарных процессов,
- 3) активации системы комплемента,
- 4) кооперации антиген-презентирующих клеток и CD4⁺лимфоцитов в процессе развития специфического иммунного ответа клеточного типа,
- 5) кооперации антиген-презентирующих клеток и CD4⁺лимфоцитов в процессе развития специфического иммунного ответа гуморального типа,
- 6) механизмов презентации Т-зависимых антигенов.

5) Гибридомы для синтеза моноклональных антител получают при слиянии следующих типов клеток:

- 1) нормальных Лф, продуцирующих антитела,
- 2) антиген-презентирующих клеток,
- 3) фибробластов,
- 4) клеток плазматомы (опухолевой линии В-клеток)
- 5) клеток из Т-клеточной лимфомы
- 5) нормальных Т-лимфоцитов.

б) Области применения моноклональных антител:

- 1) иммунофенотипирование
- 2) выделение клеток
- 3) определение группы крови
- 4) диагностика опухолей и локализация опухолей
- 5) анализ сложных смесей антигенов
- 6) анализ иммунного ответа
- 7) иммунотерапия
- 8) иммунопрофилактика

Материалы для самостоятельного изучения по дисциплине «**Иммуногенетика и основы иммунологической инженерии**»

Тема 1. Молекулярные взаимодействия в межклеточной кооперации при иммунном ответе.

Гены иммунного ответа. HLA-типирование лимфоцитов как один из методов выявления факторов риска в отношении некоторых патологий человека. Специфичность иммунного ответа, иммунологическая память, толерантность. Механизмы биотрансформации антигенов в организме. Роль молекул межклеточной адгезии в реализации иммунологических механизмов.

Тема 2. Воспаление. Особенности генетической конституции иммунной системы и их влияние на вектор, интенсивность воспалительной реакции и ее исход.

Признаки воспаления и физиологическое значение этого процесса. Контроль и регуляция воспаления медиаторами и регуляторами различного типа. Медиаторы воспаления: гистамин, серотонин, кинины, анафилатоксины. Участие системы комплемента в развитии воспаления. Классический и альтернативный пути активации комплемента.

Участие клеток СМФ в развитии и контроле воспалительных процессов. Генетический контроль механизмов неспецифического киллинга и фагоцитоза и методы изучения. Практическое выявление методами проточной лазерной цитофлуориметрии экспрессии маркеров активации иммунокомпетентных клеток – продуктов генов CD25, HLA-DR, CD-95.

Тема 3. Цитокиновые механизмы регуляции иммуногенеза.

Классификация цитокинов. Методы изучения полиморфизма генов цитокинов. Методы изучения экспрессии генов цитокинов и их рецепторов. Хемоаттрактанты, интерлейкины, колоние-стимулирующие факторы, факторы некроза опухоли, интерфероны. Характеристика механизмов продукции и действия цитокинов.

Тема 4. Основы иммунологической инженерии.

Технология получения моноклональных антител и их различных производных. Химерные антитела. Получение и испытания вакцинных и сывороточных препаратов.

Вакцины на основе индивидуальных и субъединичных антигенов возбудителей инфекционных заболеваний. Получение рекомбинантных антигенов патогенных бактерий и вирусов.

Адьюванты. Получение иммуноактивных препаратов методами генной инженерии.

Дополнительные вопросы для рассмотрения на практических занятиях:

1. Иммунологические методы с применением различного типа меток к антигенам и иммуноглобулинам (ферромагнитные, парамагнитные, изотопные, флуоресцентные, ферментные) (4 часа).

2. Иммунологическая инженерия. Характеристика современных иммунотерапевтических препаратов и технологий. Принципы оценки их эффективности (4 часа).

3. Современные нанотехнологии получения вакцинных препаратов на основе липидных и липид-сапониновых адьювантных контейнеров (4 часа).

4. Технологии получения иммунотоксических молекулярных конструкций (4 часа).

5. Генетика цитокинов и технологии регуляции цитокиновых лиганд-рецепторных взаимодействий для селективной иммунотерапии (4 часа).

6. Технологии регуляции молекулярных механизмов лимфоцитарного хоминга, селектин-интегриновых взаимодействий (4 часа).

7. Генетика иммуноглобулинов. Молекулярная структура антител. Структура антигенсвязывающего центра. Гипервариабельные участки (4 часа).

8. MHC-гены. Антигены главного комплекса гистосовместимости. Молекулярная структура. Роль в иммунитете (4 часа).

9. Характеристика CD-антигенов. Функциональная роль различных CD- антигенов. Диагностическая значимость определения экспрессии CD-антигенов. Иммунофенотипирование (4 часа).

10. Методы определения полиморфизма генов цитокинов (4 часа).

11. Методы определения экспрессии генов цитокинов (4 часа).

12. Методы HLA-типирования лимфоцитов (4 часа).

13. Мутагенез иммунокомпетентных клеток: роль в патологии (2 часа).

14. Трансфер-фактор как пример эффективной иммунологической инженерии (2 часа).

РАЗВЕРНУТЫЙ ПЛАН ЛЕКЦИЙ, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ «Иммуногенетика и основы иммунологической инженерии, молекулярные и клеточные основы патологии, избранные главы иммунологии и иммунохимии»

Лекция № 1. Введение: основы иммуногенетики и молекулярной иммунологии

Определение научной дисциплины. Цели, задачи, методы иммунохимии. История развития. Иммуногенетика - комплексная научная дисциплина, сочетающая методы иммунологии, молекулярной биологии и генетики для изучения наследственных факторов иммунитета, внутривидового разнообразия и наследования тканевых антигенов, генетических и популяционных аспектов взаимоотношений макро- и микроорганизма и тканевой несовместимости. Начало иммуногенетике положили работы немецких учёных П. Эрлиха и Ю. Моргенрота, обнаруживших в начале 20 в. группы крови у коз, и открытие К. Ландштейнером групп крови у человека. Термин «И.» предложен американским учёным М. Ирвином в 1930.

Индивидуальная и видовая устойчивость растений и животных к бактериальным и вирусным инфекциям обеспечивается сложной многоступенчатой системой защитных сил организма. В борьбе между защитными силами и инфекционными агентами «преимущество» часто остаётся на стороне последних, так как микроорганизмы быстро размножаются, образуя многомиллионные популяции, в которых рано или поздно возникают мутантные формы с более агрессивными свойствами, чем у исходного штамма. Вероятно, как ответное

защитное средство на определённом этапе эволюции позвоночных животных возникла система адаптивного иммунитета (антителообразование) — наиболее мощная линия обороны организма, особенно при повторных контактах с инфекционными агентами. Способность (или неспособность) вырабатывать антитела - наследственный признак. Генетическая регуляция биосинтеза антител имеет характерные особенности. Так, образование одной полипептидной цепи молекулы антитела контролируется двумя разными генами. Один из них контролирует образование части цепи, участвующей в построении активного центра; строение этой части различно у антител разной специфичности. Другой ген контролирует образование части цепи, строение которой одинаково у антител, относящихся к данному классу иммуноглобулинов.

Помимо групповых антигенов, существуют наследуемые их варианты, специфичные для отдельных типов клеток, например для лейкоцитов. Различия в строении лейкоцитарных антигенов у донора и реципиента — одна из причин несовместимости при пересадке органов и тканей. Наследственные внутривидовые различия в строении многих белков сыворотки крови (Альбумины, Трансферрины и др.) контролируются, как правило, аллельными генами, причём частота каждой Аллели в популяции высока (20% и выше), что указывает на «давление» естественного отбора. Одна из важнейших задач И. — установление факторов, обуславливающих распространение в популяциях новых аллелей. Таким фактором может служить сходство в строении антигенов у болезнетворных микроорганизмов и макроорганизма. Животные в норме не вырабатывают антител к собственным антигенам, поэтому сходство в антигенном строении между каким-либо компонентом микробной клетки и той или иной молекулой макроорганизма приведёт к тому, что последний не сможет синтезировать антитела, обезвреживающие данный вид микроба. В связи с этим снижаются защитные силы макроорганизма. Поэтому отбор будет подхватывать появление видоизменённых молекул белков (или полисахаридов), повышая тем самым иммунную устойчивость организма. Распространение в популяции новых аллелей может происходить также и в тех случаях, когда в результате Мутации соответствующего гена молекула макроорганизма изменяется так, что ферментативные системы микроба уже не могут её использовать в качестве субстрата. Иногда для этого достаточно замены одной аминокислоты в полипептидной цепи, как это имеет место у некоторых мутантных форм Гемоглобина. Такие формы распространились в районах земного шара, где высока заболеваемость малярией: носители мутантного гемоглобина не болеют малярией, так как малярийный плазмодий не способен использовать его в качестве субстрата. В ряде случаев распространяются мутации, которые изменяют биохимию клетки или органа в целом и тем самым нарушают приспособленность паразита. По-видимому, существуют и другие

механизмы наследственного иммунитета, благодаря которым достигается наследственная гетерогенность вида-хозяина, препятствующая распространению паразитического штамма микроорганизма. Таким образом, степень естественной устойчивости к заболеванию животных данного вида определяется многими факторами, суммарно отражая особенности конституции и животного, и возбудителя заболевания. Трёхмерная модель этих взаимоотношений представлена на рис., где показано, что процент особей, выживших после инфекции, зависит как от наследственной устойчивости организма к возбудителю заболевания, так и от вирулентности последнего.

Наследственная устойчивость к заболеваниям, как правило, специфична, так как физиологические основы устойчивости к разным заболеваниям обычно неодинаковы. Так, африканский скот зебу, прекрасно переносящий жару и устойчивый к туберкулёзу очень чувствителен к трипаносомозу; линия белых леггорнов, устойчивая к моноцитозу кур, чувствительна к куриному лейкозу; линии мышей, устойчивые к мышинному тифу, чрезвычайно восприимчивы к вирусу ложного бешенства. С древнейших времён генетическая устойчивость отдельных особей, пород, рас и т. д. к заболеваниям служила предпосылкой для селекции. Так были выведены овцы породы ромни-марш, устойчивые к трихостронгилидам, раса кроликов, устойчивая к миксоматозу, и медоносные пчёлы, устойчивые к американскому гнильцу. Естественный отбор на устойчивость существовал и среди людей. Так, после открытия Нового Света оказалось, что индейцы Северной Америки более чувствительны к кори и ветряной оспе, чем европейцы, для которых эти заболевания были привычны и легко переносимы.

В основе генетической устойчивости к заболеваниям лежат разнообразные механизмы, в том числе и неиммунологические. Белые леггорны, например, устойчивы к белому поносу потому, что имеют более совершенную терморегуляцию; устойчивость скота зебу к клещевым заболеваниям обусловлена более толстой кожей и особенностями кожных выделений, которые отпугивают клещей. Чувствительность к оспе у лиц с группами крови А и АВ связана с общностью антигена А человека и антигенов вируса оспы. Поэтому лица с группами крови В и О(Н) легче переносят оспу.

Перенесение генетических представлений в область иммунологии позволило советскому учёному В. П. Эфроимсону сформулировать эволюционно-генетическую концепцию иммуногенеза, объясняющую внутривидовое антигенное разнообразие и гетерогенность антител по специфичности. Каждая здоровая зрелая в иммунологическом отношении особь способна к иммунному ответу на тканевые антигены особи с другим генотипом. Таким образом, тканевая несовместимость — универсальная биологическая

закономерность. Лишь однояйцевые близнецы и животные одной чистой линии не разделены барьером тканевой несовместимости, выраженность которой зависит от степени несходства генотипов донора и реципиента. Для успешных пересадок органов и тканей, переливаний крови и клеток костного мозга очень важно снизить до минимума величину этого несходства путём подбора совместимого донора. Изучение клеточных антигенов, их наследования и разнообразия, их обнаружение (типирование) — это те разделы И. , которые особенно важны для трансплантологии, трансфузиологии, иммуногематологии и клинической иммунологии.

Молекулярная иммунология - наука, изучающая структуру антигенов и антител, механизмы их взаимодействия при различных состояниях организма человека и животных (как физиологических, так и патологических).

Практическая значимость достижений иммунохимии послужила основой для иммунохимической биотехнологии, основанной на разработке методов индикации и выделения белков, производстве моноклональных антител и диагностических и лечебных систем на их основе. Эти достижения составляют методическую базу иммунологической инженерии.

Предмет изучения молекулярной иммунологии - выяснение природы специфичности и механизма действия антигенов, механизмов генерации специфических антител, изучение механизмов взаимодействия антиген-антитело и исхода этого взаимодействия, а также - разработка способов получения высокоспецифичных антител и применения современных высокочувствительных методов их детекции.

Первыми шагами, заложившими фундамент развития иммунохимии, оказались исследования иммунитета против токсинов дифтерийной и столбнячной природы. Иммунохимия как наука возникла в результате работ Беринга и Китацато по изучению дифтерийных бактериальных токсинов. В сыворотке крови эти авторы обнаружили вещества, нейтрализующие токсины (антитоксины).

Эти исследования получили обоснование и теоретическое развитие в работах П.Эрлиха. П.Эрлих установил, что сыворотка животных содержит молекулярные агенты – антитоксины, нейтрализующие патоген и способные защищать организм от соответствующего возбудителя. Этим молекулярным антитоксическим агентам Эрлих и дал названия – антитела.

Важнейшие вехи в истории формирования иммунологии как науки:

1896г. Gruber и Durham - специфическая агглютинация бактерий, Bordet – агглютинация эритроцитов.

1897г. Kraus - реакция преципитации между антигеном и антителом.

Вопрос о строгой специфичности антител: П.Эрлих - статья о количественной оценке дифтерийных антисывороток. Эрлих декларировал, что специфичность антител и их реакций опираются на законы структурной химии. Предложил теорию образования антител: Теория боковых цепей. Эрлих утверждал, что антитело – самостоятельный вид молекул, существующих вначале в виде рецепторов (боковых цепей) на поверхности клеток и обладающих особой химической конформацией, обеспечивающей специфическое взаимодействие с комплементарной конфигурацией на молекуле антигена.

Эрлих: как у антигена, так и у антител имеются функциональные домены, каждый из которых обладает гаптофорной группировкой, обеспечивающей химическое взаимодействие в результате взаимного соответствия по типу «замка и ключа», т.е. аналогично взаимодействию в системе фермент-субстрат. Антигенная молекула токсина имеет отдельную токсофорную группировку, разрушение которой превращает ее в токсоид, сохраняющий способность к специфическому взаимодействию с антителом.

Эрлих: молекула антитела имеет различные домены, один из которых отвечает за присоединение к антигену, а другой обеспечивает такие вторичные биологические эффекты как преципитация, агглютинация, связывание комплемента. Эта концепция опровергнута унитарной теорией Hans'a Zinsser'a, согласно которой одно и то-же антитело может обуславливать разнообразные биологические эффекты.

Эрлиховская теория взаимодействия Аг-Ат основывалась на положениях структурной органической химии того времени. Эрлих считал, что специфичность антитела зависит от химического состава и конфигурации молекулы. Считал взаимодействие антигена с антителом необратимой реакцией, основанной на образовании прочных химических связей, названных позднее ковалентными. Эта точка зрения опровергнута Bordet и Landsteiner, утверждавшими, что иммунологическое взаимодействие связано не с химическими, а с физическими свойствами реагирующих макромолекул, и их взаимодействие, как и сама иммунологическая специфичность, лучше объясняется с точки зрения процессов «коллоидальной» адсорбции. Т.е., полагали, что взаимодействие Аг-Ат является частично обратимым и в подтверждение этого указывали на феномен Danysz. Даниш - степень нейтрализации дифтерийного токсина антитоксином зависит от того, как добавлять токсин (сразу или постепенно), это значит, что реакция не имеет необратимый характер.

Дискуссия между Эрлихом и Борде по вопросу природы и способа фиксации комплемента комплексами Аг-Ат. Эрлих - имеется множество разнообразных компонентов, каждый из которых связывается со своим собственным рецептором на молекуле антитела подобно тому как разные антигены специфически реагируют с

соответствующими участками антитела. Борде - связывание антигена антителом (которое он называл «сенсibiliзирующим веществом») приводит к такому изменению конфигурации антитела, которое обеспечивает неспецифическое связывание одного и того же комплемента. Победила точка зрения Борде.

Важнейшие вехи в истории формирования иммунологии как науки:

- Вопрос о природе взаимодействия Аг-Ат. По мнению Svante Arrhenius`а и Thorvald`а Madsen`а, взаимодействие токсин-антитоксин в высокой степени обратимо и напоминает нейтрализацию слабой кислоты слабой щелочью. Эта идея получила дальнейшее развитие в написанной Аррениусом в 1907г. книге «**Иммунохимия**», которая и дала название новому разделу иммунологии.
- В соответствии с химической концепцией Эрлиха эти исследователи утверждали, что взаимодействие Аг-Ат является строго **стехиометрическим** и подчиняется закону действующих масс.
- В 20-30-х годах XX века Marrack и Heidelberger выдвинули положение о том, что Аг и Ат являются мультивалентными и поэтому могут образовывать «решетку», содержащую Аг и Ат в разных пропорциях.

Два открытия, способствовавших интенсивному развитию иммунологии:

1. Гейдельбергер показал, что антитела являются белками и, следовательно, их можно подвергнуть молекулярному анализу;
2. Ландштейнер, а также Эвери и Гейдельбергер, охарактеризовали антигенные детерминанты (эпитопы).

На основе этих достижений была получена точная и детальная информация о классах антител, структуре этих белков, зависимости специфичности антител от аминокислотной последовательности и взаимоотношения структуры и функций у иммуноглобулинов.

Лекция № 2: Антигены. Гены МНС: антигены главного комплекса гистосовместимости и генетический контроль иммунного ответа.

Основные понятия об антигенах. Понятие об иммунном ответе как комплекса реакций специфического реагирования на конкретные антигены.

Варианты классификации антигенов. Полные и неполные антигены. Гаптены. Химическая природа антигена. Понятия антигенности и иммуногенности. Эпитопы и паратопы. Тимус-зависимые антигены. Аутоантигены. Антигенные структуры микроорганизмов (бактерий, вирусов). Понятие о протективности антигенов инфекционных агентов

Антигены (anti-против, genos- род) - вещества любого происхождения, которые способны вызвать в организме специфическую иммунную реакцию и принимать участие в ее осуществлении. Это структурно чужеродные для данного конкретного организма вещества, способные вызывать иммунный ответ.

В этом определении присутствуют две основные характеристики антигена:

антигенная специфичность – уникальное биологическое свойство, отличающее данный антиген от индивидуального антигенного состава реципиента, и

иммуногенность – способность инициировать иммунную систему к формированию эффекторов, нейтрализующих антигенно чужеродные структуры.

В самом широком смысле слова **антигены - это все субстанции, несущие признаки генетической чужеродности и распознаваемые иммунной системой организма как «несвое»** с соответствующими реакциями.

Эпитопы и паратопы – две стороны одного взаимодействия. Агрегоп, несущая часть, митогенный участок – составные части сложных антигенов (обычно белковой природы).

Варианты классификации антигенов:

-**Полные антигены** (органические вещества сложной химической структуры. они индуцируют выработку специфических антител, и способны взаимодействовать с ними).

-**Неполные антигены (гаптены)** - органические вещества простой структуры, неорганические вещества.

-**Природные** (вещества микробного, растительного, животного) происхождения.

-**Синтетические** антигены - вещества, полученные в процессе синтеза из низкомолекулярных соединений.

- **Внешние (экзоантигены)** - поступают в организм из внешней среды.

- **Внутренние (эндоантигены)** - находятся внутри каждого организма. К эндогенным антигенам относятся изоантигены, аутоантигены (нормальные, патологические), антигены HLA первого и второго классов.

- **Одновалентные** - имеют лишь одну детерминантную группу.

- **Поливалентные** - имеют две и более детерминантных групп.

- **Тимус - зависимые** антигены.

- **Тимус - независимые** антигены.

Антигенные структуры микроорганизмов.

Инфекционные антигены – это антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших.

Разновидности бактериальных антигенов:

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

- 2) **видоспецифические** (у различных представителей одного вида);
- 3) **типоспецифические** (определяют серологические варианты – серовары, антигеновары внутри одного вида).

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

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

Эпитопы О-АГ представлены гексозами (галактоза, рамноза и др.) и аминасахарами (N-ацетилглюкозами, N-ацетилгалактозами). У **Грам+ бактерий** в состав О-АГ входят также глицеринтейхоевая и рибитолтейхоевая кислоты.

Липид А - это гетеродимер, содержит глюкозамин и жирные кислоты. Он **обладает сильной адьювантной, неспецифической иммуностимулирующей активностью и токсичностью**. В целом ЛПС является **эндотоксином**. Уже в небольших дозах вызывает лихорадку из-за активации макрофагов и выделения ими **ИЛ1, ФНО** и других цитокинов, поликлональную тимуснезависимую активацию В-лимфоцитов и синтез антител, дегрануляцию гранулоцитов, агрегацию тромбоцитов. Он может связываться с любыми клетками организма, но особенно с макрофагами. В больших дозах угнетает фагоцитоз, вызывает токсикоз, нарушение функции сердечно-сосудистой системы, тромбозы, эндотоксический шок.

ЛПС некоторых бактерий входит в состав иммуностимуляторов (**продигиозан, пирогенал**).

Пептидогликаны клеточной стенки бактерий и особенно полученные из них фракции мурамилпептидов обладают сильным адьювантным эффектом на клетки СИ, неспецифически усиливая ответ на различные антигены.

Н-АГ входит в состав бактериальных жгутиков, основа его - белок **флагеллин**. Термолабилен.

К-АГ – это гетерогенная группа поверхностных, **капсульных АГ** бактерий. Они находятся в капсуле и связаны с поверхностным слоем липополисахарида клеточной стенки. Содержат

главным образом кислые полисахариды, в состав которых входят галактуроновая, глюкуроновая и идуриновая кислоты. Встречаются вариации в строении этих антигенов, на основании чего, например, различают 75 типов (серотипов) пневмококков, 80 типов клебсиелл и т.д. Капсульные антигены используются для приготовления вакцин менингококков, пневмококков, клебсиелл. Однако, введение высоких доз полисахаридных антигенов может вызвать **толерантность**.

Вирусные антигены имеют белковую природу; среди них – гликопротеины (обычно – поверхностные), фосфопротеины, нуклеопротеины.

Чаще всего **протективными** являются поверхностные гликопротеины, хотя образуемые в ходе иммунного ответа антитела направлены против многих белков, в том числе и расположенных в нуклеокапсиде.

У большинства вирусов имеются **суперокапсидные** – поверхностные оболочечные, белковые и гликопротеидные АГ (например, гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа),

капсидные – оболочечные и

нуклеопротеидные (сердцевинные) АГ.

Принципиальная, отличительная от других возбудителей особенность репродукции вирусов заключается в том, что не все белки, синтез которых индуцируется в инфицированной клетке, входят затем в состав вириона. Часть из них является вспомогательными, обеспечивающими процесс репродукции. Тем не менее, они также могут попадать во внеклеточную среду и служить иммунизирующим материалом.

У большинства вирусов имеются суперокапсидные – поверхностные оболочечные, белковые и гликопротеидные АГ (например, гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа), капсидные – оболочечные и нуклеопротеидные (сердцевинные) АГ.

Все вирусные антигены – Т-зависимые.

Гетероспецифичность и гетероантигены – общие для представителей разных видов антигенные комплексы или общие антигенные детерминанты на различающихся по другим свойствам комплексах.

За счет **гетероантигенов** могут возникать перекрестные иммунологические реакции.

У микробов различных видов и у человека встречаются общие, сходные по строению АГ.

Эти явления называются **антигенной мимикрией**.

Например, **АГ Форсмана** содержится в ЭБ, сальмонеллах и у морских свинок.

Гемолитические стрептококки группы А содержат перекрестно реагирующие АГ (в частности, **М-протеин**), общие с АГ эндокарда и клубочков почек человека.

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

Суперантигены – особая группа антигенов, которые в дозах значительно меньших, чем митогены, вызывают поликлональную активацию и пролиферацию большого числа Т-лимфоцитов (более 20%, обычные антигены – 0,01%).

Суперантигенами являются бактериальные энтеротоксины, стафилококковые, холерные токсины и другие бактериальные антигены, некоторые вирусы (ротавирусы).

Протективные антигены – структурные и функциональные элементы инфекционного патогена, обеспечивающие реализацию различных механизмов патогенеза (т.е., факторы патогенности). Антитела против этих антигенов способны блокировать реализацию функций этих факторов патогенности. Соответственно, такие антигены трактуются как протективные.

Антигены HLA и большой комплекс гистосовместимости

У человека и животных существуют врожденные антигенные детерминанты на поверхности клеточных мембран в крови и других тканях организма. Так же, как и группы крови АВО, они передаются по наследству и сохраняются в течение всей жизни. Тип наследования аутосомно-доминантный. Серии антигенов от каждого родителя (известные как гаплотипы) комбинируются таким образом, что каждый потомок получает два набора антигенов. Существование большого количества антигенов определяет возможность миллионов или миллиардов комбинаций, характеризующих нас как индивидуумов.

1. Основные функции этих наследуемых поверхностных антигенов пока точно не установлены. Возможно, они играют решающую роль в контроле эмбрионального развития, определяя, вероятно, форму, размеры и структуру органов и тканей. На протяжении жизни они могут участвовать в процессах распознавания собственных нормальных, а также чужеродных и патологических структур. Если это так, то они должны обладать способностью идентифицировать вирусные частицы и аномальные клетки, а также чужеродные клетки и ткани. Согласно существующей теории, возможен двойной механизм распознавания как HLA-антигенов, так и вирусных антигенов в инфицированных клетках.

2. Появление термина «НБА-антигены» объясняется тем, что эти антигены, расположенные на поверхности лейкоцитов, наиболее доступны для исследования, а первая идентифицированная система антигенов была названа «А». Так человеческие лейкоцитарные А-антигены стали H1_A-антигенами. Они известны также как трансплантационные антигены или антигены гистосовместимости, поскольку именно потребности трансплантационной хирургии послужили причиной быстрого развития трансплантационной иммунологии и широкого использования тканевого типирования с определением HLA-антигенов. В перспективе, после установления основных функций поверхностных антигенов HLA отторжение трансплантата и сочетанные заболевания будут рассматриваться как побочные продукты системы, предназначенной для других целей. Эволюция этой высокоразвитой системы не была направлена на создание проблем для хирургов и обеспечение врачей больными.

HLA-антигены были подразделены на два класса. При этом антигены А, В и С были отнесены к классу I, а О и О К— к классу II. Использование теста комплемент — ДНК позволило обнаружить больше антигенов классов I и II, чем было идентифицировано ранее. Установлено, что некоторые антигены классов I и II отличаются чрезвычайным полиморфизмом.

Лекция № 3. Иммуноглобулины. Гены иммуноглобулинов и Т-клеточных антиген-распознающих рецепторов.

Антитела. Молекулярная структура и функции. Молекулярные механизмы специфичности антител. Валентность антител. Классификация иммуноглобулинов: классы иммуноглобулинов и их отличия по физико-химическим и биологическим характеристикам. Fab-, F(ab)₂, Fc-фрагменты иммуноглобулинов. Домены. Функциональное значение разных участков молекулы иммуноглобулинов. Аффинность и авидность антител. Иммунологические феномены, основанные на взаимодействии антител с антигенами: применение в лабораторной практике.

Антитела – специфические эффекторы гуморального иммунитета.

Антитела - белки (гликопротеины), образование которых индуцируется антигенами и основным свойством которых является способность к специфическому взаимодействию с антигеном.

Все антитела относятся к суперсемейству иммуноглобулиновых молекул.

Первичная функция антител – специфическое связывание антигенов.

Вторичные функции антител обеспечивают функциональную кооперацию с клеточными и гуморальными факторами неспецифической резистентности .

Антитела (иммуноглобулины) представляют собой сложные гликопротеиновые молекулы с четко выраженной **доменной структурой**. Домен в молекулах иммуноглобулинов – это фрагмент молекулы, включающие примерно 110 аминокислотных остатков и имеющий характерную для этого класса молекул укладку цепи в виде двух слоев с антипараллельной бета-складчатой структурой, один из которых построен из трех, а другой - из четырех сегментов.

Различные домены имеют заметную структурную гомологию. Внутридоменный дисульфидный мостик связывает оба слоя.

Доменный принцип построения молекулы иммуноглобулинов впервые предложил Дж.Эдельман в 1969г., еще до получения рентгеноструктурных данных. Эдельман предположил, что каждый гомологичный участок иммуноглобулинов организован в глобулярную замкнутую сферу - домен - за счет внутрицепевых дисульфидных связей, образующихся полуцистеиновыми остатками. Рентгеноструктурный анализ подтвердил общий принцип доменной организации полипептидных цепей иммуноглобулинов.

Принцип выявления антител, специфичных к гаптену: В качестве примера использованы структурно близкие гаптены - динитрофенил (ДНФ) и тринитрофенил (ТНФ) и два неродственных белка (условно, А и В). Иммунизация кролика конъюгатом ДНФ-белок А приводит к образованию нескольких по специфичности антител. Помимо анти-ДНФ в антисыворотке (АС) представлены антитела к эпитопам белка А. С целью исключить антитела к этому белку при постановке реакции используют конъюгат того же гаптена ДНФ с неродственным белком В. Отрицательный результат реакции антисыворотки с конъюгатом близкого по структуре гаптена ТНФ, комплексированного с белком В, демонстрирует роль тонкой конфигурации гаптена в определении специфичности антител.

ВИДЫ АНТИТЕЛ:

Иммунные антитела - АТ, которые продуцируются в организме после иммунизации или в результате инфекционного процесса.

Нейтрализующие АТ - АТ, практически полностью инактивирующие инфекционный и/или репликативный потенциал вируса.

Неспецифические антитела. При иммунизации антигеном образуются специфические к АГ антитела и повышается синтез других АТ (к другим антигенам) - т.н. АГ-зависимые неспецифические антитела. От 2,5 до 7% иммуноглобулинов - неспецифические.

Нормальные антитела (естественные) - к неспецифическим АГ:

а) содержатся в крови без предварительного введения АГ, например, изоагглютинины альфа и бета.

б) появляющиеся вследствие постоянных контактов организма в течение его жизни с микроорганизмами (кишечной палочкой, кокками, чужеродными клетками).

Полные антитела,

Неполные - (моновалентные) антитела:

- появляются в ответ на введение гаптенов,
- не вызывают эффекторных функций (активации комплемента, фагоцитоза),
- проходят через плаценту в организм плода.

Например, антитела к резус-АГ.

Аутоантитела (аутоАТ) - АТ, взаимодействующие с антигеном, являющимся нормальным составным элементом организма.

МАТ (моноклональные антитела) - АТ, полученные из одного клона культуры плазматических клеток. МАТ получают из супернатанта (культуральной среды) мышинных гибридом (гибрида АГ-специфического В-лимфоцита и лимфомной клетки). Получено несколько тысяч гибридом, в т.ч. на большое количество вирусных антигенов.

Блокирующие АТ - АТ, "закрывающие своим телом" АГ, предотвращая тем самым дальнейшую индукцию иммунного ответа. Препарат вируса с сколь угодно большой дозой блокирующих АТ остается заразным. **Блокирующие АТ** могут блокировать собой связывание вирусного (или др.) белка с рецептором на клетках.

Некоторые исторически сложившиеся термины:

Реагины - аллергические АТ.

Преципитины (преципитирующие АТ) - мнововалентные, формирующие ПИК.

Агглютинины (агглютинирующие антитела) - полные АТ (как минимум 2-валентные, вызывающие агглютинацию лигандов).

Лизины, цитотоксические антитела - АТ, запускающие комплементарный лизис.

Антиизотипические АТ - АТ к тяжелой цепи Ig, к изотипам АТ (АТ к Ig M, Ig G, Ig A, Ig E, Ig D).

Антиаллотипические АТ - АТ к аллотипу Ig. Аллотипы - индивидуальные различия

константных цепей одного и того же класса (субкласса) иммуноглобулинов человека (= аллельные варианты полипептидных цепей иммуноглобулинов).

Классификация антител по антигену

антиинфекционные или **антипаразитарные** антитела, вызывающие непосредственную гибель или нарушение жизнедеятельности возбудителя инфекции либо паразита

антитоксические антитела, не вызывающие гибели самого возбудителя или паразита, но обезвреживающие вырабатываемые им токсины.

«**антитела-свидетели заболевания**», наличие которых в организме сигнализирует о знакомстве иммунной системы с данным возбудителем в прошлом или о текущем инфицировании этим возбудителем, но которые не играют существенной роли в борьбе организма с возбудителем (не обезвреживают ни самого возбудителя, ни его токсины, а связываются со второстепенными белками возбудителя).

аутоагрессивные антитела, или **аутологичные** антитела, **аутоантитела** — антитела, вызывающие разрушение или повреждение нормальных, здоровых тканей самого организма хозяина и запускающие механизм развития аутоиммунных заболеваний.

аллореактивные антитела, или **гомологичные** антитела, **аллоантитела** — антитела против антигенов тканей или клеток других организмов того же биологического вида.

гетерологичные антитела, или **изоантитела** — антитела против антигенов тканей или клеток организмов других биологических видов.

антиидиотипические антитела — антитела против антител, вырабатываемых самим же организмом.

Вариабельность антител

- **Изотипическая** вариабельность — проявляется в наличии классов антител (изотипов), различающихся по строению тяжелых цепей и олигомерностью, вырабатываемых всеми организмами данного вида;
- **Аллотипическая** вариабельность — проявляется на индивидуальном уровне в пределах данного вида в виде вариабельности аллелей иммуноглобулинов- является генетически детерминированным отличием данного организма от другого;
- **Идиотипическая** вариабельность — проявляется в различии аминокислотного состава антиген-связывающего участка. Это касается вариабельных и гипервариабельных доменов тяжелой и легкой цепи, непосредственно контактирующих с антигеном.

Структура антител. Антитела являются тяжелыми (~150 кДа - IgG) гликопротеидами, имеющими сложное строение. Антитела состоят из двух тяжелых цепей (H-цепи, в свою

очередь состоящие из VH, CH1, шарнира, CH2 and CH3 доменов) и из двух лёгких цепей (L-цепей, состоящих из VL и CL доменов). К обеим из H-цепей ковалентно присоединен олигосахарид. При помощи протеиназы папаина антитела можно расщепить на два Fab-фрагмента (от англ. antigen-binding fragment — антиген-связывающий фрагмент) и один Fc-фрагмент (от fragment crystallizable — фрагмент, способный к кристаллизации). В зависимости от класса и исполняемых функций антитела могут существовать как в мономерной форме (IgG, IgD, IgE, сывороточный IgA) так и в олигомерной форме (димер-секреторный IgA, пентамер- IgM). Всего различают пять типов H-цепей (α -, γ -, δ -, ϵ -и μ -цепи) и два типа легких цепей (κ -цепь и λ -цепь).

Легкие цепи иммуноглобулинов (Immunoglobulin light chains) -белковые субъединицы иммуноглобулинов. Легкие цепи иммуноглобулинов имеют молекулярную массу около 28 кДа.

У млекопитающих и человека представлены два типа легких цепей: лямбда (λ) цепи (1, 2, 3, и 4) и каппа (каппа, κ) цепи (только один тип). Антитела образуются В-лимфоцитами, которые экспрессируют только один класс легких цепей в течение жизни. Отношение каппа цепей к лямбда цепям у здоровых людей приблизительно составляет 65 к 35, причем уровни часто сильно изменяются при новообразованиях.

Легкие цепи одного антитела всегда идентичны. Каждая легкая цепь содержит два последовательно соединенных иммуноглобулиновых домена: один константный домен (IgC) и один переменный домен (IgV) отвечающий за связывание антигена. Приблизительная длина одной легкой цепи — 211—217 остатков аминокислот.

Новообразования плазматических клеток, например, в случае множественной миеломы, могут секретировать легкие цепи иммуноглобулинов, которые называются белками Бенс-Джонса.

Иммуноглобулин М состоит из пяти мономеров, каждый из которых включает четыре полипептидные цепи (две H-цепи и две L-цепи). Мономеры объединены в единую пентамерную молекулу дисульфидными -S-S- связями и J-цепью.

Общий план строения IgA соответствует другим иммуноглобулинам. **Димерная форма** образуется посредством ковалентной связи между J-цепью (J) и аминокислотами C-конца тяжелой цепи. В процессе транспорта IgA через эпителиальные клетки к молекуле присоединяется секреторный компонент (СК), защищающий иммуноглобулин от действия протеолитических внутриклеточных ферментов. **Из основной циркуляции IgA проникает в эпителиальные клетки, взаимодействуя с секреторным компонентом, который на этом этапе транспорта выполняет функцию рецептора.** В самой эпителиальной клетке

секреторный компонент защищает IgA от действия протеолитических ферментов. Достигнув апикальной поверхности клетки, комплекс IgA:секреторный компонент выходит в секрет субэпителиального пространства.

Таблица. Биологические свойства основных классов иммуноглобулинов человека

IgG	Доминирует среди Ig во внутренних жидкостях организма, особенно в экстравакулярной, где обеспечивает защиту от микроорганизмов и токсинов.
IgA	Основной Ig слизистых секретов. Обеспечивает защиту слизистых оболочек от инфекций.
IgM	Эффективно агглютинирует антигены; синтезируется на ранних стадиях иммунного ответа - образует первую линию обороны при бактериемии.
IgD	Большая часть (если не весь) IgD связана с поверхностной мембраной лимфоцитов.
IgE	Связывание антигенов на слизистых оболочках. Привлекает антимикробные агенты. Участвует в защите от бактериальных инвазий. Обеспечивает появление симптомов аллергии.

Свойство	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Коэффициент седиментации	7S	7S, 9S, 11S	19S	7S	8S
Мол. масса	150000	160000	900000	185000	200000
Количество основных четырехцепочечных единиц	1	1,2	5	1	1
Тяжелые цепи	гамма	альфа	мю	дельта	эпсилон
Легкие цепи	каппа+лямбда	каппа+лямбда	каппа+лямбда	каппа+лямбда	каппа+лямбда
Валентность при связывании антигена	2	2,4	5(10)	2	2
Концентрация	8-10 мг/мл	1,4-4 мг/мл	0,5-2 мг/мл	0-0,4	17-450

сыворотке (норма)				мг/мл	мг/мл
Общее содержание иммуноглобулинов, %	80	13	6	0-1	0,002
Содержание углеводов	3	8	12	13	12

Связывание комплемента	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Классический путь	++	-	+++	-	
Альтернативный путь	-	+-	-	-	
Преодоление плацентарного барьера	+	-	-	-	-
Связывание с гомологичными тучными клетками и базофилами	-	-	-	-	+
Связывание с макрофагами и полиморфно-ядерными лейкоцитами	+	+-	-	-	-

Резюме по теме строения IgG:

А. Доменная структура иммуноглобулина G. Иммуноглобулины (Ig), или **антитела**, являются семейством Y-образных (по пространственной структуре) гликопротеинов, у которых обе вершины («буквы Y») могут связывать антиген. Иммуноглобулины находятся в виде мембранных белков на поверхности лимфоцитов и в свободном виде в плазме крови. Иммуноглобулин класса G (**IgG**): молекула представляет собой крупный тетрамер (H₂L₂ с 150 кДа) из двух идентичных **тяжелых цепей** (H-цепей) и двух идентичных **легких цепей** (L-цепей). В обеих H-цепях имеется ковалентно связанный *олигосахарид*. Иммуноглобулины расщепляются протеиназой *папаином* на два Fab-фрагмента и один Fc-фрагмент. Оба **Fab-фрагмента** (от англ. antigen binding fragment — антиген-связывающий фрагмент) состоят соответственно из одной L-цепи и N-концевой части H-цепи. Изолированные Fab-фрагменты сохраняют способность связывать антиген. **Fc-Фрагмент** (от англ. fragment crystallizable — способный кристаллизоваться) состоит из C-

концевой половины обеих Н-цепей. Эта часть IgG выполняет функции связывания с клеточной поверхностью, взаимодействия с системой комплемента и участвует в переносе антител клетками. Несмотря на большое разнообразие в иммуноглобулинах соблюдается общий принцип строения. Обе тяжелые пептидные цепи (Н-цепи) IgG состоят из четырех *глобулярных доменов* **VH**, **CH1**, **CH2** и **CH3**, обе легкие (L- цепи) — из двух *глобулярных доменов* **CL** и **VL**. При этом буквы С и V соответственно обозначают константные (англ. constant) и переменные (англ. variable) области. Обе тяжелые цепи, а также тяжелая цепь с легкой, связаны *дисульфидными мостиками*. Дисульфидные мостики внутри доменов стабилизируют третичную структуру. Домены имеют длину около 110 аминокислот и обладают взаимной гомологией. Такая структура антител, очевидно, возникла благодаря дупликации гена. В центральной области молекул иммуноглобулинов расположен шарнирный участок, который придает антителам внутримолекулярную подвижность.

Классы

иммуноглобулинов.

Иммуноглобулины человека по структуре тяжелых цепей делятся на пять классов. Различия между IgA (с двумя подклассами), IgD, IgE, IgG (с четырьмя подклассами) и IgM определяются Н-цепями, которые обозначаются греческими буквами — α , β , ϵ , γ и μ . L-Цепи имеют только две разновидности (κ и λ). IgM могут существовать в различных формах. Секретируемые IgM состоят из пяти взаимосвязанных димеров. IgA могут быть образованы из одного, двух или трех димеров. Олигомерные IgM и IgA удерживаются вместе благодаря связывающему J-пептиду (от англ. joining). Иммуноглобулины всех пяти классов являются секретируемыми белками. Они поставляются в кровь зрелыми В-клетками (плазматическими клетками), Ранние варианты IgM и IgD найдены также в виде интегральных мембранных белков на поверхности В-клеток. Антитела имеют различные функции. При контакте с чужеродным антигеном первыми образуются IgM-антитела. Ранние формы IgM связаны с поверхностью В-клеток, более поздние формы секретируются в виде пентамеров плазматическими клетками. Антитела IgM особенно активны против микроорганизмов. В количественном отношении превалируют антитела IgG (см. таблицу сывороточных концентраций белков). Они находятся в крови и в интерстициальной жидкости; с помощью рецепторов они могут также проходить в плаценту и вследствие этого переноситься от матери к плоду. IgA обнаруживаются преимущественно в кишечном тракте и секретах. IgE присутствуют в плазме здорового человека лишь в незначительных, концентрациях. Повышение уровня IgE наблюдается при аллергических реакциях и паразитарных инфекциях. Количества в плазме IgD, функция которого еще полностью не

выяснена, также весьма малы.

Белки суперсемейства гена иммуноглобулинов

Общие функции белков этого семейства состоят в способности *специфически узнавать* и отличать макромолекулы друг от друга при клеточном взаимодействии. В определенных случаях связывание чужеродных молекул приводит к **передаче сигнала в клетку**. Общий признак этих белков — наличие в их структуре одного или нескольких так называемых иммуноглобулиновых доменов, для которых характерными являются пептидные последовательности длиной в 70-110 аминокислотных остатков, присутствующих также в иммуноглобулинах. **Ig-домены** имеют структуру сэндвича, который построен из антипараллельных β -складчатых листов, соединенных дисульфидным мостиком.

Представителями этого суперсемейства белков являются иммуноглобулины, белки ГКГС (МНС) и рецепторы Т-клеток, Fc-рецепторы, мембранные белки CD3, CD4, CD8, молекулы клеточной адгезии и рецепторы для различных факторов роста.

Причины

разнообразия

антител.

Исключительная вариабельность антител обусловлена тремя причинами.

1. **Множественность генов.** Имеется множество генов, кодирующих белки вариабельных доменов, однако выбирается и экспрессируется только один ген.
2. **Соматические рекомбинации.** Гены разделены на несколько сегментов, для которых имеются различные версии. Во время созревания В-клеток благодаря случайной комбинации сегментов возникают новые гены (мозаичные гены).
3. **Соматические мутации.** Во время дифференциации В-клеток и превращения в плазматические клетки происходят мутации в *кодирующих генах*. Таким образом, изначальные гены терминальной линии могут стать различными *соматическими генами* в индивидуальных клонах В-клеток.

Гены, кодирующие HLA-антигены, в составе большого комплекса гистосовместимости расположены на 6-й хромосоме. Под-робности их строения постепенно выясняются, но — по понятным причинам — не столь отчетливо, как у мышей и других живот-ных. В течение многих лет у людей не удавалось обнаружить гены иммунного ответа, соответствующие таковым у мышей. Их существование даже ставилось под сомнение. В настоящее время общепринято, что они соответствуют человеческим анти-генам класса II.

Гены иммуноглобулинов

В-клетки обладают почти безграничной способностью вырабатывать антитела. До недавнего времени было не ясно, каким образом небольшое количество генов может обеспечивать такое разнообразие. Теперь известно, что 300 генетических сегментов эмбриональной ДНК в период развития и созревания В-клеток могут быть соответствующим образом реорганизованы, обеспечивая формирование миллионов клеточных линий и способность вырабатывать невообразимое количество антител. Соматические мутации могут увеличивать эту способность посредством спорадических изменений единичных нуклеотидов в период соматического развития.

Идентифицированы три отдельных локуса генов иммуноглобулинов. Гены тяжелой цепи расположены на 14-й хромосоме, легкой цепи κ — на 2-й хромосоме, легкой цепи λ — на 22-й хромосоме. Таким образом, для обеспечения выработки молекул иммуноглобулинов необходимо взаимодействие различных хромосом. В настоящее время существуют методики определения генов тяжелых цепей переменных регионов, которые могут быть использованы для выявления ассоциаций с заболеваниями.

Гены Т-клеточных рецепторов

Третий член сверхсемейства, генная система Т-клеточных рецепторов, изучен менее полно. Установлено, что эта система сложна, как и система генов иммуноглобулинов. Процессы, обуславливающие возникновение многообразия Т-клеточных рецепторов, похожи на те, которые происходят при выработке антител, однако в эксперименте пока не удалось выявить соматических мутаций. Гены В-цепи рецептора обнаружены на особой хромосоме у мышей, но у человека они пока не идентифицированы.

Аффинность и Авидность антител.

Аффинность – сила связи активного центра антитела с эпитопом. Термин относится к связыванию антитела с одной антигенной детерминантой. Взаимодействие антиген - антитело обратимо и скорость диссоциации комплекса (т.е. прочность взаимодействия антиген-антитело) зависит от константы ассоциации, называемой аффинностью (или сродством). Аффинность зависит от площади контакта между антителом и эпитопом, межмолекулярных расстояний в области контакта, распределения заряженных и

гидрофобных групп, а также от тех конформационных изменений, которые вызваны перекрытием электронных облаков (если электронные облака двух молекул перекрываются, то возникают мощные силы отталкивания). Некоторое количество энергии, затраченное на изменение конформации антигена, необходимо для взаимодействия контактирующих аминокислотных остатков. Изменение конформации может понадобиться либо для того, чтобы обеспечить сам контакт, либо для того, чтобы вывести из зоны контакта те аминокислотные остатки, которые создали бы силы отталкивания.

Авидность антител (от лат. *avidus* - жадный) - мера способности гетерогенной смеси антител связываться с соответствующим макромолекулярным (полидетерминантным) антигеном; основная характеристика иммунных сывороток, например антитоксических. Характеризуется прочностью образующихся комплексов антиген - антитело. Авидность иммунной сыворотки зависит от аффинности содержащихся в ней антител, т. е. является усредненной аффинностью.

Авидность определяется многими сложными факторами, в частности, гетерогенностью антител в данной сыворотке, направленных к определенной антигенной детерминанте, а также гетерогенностью самих детерминант. Именно авидность характеризует иммунный ответ *in vivo* и служит мерой функциональной аффинности антисыворотки к естественному поливалентному антигену. Высокая авидность имеет преимущество перед низкой для осуществления многих иммунохимических реакций.

Лекция № 4. Клеточные элементы иммуногенеза.

Рецепторы Т- и В-лимфоцитов. Хелперные и супрессорные субпопуляции Т-лимфоцитов. Механизмы МНС-рестрикции иммунного ответа. Роль молекул межклеточной адгезии во взаимодействии иммунокомпетентных клеток и эндотелиоцитов.

В динамике развития иммунного ответа можно выделить следующие этапы.

- 1. Поглощение и процессинг антигена макрофагом.**
- 2. Представление процессированного антигена макрофагом с помощью белка главной системы гистосовместимости класса 2 Т- хелперам.**
- 3. Узнавание антигена Т- хелперами и их активация.**

4. Узнавание антигена и активация В- лимфоцитов.
5. Дифференциация В- лимфоцитов в плазматические клетки, синтез антител.
6. Взаимодействие антител с антигеном, активация систем комплемента и макрофагов, интерферонов.
7. Представление при участии белков МНС класса 1 чужеродных антигенов Т- киллерам, разрушение инфицированных чужеродными антигенами клеток Т- киллерами.
8. Индукция Т- и В- клеток иммунной памяти, способных специфически распознавать антиген и участвовать во вторичном иммунном ответе (антигенстимулированные лимфоциты).

Методы оценки Т- и В- лимфоцитов.

1. Для выявления В-лимфоцитов используют метод розеткообразования с эритроцитами, обработанными антителами и комплементом (ЕАС-РОК), спонтанного розеткообразования с эритроцитами мыши, метод флюоресцирующих антител с моноклональными антителами (МКА) к рецепторам В-клеток (CD78, CD79a,b, мембранные Ig).
2. Для количественной оценки Т- лимфоцитов используют метод спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е- РОК), для выявления субпопуляций (например, Т- хелперов и Т- супрессоров) - иммунофлюоресцентный метод с МКА к CD-рецепторам, для определения Т- киллеров - тесты цитотоксичности.
3. Функциональную активность Т- и В-клеток можно оценить в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) на различные Т- и В- митогены.
4. Сенсibilизированные Т- лимфоциты, участвующие в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) можно определить по выделению одного из цитокинов - MIF (миграцию ингибирующего фактора) в реакции торможения миграции лейкоцитов (лимфоцитов) - РТМЛ.
5. Определение цитокинов.

Процесс созревания В-клеток осуществляется в две стадии - *антиген-независимую и антиген-зависимую.*

Антиген - независимая фаза. В-лимфоцит в процессе созревания проходит стадию *пре-В- лимфоцита* - активно пролиферирующей клетки, имеющей цитоплазматические Н-цепи типа С мю (т.е. IgM). Следующая стадия - *незрелый В-лимфоцит* характеризуется появлением мембранного (рецепторного) IgM на поверхности. Конечная стадия

антигеннезависимой дифференцировки - образование *зрелого В-лимфоцита*, который может иметь два мембранных рецептора с одинаковой антигенной специфичностью (изотипа) - IgM и IgD. Зрелые В-лимфоциты покидают костный мозг и заселяют селезенку, лимфоузлы и другие скопления лимфоидной ткани, где их развитие задерживается до встречи со “своим” антигеном, т.е. до осуществления антиген-зависимой дифференцировки.

Антиген-зависимая дифференцировка включает активацию, пролиферацию и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти. Активация осуществляется различными путями, что зависит от свойств антигенов и участия других клеток (макрофагов, Т-хелперов). Большинство антигенов, индуцирующих синтез антител, для индукции иммунного ответа требуют участия Т-клеток - *тимус-зависимые антигены*. *Тимус-независимые антигены* (ЛПС, высокомолекулярные синтетические полимеры) способны стимулировать синтез антител без помощи Т-лимфоцитов.

Активация В-лимфоцитов может осуществляться:

- Т- зависимым антигеном при участии белков МНС класса 2 Т-хелпера;
- Т- независимым антигеном, имеющим в составе митогенные компоненты;
- Поликлональным активатором (ЛПС);
- Анти- мю иммуноглобулинами;
- Т- независимым антигеном, не имеющим митогенного компонента.

Антиген-распознающий рецептор В-лимфоцитов (BCR)

Мембраносвязанный IgM (mIgM), как правило, представляет собой мономерный иммуноглобулин, т.е. отдельную единицу, состоящую из четырех полипептидных цепей. Эта молекула имеет гидрофобную последовательность, расположенную на С-концевом участке тяжелой цепи и предназначенную для фиксации молекулы на клеточной мембране.

Число молекул рецептора достигает 10 – 100 тыс. на клетку.

mIgM кодируется тем же набором генов, что и сывороточные аналоги. Единственным их структурным отличием является дополнительный фрагмент на С-конце молекулы, играющий роль мембранного якоря.

С основной частью BCR непосредственно связаны дополнительные компоненты

(Ig-альфа (CD79a) и Ig-бета (CD79b), соединяющие его с путями внутриклеточной передачи сигнала (т.е., являются корецептором mIg).

Маркеры В-лимфоцитов.

На В-Лф человека и мыши помимо иммуноглобулинов и гетеродимеров Ig-альфа и Ig-бета, образующих рецепторный комплекс В-клетки, экспрессируется ряд других молекулярных маркеров.

Большая часть В-клеток несет на поверхности молекулы (антигены) МНС класса II, которые важны для кооперативных (контактных) взаимодействий с Т-клетками. У мыши это антигены IA или IE, у человека - HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.

Выявляемые почти на всех В-клетках рецепторы для компонентов комплемента C3b и C3d вовлечены в процессы **клеточной активации и хоминга**.

На В-клетках имеются также Fc-рецепторы для экзогенного IgG, передающие сигналы отрицательной регуляции для В-Лф.

Основные маркеры для идентификации В-Лф человека - это **CD19, CD20 и CD22**.

Известны также такие маркеры В-клеток человека как **CD72** и **CD78**. Существенная роль в контактных взаимодействиях между Т- и В-клетками принадлежит маркеру **CD40**.

В-клетки можно разделить на две субпопуляции: **В-1-клетки** (Mac-1+, **CD23**-) и **В-2-клетки** (Mac-1-, **CD23**+). Большинство **В-1-клеток** экспрессирует маркер **CD5**, первоначально обнаруженный только на Т-клетках. **В-1-клетки** спонтанно синтезируют так называемые нормальные антитела к некоторым бактериальным антигенам, а также к аутоантигенам, таким как ДНК, Fc-фрагмент IgG, фосфолипиды и белки цитоскелета. У человека **В-1-клетки** особенно часто выявляются в крови новорожденных. По некоторым данным они проходят особый путь дифференцировки, отличающийся от созревания "обычных" В-клеток, которые относятся к субпопуляции В-2.

Кроме общего с Т-клетками маркера **CD5**, В-клетки имеют общие маркеры с другими клетками, например, **CD40**, который присутствует на дендритных клетках.

Хоминг – процесс миграции лимфоцитов в лимфатические узлы. Это органоспецифический возврат Т-клеток в периферические лимфоидные органы с помощью особых молекул хоминга (англ. homing - возврат). В основе процесса хоминга лежит взаимодействие между L-селектинами и сосудистыми адресинами.

LFA-1 (CD11a/CD18)

Mac-1 (CD11b/CD18) – важная адгезионная молекула, вовлеченная в процесс миграции

лейкоцитов, клеточный сигналинг, секрецию.

CD5 - пан-Т-клеточный антиген. CD5 антиген присутствует в норме на клеточной поверхности большинства Т-лимфоцитов, начиная с кортикальных тимоцитов, и В1а-субпопуляции В-Лф.

Диагностическое значение антитела к CD5 имеют при В-клеточных опухолях: В-клеточном хр. лимфолейкозе/лимфоцитарной лимфоме, лимфоме из клеток зоны мантии, некоторых диффузных крупноклеточных В-клеточных лимфомах. Выявляется на клетках рака вилочковой железы. Окрашивание мембранное.

CD20 - пан-В-клеточный антиген. Экспрессия на В-Лф совпадает по времени с реарранжировкой генов легких цепей Ig. Маркер нормальных и опухолевых В-клеток, фолликулярных дендритических клеток. Экспрессируется в 50% случаев В-лимфобластных лимфом/лейкозов и в большинстве случаев зрелоклеточных лимфом/лейкозов В-клеточного происхождения. В 40% случаев "классического" лимфогранулематоза некоторые клетки Березовского-Штернберга-Рид могут в различной степени интенсивности экспрессировать антиген CD20, тогда как опухолевые клетки при нодулярном типе лимфоидного преобладания практически всегда имеют сильную экспрессию данного антигена.

CD20 утрачивается плазматическими клетками, но экспрессируется в некоторых случаях при плазмоцитоме/миеломе. Окрашивание мембранное.

CD21 - В-клеточный антиген. В лимфоидных фолликулах экспрессируется зрелыми В-лимфоцитами и фолликулярными дендритическими клетками в норме и при различных типах В-клеточных лимфом/лейкозов; экспрессируется субпопуляцией тимоцитов и некоторыми видами эпителия и не экспрессируется циркулирующими лимфоцитами, Т-клетками, гранулоцитами и моноцитами. Антитела к CD21 используются для идентификации изменений сети фолликулярных дендритных клеток при В-клеточных лимфомах, ангиоиммунобластной лимфоме, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией поражениях лимфоидной ткани, лимфогранулематозе. Характер окрашивания мембранный.

CD22 - В-клеточный антиген. Экспрессия CD22 возникает в цитоплазме про- и ранних пре-В-клеток и на поверхности зрелых В-лимфоцитов. Поверхностная экспрессия антигена CD22 вариабельна и может утрачиваться в процессе дифференцировки. Антиген CD22 слабо экспрессирован при В-клеточных лимфомах/лейкозах из клеток-предшественников; сильная экспрессия антигена CD22 наблюдается при волосатоклеточном лейкозе. Т-лимфоциты периферической крови и Т-клеточные лимфомы/лейкозы, а также гранулоциты и моноциты не экспрессируют антиген CD22.

CD40 - экспрессируют В-клетки (рецептор CD40L; активация Т клеткой).

CD72 - пан В-клеточный (лиганд CD5).

CD23 является дифференцировочным антигеном В-клеток, несущих поверхностные иммуноглобулины М и D. Этот антиген представляет собой сиалогликопротеин с мол. массой порядка 45 кДа, содержит одну N-связанную углеводную цепь комплексного типа. Его аминокислотная последовательность выведена из последовательности клонированной ДНК. Рецептор состоит из 320 аминокислотных остатков. Положение его в клеточной мембране необычно. Аминоконцевой участок ориентирован внутрь клетки, а карбоксильный — наружу. Рецептор состоит из небольшого цитоплазматического домена (23 аминокислотных остатка), трансмембранного домена (20 аминокислотных остатков) и большого внеклеточного домена (277 аминокислотных остатков).

- **CD23** экспрессируется на многих клетках, включая В-клетки, моноциты, эозинофилы, тромбоциты, эпидермальные клетки Лангерганса.
- Особенным свойством этого белка является способность к аутопротеолитическому перевариванию. За счет этого рецептор распадается на растворимые фрагменты с мол. массой 37; 33; 25—27 и 12 кДа. Все эти фрагменты (за исключением последнего) связывают IgE (IgE-связывающие факторы — IgE-СФ).
- Известно два подтипа низкоаффинного рецептора для IgE — CD23a и CD23b. Они отличаются друг от друга несколькими аминокислотными остатками цитоплазматического домена, а внеклеточные домены являются идентичными. CD23a выявляется лишь на нестимулированных В-клетках, а CD23b — на В-клетках, стимулированных IL-4, а также на моноцитах, эозинофилах, Т-клетках.

CD 78 как пан-В-клеточный антиген. Физиологическое значение. Роль в определении плазматических клеток (наряду с CD 22).

Рецептор Т- лимфоцита (TCR) представляет собой гетеродимер, состоящий из двух (альфа- и бета-) цепей (молекулярная масса каждой - 40-50 кДа), которые не являются продуктами иммуноглобулиновых генов.

Существует два типа TCR, каждый из которых экспрессируется на разных типах Т-лимфоцитов.

TCR1, состоящий из гамма- и дельта-цепей, появляется на ранних стадиях онтогенеза.

TCR2 состоит из альфа- и бета-цепей. Каждая цепь образует два домена; один из них имеет относительно неизменную структуру, гомологичную характерной укладке цепи

иммуноглобулинов, а другой обладает большей структурной изменчивостью, поскольку по своему строению напоминает переменные домены Ig (**Fab -фрагмент**). Переменный участок связывается с антигеном и молекулами МНС. TCR2 является рецептором большинства Т-клеток.

Альфа и бета-цепи совместно обуславливают распознавание специфичности антигена. У всех иммунокомпетентных Т-лимфоцитов антигенный рецептор нековалентно, но прочно связан в комплекс с молекулой CD3, которая состоит из пяти пептидных цепей (CD3-гамма, -дельта, -эпсилон, -зета-зета и -зета-ню) и участвует в передаче сигнала от узнающего антиген альфа,бета-гетеродимера внутрь клетки.

Весь рецептор можно рассматривать как комплекс, образованный гетеродимером и CD3, и который может связываться с другими мембранными пептидами, такими как CD4 и CD8.

CD4 обладает сродством к молекулам МНС II класса, CD8 имеет сродство к молекулам МНС I.

CD45, цитоплазматический домен которой обладает активностью **тирозинфосфатазы**, участвует в запуске активационных сигналов. Полноценность сигнализации, зависящей от TCR, обуславливается также активностью молекулы-корцептора **CD28**. CD28 присутствует практически на всех CD4⁺-Т-клетках и на 60—70% CD8⁺-лимфоцитов. На покоящихся клетках эта молекула не связана с рецепторным комплексом. Однако она оказывается нековалентно связанной с ним в процессе распознавания антигена и активации молекулы CD28.

CD4. Эти рецепторы имеют Т-хелперы 1 и 2 и являются корцептором (местом связывания) детерминант белковых молекул МНС класса 2. Является специфическим рецептором для оболочечных белков вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (gp120) и ВИЧ-2.

CD8. Популяция CD8⁺ Т-лимфоцитов включает цитотоксические и супрессорные клетки. При контакте с клеткой-мишенью CD8 выступает в роли корцептора для белков HLA класса 1.

CD28 является одной из молекул, которые обеспечивают совместные стимулирующие сигналы, необходимые для активации Т-клеток. CD28 является рецептором для B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86).

CD28 связывается с B7 на поверхности антиген-презентирующей клетки, которая

играет роль костимулирующей молекулы, служит дополнительным сигналом усиления экспрессии на Т-лимфоцитах IL-2R (CD25), продукции ими IL-2 и их пролиферации

CD45 - трансмембранный гликопротеин, пронизывающий насквозь цитоплазматическую мембрану всех ядродержащих клеток крови; Находясь в мембранах Т - лимфоцитов, **CD45** ассоциирован с антигенраспознающим комплексом: на Th - TCR-CD3 -CD4. на Ts - TCR - CD3- CD8; Находясь в мембранах В - лимфоцитов, **CD45** ассоциирован с CD22;

Находясь в мембранах лейкоцитов, **CD45** в числе прочих ассоциирован с молекулами адгезии и высокоаффинными рецепторами для IgE.

Строение CD45: Антиген состоит из трех частей:

внеклеточная - рецепторная - представлена 4 изоформами CD45RA, RO, RB, RC:

мембранная - является каналом для потока ионов кальция через мембрану;

внутриклеточная - каталитическая - представляет собой фермент тирозинфосфатазу, которая катализирует реакцию фосфорилирования тирозинкиназ p56 и p59, **приводя тем самым антигенраспознающий комплекс лимфоцита в активированное состояние.**

Исходя из его локализации и строения вытекают и стратегические задачи, которые **CD45** выполняет в клетке:

обеспечивает процессы проведения антигенного сигнала на геном лимфоцита;

обеспечивает процесс выбора толерантности к данному антигену или запуска каскада иммунологических реакций по его элиминации.

Важнейшие дифференцировочные антигены Т- лимфоцитов человека:

1. **CD2** - антиген, характерный для Т-лимфоцитов, тимоцитов, НК клеток. Идентичен рецептору эритроцитов барана и обеспечивает образование розеток с ними (методика определения Т- клеток).

2. **CD3** - необходимы для функционирования любых Т- клеточных рецепторов (TCR). Молекулы CD3 имеют все субклассы Т- лимфоцитов. Взаимодействие TCR-CD3 с представляющей антиген молекулой МНС класса 1 или 2 определяет характер и реализацию иммунного ответа.

3. **CD4**. Эти рецепторы имеют Т- хелперы 1 и 2 и Т-индукторы. Являются корецептором (местом связывания) детерминант белковых молекул МНС класса 2. Является специфическим рецептором для оболочечных белков вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (gp120) и ВИЧ-2.

4. **CD8**. Популяция CD8+ Т- лимфоцитов включает цитотоксические и супрессорные

клетки. При контакте с клеткой- мишенью CD8 выступает в роли корцептора для белков HLA класса 1.

Три основные группы Т-лимфоцитов - помощники (активаторы), эффекторы (CTL, киллеры), регуляторы.

Первая группа - помощники (активаторы), в состав которых входят *Т-хелперы1*, *Т-хелперы2*, индукторы *Т-хелперов*, индукторы *Т-супрессоров*.

1. ***Т-хелперы1*** несут рецепторы CD4 (как и *Т-хелперы2*), имеющие сродство к молекуле МНСII, а также CD44. Эта субпопуляция лимфоцитарных клеток отвечает за созревание *Т-цитотоксических лимфоцитов (Т-киллеров)*, активирует *Т-хелперы2* и цитотоксическую функцию макрофагов, секретируют ИЛ-2, ИЛ-3 и другие цитокины.

2. ***Т-хелперы2*** имеют общий для хелперов CD4 и специфический CD28 рецепторы, обеспечивают пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов в антителопродуцирующие (плазматические) клетки, синтез антител, тормозят функцию *Т-хелперов1*, секретируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6.

3. ***Индукторы Т-хелперов*** несут CD29, отвечают за экспрессию антигенов HLA класса 2 на макрофагах и других А-клетках.

4. ***Индукторы Т-супрессоров*** несут CD45 специфический рецептор, отвечают за секрецию ИЛ-1 макрофагами, активацию дифференцировки предшественников *Т-супрессоров*.

Вторая группа - Т-эффекторы.

В нее входит только одна субпопуляция.

5. ***Т-цитотоксические лимфоциты (Т-киллеры)***. Имеют специфический рецептор CD8, имеющий сродство к молекуле МНСI. лизируют клетки-мишени, несущие чужеродные антигены или измененные аутоантигены (трансплантант, опухоль, вирус и др.). **CTL** распознают чужеродный эпитоп вирусного или опухолевого антигена в комплексе с молекулой класса 1 HLA в плазматической мембране клетки-мишени.

Третья группа - Т-клетки-регуляторы.

Группа функционально разнородна. Их активация происходит в результате непосредственной стимуляции антигеном без существенного участия главной системы гистосовместимости.

Современные представления о супрессорных популяциях клеток. **Treg** – клетки с иммунофенотипом CD3+CD4+CD25^{bright}FOXP3+.

Лекция № 5.

Иммунохимия факторов неспецифической резистентности.

Система комплемента. Белки острой фазы воспаления, ферменты, лизоцим, пропердин, лактоферрин, дефензины: эффекторная и регуляторная роль при инфекционных болезнях бактериальной и вирусной природы.

Организм человека имеет **две основные линии защиты** от возбудителей инфекционных заболеваний: неспецифическую (**резистентность**) и специфическую (**иммунитет**).

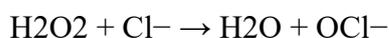
Факторы первой линии защиты (резистентности) характеризуются рядом общих признаков:

- 1) они сформированы задолго до встречи с возбудителем (внутриутробный период);
- 2) неспецифичны;
- 3) генетически детерминированы;
- 4) генотипически и фенотипически неоднородны (гетерогенны) в популяции;
- 5) высокая резистентность к одному возбудителю может сочетаться с низкой к другому;
- 6) Резистентность прежде всего зависит от функционального состояния **макрофагов**, которое контролируется генами, не связанными с HLA, и состояния системы комплемента (контролируемой HLA).

Система комплемента. Эффекторный и иммунорегуляторный потенциал белков, входящих в систему комплементов. Типы активации системы комплемента: классический, альтернативный, лектиновый. Механизм формирования мембрано-атакующего комплекса C5-C9.

Катионный белок – компонент специфических секреторных гранул, представитель суперсемейства рибонуклеаз (рибонуклеаза 3). Его выраженные основные свойства обусловлены высоким содержанием **аргинина**. Помимо относительно невысокой рибонуклеазной активности, ЕСР проявляет и другие свойства. Для него характерна **мощная цитотоксическая активность по отношению к различным клеткам и микроорганизмам, проявляющаяся в перфорировании мембран клеток-мишеней.**

Миелопероксидаза. Миелопероксидаза (*Myeloperoxidase*) - фермент лизосом Нф, относится к гем-содержащим белкам. Миелопероксидаза образует гипохлорит-анион, сильный окислитель, обладающий неспецифическим бактерицидным действием. При многих воспалительных заболеваниях (фиброз, ревматоидный артрит) нейтрофильная миелопероксидаза способна вызвать повреждение ткани. Миелопероксидаза повышается в крови при воспалительном процессе в артериях, который часто вызывает разрушение жировых атеросклеротических отложений в стенке сосуда и последующий тромбоз. Поэтому **миелопероксидаза** является одним из наиболее точных диагностических параметров риска инфаркта или инсульта. В присутствии перекиси водорода миелопероксидаза окисляет анион хлора до гипохлорита, обладающего сильным антибактериальным действием за счёт вызываемого оксидативного стресса.



Лизоцим - белок с молекулярной массой около 14 000 Д; единственная полипептидная цепь состоит из 129 аминокислотных остатков и свёрнута в компактную глобулу (30×30×45 А). Трёхмерная конформация полипептидной цепи поддерживается 4 дисульфидными (— S — S —) связями. (В Л. молока человека их 3, яичного белка гуся — 2, в Л. фага Т4 их нет; чем больше дисульфидных групп, тем Л. более устойчив, но менее активен). Глобула Л. состоит из двух частей, разделённых щелью; в одной части большинство аминокислот (лейцин, изолейцин, триптофан и др.) содержит гидрофобные группы, в др. преобладают аминокислоты (лизин, аргинин, аспарагиновая к-та и др.) с полярными группами. Полярность окружения влияет на ионизацию двух карбоксильных групп (— COOH), расположенных на поверхности щели молекулы с разных её сторон (см. *рис.*). Л. действует на один из основных компонентов бактериальной стенки — сложный полисахарид, состоящий из двух типов аминсахаров. Полисахарид сорбируется на молекуле Л. в щели на границе гидрофобной и гидрофильной её частей таким образом, что с ферментом связывается 6 колец аминсахаров, а одна из соединяющих их гликозидных связей (между 4 и 5 кольцами) оказывается между карбоксилатами. Благодаря взаимодействиям между карбоксилатами Л. и атомами, образующими гликозидную связь, а также искажению валентных углов субстрата, происходит активация и разрыв связи. Это ведёт к разрушению оболочки бактериальной клетки.

Препарат Л. применяют при лечении глаз, носоглотки, дёсен, ожогах, в акушерстве и др..

Механизм лизиса при действии лизоцима.

Фермент атакует пептидогликаны (в частности, муреин), входящие в состав клеточных стенок бактерий (особенно Грам-положительных). Лизоцим гидролизует (1,4)-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином. Пептидогликан при этом связывается с активным центром фермента (в форме кармана), расположенным между двумя его структурными доменами. Молекула субстрата в активном центре принимает конформацию, близкую к конформации переходного состояния. В соответствии с механизмом Филлипса, лизоцим связывается с гексасахаридом, затем переводит 4-й остаток в цепи в конформацию твист-кресла. В этом напряженном состоянии гликозидная связь легко разрушается.

Остатки глутаминовой кислоты (Glu35) и аспарагиновой кислоты (Asp52) критичны для функционирования фермента. Glu35 выступает в качестве донора протона при разрыве гликозидной связи субстрата, разрушая связь, а Asp52 выступает в роли нуклеофила, при образовании интермедиата - гликозил-фермента. Затем гликозил-фермент реагирует с молекулой воды, в результате чего фермент возвращается в исходное состояние и образуется продукт гидролиза.

Нейтрофильная эластаза (НЭ). НЭ относится к группе сериновых протеаз, включающей в себя также **катепсин G** и **протеиназу 3**. Все они являются продуктом **нейтрофилов** и содержат в своем активном центре аминокислоту **серин**, что дало название их семейству.

НЭ концентрируется в азурофильных цито-плазматических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов. Синтез НЭ происходит на стадии роста гранулоцита, а в кровотоке поступают клетки с уже готовыми ферментами. Наибольшее количество НЭ определяется в нейтрофилах (1-2 пикограмма), которым протеаза обязана своим именем; каждый из них содержит около 400 гранул, наполненных эластазой. Незначительные концентрации определяются в моноцитах и Т-лимфоцитах. Таким образом, общее количество НЭ, готовой к реализации своего потенциала, в клетках циркулирующей крови весьма велико, что определяет значительную роль НЭ в тяжелых воспалительных реакциях, таких как сепсис и острый респираторный дистресс-синдром.

Ген, ответственный за синтез НЭ, расположен в периферийном локусе 19 хромосомы вместе с другими генами сериновых протеаз. Мутации в гене НЭ приводят к развитию редкого заболевания - циклической нейтропении.

НЭ участвует в **естественной деградации матриксных белков - эластина, коллагена,**

фибронектина, ламинина, протеогликанов. Кроме того, НЭ **расщепляет многие растворимые протеины - иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента и многие протеазные ингибиторы, в том числе ААТ (α 1-антитрипсина).** Весьма важным представляется значение НЭ как **регулятора воспаления**, причем в разных ситуациях она может выступать и как провоспалительный, и как противовоспалительный агент.

Катепсины - семейство лизосомальных протеиназ.

Катепсины цистеиновые: (B, C, H, F, L, K, O, S, V, W, X)

Катепсины сериновые: (A, G)

Катепсины аспартатные (аспартильные): (D, E).

Катепсины имеют оптимум функционирования при pH 4-5, что соответствует pH в лизосомах, но способны функционировать и при нейтральных значениях pH вне лизосом (но с меньшей эффективностью).

Дефензины (англ. *defensin*, от англ. *defense* - *защита*) - катионные пептиды иммунной системы, активные в отношении бактерий, грибков и многих оболочечных и без-оболочечных вирусов. Состоят из 18-45 аминокислот, в том числе 6-8 цистеиновых эволюционно консервативных остатков.

ИКК используют **дефензины** для уничтожения бактерий, поглощённых при фагоцитозе. **Дефензины** присоединяются к клеточной мембране микроба и углубляются в неё, формируя порообразные разрывы.

Дефензины млекопитающих по отличиям в структуре подразделяют на три группы: **альфа-дефензины, бета-дефензины и тета-дефензины.**

N-формил-метионин - аминокислота, инициирующая синтез любого из прокариотических белков, но не используемая трансляционной системой эукариот. Благодаря наличию у лейкоцитов **рецептора к трипептиду с этой аминокислотой**, они обладают аттракцией к «прокариотам вообще» - то есть к категории возбудителей инфекционных воспалений. Синтетические пептиды, содержащие N-формил-метионин, также стимулируют хемотаксис.

Естественные (натуральные) киллеры (англ. *Natural killer cells (NK cells)*) — большие гранулярные Лф, обладающие цитотоксичностью против опухолевых клеток и клеток, зараженных вирусами. 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**. 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 - уничтожение клеток организма, не несущих на своей поверхности МНС1 и таким образом недоступных для действия основного компонента противовирусного иммунитета - Т-киллеров. Уменьшение количества МНС1 на поверхности клетки может быть следствием трансформации клетки в раковую или действием вирусов, таких как папилломавирус и ВИЧ.

Субпопуляции НК экспрессируют молекулы суперсемейства иммуноглобулинов, регулирующие их цитотоксическую активность. Нормальные клетки-киллеры способны также поражать клетки-мишени, нагруженные антителами IgG, при участии своих рецепторов для IgG. Эта активность названа антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ).

Активированные НК выделяют гамма-интерферон и другие цитокины, которые могут играть важную роль в регуляции гемопоэза и иммунного ответа.

НК-клетки у человека составляют примерно **5% лимфоцитов периферической крови**. Чаще всего они имеют фенотип CD3-CD16+CD56+CD94+ и гаметное (неперестроенное) расположение генов. Таким образом, хотя НК относятся к лимфоидным клеткам, они лишены маркеров Т- и В-лимфоцитов.

НК узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеинов (паттерны), которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. Узнавание клетки-мишени и сближение с ней происходит за счет рецепторов НК. В результате НК активируются, и содержимое гранул выбрасывается во внеклеточное пространство. Главная роль принадлежит перфоруину (цитоллизину), имеющему структурное сходство с

компонентом комплемента С9 (антитела к перфоруину подавляют внеклеточное уничтожение). Перфорин встраивается в мембрану клетки-мишени и образует трансмембранные поры, что приводит к гибели клетки, поскольку содержимое клетки вытекает через эти поры. Кроме того, гранулы НК содержат две **сериновые протеинкиназы**, которые могут функционировать как цитотоксические факторы. **Хондроитинсульфат А** - протеогликан, устойчивый к протеинкиназам - тоже обнаружен в НК и может защищать эти клетки от автолиза.

При распознавании мишени НК-клетки способны как к "положительному", так и к "отрицательному" распознаванию.

В отличие от Т-киллеров НК-клетки несут рецепторы подавления цитотоксичности (KIR, англ. killer inhibitory receptor). При отрицательном распознавании взаимодействуя с молекулами МНС класса I на клетке-мишени, эти рецепторы дают инфицированной клетке сигнал торможения ее цитотоксической активности. Положительное распознавание происходит когда на клетках-мишенях отсутствует экспрессия молекул МНС, и взаимодействие НК-клеток с инфицированными клетками происходит с участием их собственных (НК-клеток) особых рецепторов, в частности CD2 и CD69, или антител, с которыми они связываются через рецептор для Fc (CD16). Связывание НК с антителами, образовавшими иммунные комплексы с антигенами на поверхности клеток-мишеней, интерпретируется как проявление киллерной клеточной активности, или антителозависимой клеточной цитотоксичности. К примеру **вирусы герпеса** пытаются избежать распознавание Т-киллерами, подавляя экспрессию молекул МНС класса I на поверхности инфицированных клеток; однако в этом случае вирус распознают НК-клетки.

Следовательно, цитотоксические Т-клетки (Т-киллеры) и НК-клетки можно рассматривать как два взаимодополняющих инструмента иммунитета против вирусной инфекции тканей.

Спектр клеток, подвергающихся литическому действию НК, достаточно широк. Это ряд вирусинфицированных и опухолевых клеток; клетки, на поверхности которых представлены цитофильные антитела; эмбриональные клетки.

Натуральные киллеры не способны к формированию иммунологической памяти. Их активность повышается под влиянием цитокинов Т-клеток и, в первую очередь, интерферона-гамма.

Рецепторы естественных киллеров

НК имеют систему рецепторов, распознающих молекулы собственных клеток организма. Кроме того, НК имеют множество рецепторов к стресс-индуцированным клеточным лигандам, которые свидетельствуют о повреждении клетки. К таким рецепторам относятся естественные рецепторы цитотоксичности (natural cytotoxicity receptors (NCRs), **NKG2D**). Они активируют цитотоксические функции НК.

Цитокиновые рецепторы

- В активации НК принимают участие цитокины IL-12, IL-15, IL-18, IL-2 и CCL5.

Fc рецепторы

- НК несут Fc рецепторы, которые активируют клетку при связывании с Fc фрагментами антител.

Система регуляторных рецепторов (inhibitory NK cell receptors): 2 семейства:

1) **killer lectin-like receptors (KLRs)** — гомологи рецепторов-лектинов С типа.

2) **killer cell immunoglobulin -like receptors (KIRs)** — рецепторы, содержащие иммуноглобулин-подобные домены.

Регуляторные рецепторы, связываясь с неповреждёнными молекулами МНС I, индуцируют ингибиторный сигнал, подавляя активацию НК.

НК являются цитотоксичными; в их цитоплазме находятся маленькие гранулы, содержащие перфорин и протеазы. Перфорин выделяется непосредственно возле инфицированной клетки и образует поры в её клеточной мембране, через которые заходят протеазы и другие молекулы, приводя к апоптозу или осмотическому лизису клетки. Выбор между апоптозом и лизисом имеет большое значение, поскольку при лизисе зараженной вирусом клетки произойдет освобождение вирионов, а апоптоз приведет к разрушению вирусов вместе с клеткой.

Дендритные клетки. В 1973 году Ральф Штайнман открыл новый вид клеток, которые назвал дендритными, поскольку внешне они напоминали дендриты нейронов. Клетки обнаружались во всех тканях организма, которые соприкасались с внешней средой: в коже, лёгких, слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. *Toll*-подобные рецепторы на их поверхности взаимодействуют с характерными молекулярными структурами на поверхности клеточной мембраны бактерии (РАМР), внутрь клетки идёт биохимический сигнал, и на поверхность дендритной клетки выносятся антигены, которые распознаются Т-клетками.

Под действием РАРМ дендритные клетки и макрофаги вырабатывают цитокины, также способствующие активации Т-клеток.

«Патоген-ассоциированные молекулярные образы» (*pathogen-associated molecular patterns* - РАРМ). Такими РАРМ служат молекулы, входящие в состав клеточной мембраны бактерий. Несмотря на химические различия, все эти структуры обладают следующими свойствами: они синтезируются только микроорганизмами (в клетках животных их нет, поэтому распознавание РАРМ расценивается иммунной системой как сигнал к началу борьбы с чужаком); они характерны для целого ряда патогенов, а не только для одного; эти структуры являются важными для жизнедеятельности бактерии, поэтому в процессе эволюции они меняются очень медленно (иначе иммунная система просто не успевала бы настраивать распознавание). Если бактерии удаётся прорвать «первую линию обороны» и избежать уничтожения макрофагами или гранулоцитами, то в борьбу должна включиться система приобретённого иммунитета.

При взаимодействии РАРМ с *Toll*-подобным рецептором на поверхности дендритной клетки появляются белки-антигены, которые и запускают адаптивный иммунный ответ Т-клеток. Компонентами мембраны клеточных бактерий, которые вызывают реакцию врождённого иммунитета, оказались липополисахариды - компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Толл-подобные рецепторы (*Toll-like receptor, TLR; от нем. toll - замечательный*) - класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ. Играют ключевую роль во врождённом иммунитете. Например, толл-подобный рецептор 4 узнаёт и связывается с консервативной структурой клеточной стенки грамотрицательных бактерий - липополисахаридом. Название получили благодаря сходству с белком, который кодируется открытым в 1985 году геном *Toll* у дрозофилы.

Известно 13 толл-подобных рецепторов млекопитающих, обозначаемых аббревиатурами от *TLR1* до *TLR13*, которые связывают различные лиганды и продуцируются в организме различными типами клеток.

У человека существует 10 толл-подобных рецепторов (от TLR1 до TLR10), у мыши - 12 (от TLR1 до TLR9, а также TLR11-13). Ген *TLR11* у человека содержит несколько стоп-кодона, и белок не синтезируется. Предполагается, что этот ген у человека репрессирован из-за гомологии естественного лиганда с профиллином человека и его потенциальной реакции на этот белок.

Профилин – это актин-связывающий белок, участвующий в обеспечении динамической нестабильности и реструктуризации актинового цитоскелета.

Функционирование толл-подобных рецепторов.

После активации **толл-подобных рецепторов** происходит их олигомеризация. Олигомерный рецептор способен связывать несколько внутриклеточных адаптерных белков, которые обеспечивают последующую передачу сигнала. Эти белки имеют участок специфического связывания с активированными толл-подобными рецепторами, *TIR* (от англ. *Toll-interleukin-1 receptor*) домен, который состоит из 3 консервативных участков, участвующих в белок-белковом взаимодействии. Всего существует 5 адаптерных белков с *TIR*-доменом: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM и SARM. Различные рецепторы имеют свой набор этих адаптерных белков необходимых для передачи сигнала. Только рецептор TLR4 способен связывать все 5 белков.

Типы. Толл-подобные рецепторы активируются различными лигандами, которые, главным образом, являются структурными компонентами бактерий, вирусов и грибов. Они также различаются по адаптерным белкам, с которыми связываются их цитозольные фрагменты. Рецепторы, как правило, локализуются на клеточной мембране, но могут быть и внутри клетки. Набор толл-подобных рецепторов варьирует в зависимости от типа клетки.

***Nod*-подобные рецепторы** (англ. *Nod-like-receptor, NLR*) - класс цитоплазматических клеточных рецепторов, относящихся к т.н. образ-распознающим рецепторам, или *PRR* (англ. *pattern-recognition receptors*). *Nod*-подобные рецепторы вместе с Толл-подобными рецепторами играют важную роль во врождённом иммунитете.

Классификация.

Известно по крайней мере 23 *Nod*-подобных рецепторов. Все они были недавно идентифицированы на основе анализа генома человека по их гомологии с белком-регулятором апоптоза Araf-1. *Nod*-подобные рецепторы классифицируются по их эффекторному домену.

Подсемейство NOD (NLRC) - рецепторы, содержащие CARD-домен (домен, рекрутирующий каспазу): NOD1, NOD2;

Подсемейство NALP (NLRP) - рецепторы, содержащие пириновый домен (PYR): NALP1, NALP2, NALP3 и т.д. Всего около 18 членов подсемейства;

Подсемейство NAIP - рецепторы с BIR доменом: собственно NAIP.

Fc-рецепторы лимфоцитов. Иммуноглобулиновые рецепторы. FcαRI (CD89) — рецептор для IgA типа I. Экспрессирован на моноцитах, тканевых макрофагах, эозинофилах. Иммуные комплексы, содержащие IgA-антитела, активируют моноциты и запускают образование этими клетками ФНО-α и ИЛ-1β. Нейтрофилы при распознавании таких комплексов начинают активнее продуцировать супероксид. CD89 участвует в запуске фагоцитоза, дегрануляции, дыхательного взрыва, а также реализации бактерицидности и других свойств клеток. Среди Fc-рецепторов особую роль отводят FcRn-рецепторам. Неонатальный Fc-рецептор для IgG — Fc-связывающая молекула, структурно и функционально отличающаяся от FcγR. FcRn относят к белкам семейства HLA класса I. Этот рецептор состоит из тяжелой цепи, связанной с р9-микроглобулином, и связывает два главных лиганда: IgG и сывороточный альбумин. Главная функция FcRn заключается в защите IgG и сывороточного альбумина от катаболизма после интернализации клеткой. Биологическая роль такого **механизма** - обеспечить транспорт **IgG** через эпителиальный и эндотелиальный барьеры, вовлеченные в трансмиссию IgG от матери к плоду. FcRn широко экспрессируются у взрослых людей клетками эпителия, эндотелия, паренхимы почек, макрофагами кишечника, ДК моноцитарного происхождения, но не Т- и В-клетками. Считают, что клетки, несущие FcRn, способны сохранять интернализированные IgG-молекулы (например, материнского происхождения) в нативной форме.

В организме ребенка IgG-антитела матери могут сохраняться до 8-9-месячного возраста. Возможно, подобный механизм позволяет сохранять определенный пул внутривенных иммуноглобулинов, применяемых с лечебной целью при многих заболеваниях.

Лекция № 6. Молекулярные взаимодействия в межклеточной кооперации при иммунном ответе.

Специфичность иммунного ответа, иммунологическая память, толерантность. Механизмы биотрансформации антигенов в организме. Роль молекул межклеточной адгезии в реализации иммунологических механизмов..

Специфичность иммунного ответа обусловлена механизмами клональной экспансии специфических по отношению к антигену клонов лимфоцитов. Конформационное сродство эпитопов и паратопов – фактор селекции таких клонов. Т.о., именно антиген является

ключевым фактором направления и интенсивности развертывающейся иммунологической реакции. Антиген может проявлять функции как позитивного, так и негативного регулятора интенсивности иммунологической реакции. В зависимости от структуры антигена, его дозы и маршрута введения реализуются разные сценарии специфического иммунного ответа - от гипериммунной реакции до антиген-специфической толерантности и иммунологического паралича. Антигены могут подвергаться в организме человека биотрансформирующим воздействиям (например, за счет действия монооксигеназных ферментов системы цитохрома P450)

Первичный и вторичный иммунный ответ. Роль клеток памяти в обеспечении большей аффинности синтезируемых антител и ускорении сроков развития вторичного иммунного ответа.

Молекулы межклеточной адгезии (ICAM) (англ. intercellular adhesion molecule) - это связанные с плазматической мембраной белки, которые обеспечивают механическое взаимодействие клеток друг с другом. Часто это молекулы, пронизывающие мембрану и присоединенные к цитоскелету; с их помощью клетки при движении могут подтягиваться к другим клеткам или перемещаться по внеклеточному матриксу.

Молекулы межклеточной адгезии могут взаимодействовать с несколькими лигандами, для чего служат разные участки связывания.

Молекулы адгезии расположены на поверхности клеток компактными кластерами, образуя таким образом участки многоточечного связывания.

Имуноглобулиноподобные САМ связывают клетки вместе посредством гетерофильного механизма: intercellular adhesion molecules (ICAM) экспрессируются на поверхности активированных эндотелиальных клеток, где они связываются с интегринами на поверхности белых кровяных клеток и, таким образом, помогают захватывать белые кровяные клетки в места воспаления.

Адгезия клеток одного типа к клеткам другого типа может изменяться в результате увеличения числа молекул адгезии на клеточной поверхности, либо при изменении их аффинности и/или avidности.

Существует два механизма увеличения числа молекул адгезии на поверхности клеток:

- 1) у многих клеток большие запасы этих молекул хранятся во внутриклеточных везикулах, которые способны через несколько минут после активации устремляться к

- поверхности цитоплазматической мембраны;
- 2) другой механизм состоит в синтезе молекул de novo и переносе их на поверхность (эти процессы занимают несколько часов).

Интегрины – трансмембранные белки, состоящие из двух цепей α и β . Их молекулы пронизывают мембрану клетки и как бы соединяют ее внутреннюю среду с внешней, что и отражает термин «интегрины».

В настоящее время установлено четырнадцать вариантов α -цепей и восемь β -цепей, причем лигандсвязывающий участок интегринов образуют пептидные цепи обоих типов. Группы интегринов обозначают по их β -цепям - $\beta 1$, $\beta 2$ и т.д..

Для реакций иммунитета особенно важны интегрины групп $\beta 1$ и $\beta 2$, поскольку они присутствуют на макрофагах, лимфоцитах и других клетках иммунной системы.

Рецепторами для интегринов служат ламинин, коллаген, фибронектин, а также некоторые продукты, относящиеся к суперсемейству иммуноглобулинов.

Связывание интегринов с лигандами требует присутствия двухвалентных ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (α -цепи имеют для этих ионов специальный металлосвязывающий участок). Например, рецептором $\beta 1$ -интегринов является **VCAM-1**, а $\beta 2$ -интегринов – три типа молекул **ICAM** (intercellular adhesion molecules).

Активированные клетки иммунной системы часто одновременно экспрессируют на своей поверхности как адгезины и интегрины, так и соответствующие лиганды к ним. Это увеличивает вероятность и плотность межклеточных контактов.

Селектины – белковые лектины (**С-лектины**), имеющие сродство к концевым остаткам маннозы, фукозы и сиаловой кислоты. Выделяют три группы этих молекул – P-, E- и L-селектины. Все они имеют схожее строение, основная разница заключается в количестве аналогичных, повторяющихся доменов, прилегающих к мембране (P-9, E-5, L-2).

L-селектин выполняет основную адгезивную функцию у лимфоцитов, а также частично у нейтрофилов;

P-селектины локализуются на мембранах эндотелиальных клеток, тромбоцитов и нейтрофилов;

E-селектины – основные селектины эндотелиальных клеток.

Молекулы, к которым селектины имеют сродство, называются **адресинами**.

Механизмы индукции В- и Т-Лф.

Фазы индукции В-лимфоцитов:

1. Первичная стимуляция в системе BCR-рецепторного комплекса (mIgM/CD79a/CD79b):

а) связывание свободных антигенов mIgM –рецепторами,

б) усиление и внутриклеточная трансляция активационного сигнала через молекулы CD79a,b, ассоциированные с mIgM.

2. Контактное взаимодействие с CD4 Т-лимфоцитами:

а) реакция на основе антигенных пептидов, презентируемых В-лимфоцитами в комплексе с МНС II. В этом случае В-лимфоцит, связавший антиген, выступает в роли антиген-презентирующей клетки, а костимулирующие сигналы генерируются в системе CD-зависимых контактов. Важной является связка CD40 от В-Лф и CD40L (CD154) от Т-лимфоцита. Сигналы, транслируемые через CD40, необходимы для переключения класса синтезируемых антител;

б) взаимодействие с Т-хелперами, активированными другими АПК.

3. Цитокин-зависимая дифференцировка В-лимфоцитов в результате воздействия Th2-цитокинов – ИЛ-4, 5, 6, 10.

Индукция (активация) Т-хелперов

1. Первичная стимуляция в системе TCR-рецепторного комплекса (α-β/ CD3/CD4):

а) МНС-II-зависимое распознавание антигенных пептидов на поверхности АПК (вариабельные домены α-, β- цепей TCR);

б) укрепление контактов с АПК на основе комплементарности МНС-II и CD4;

в) CD3/CD4-зависимое усиление антигенного сигнала.

2. Формирование костимулирующих контактов в системе комплементарных CD-молекул АПК и лимфоцита (CD80/86-CD28, CD58-CD2, CD54-CD11a).

3. Секреция цитокинов, поддерживающих пролиферацию и дифференцировку CD4 Т-лимфоцитов. Активированные АПК секретируют ИЛ-1, а сами Т-хелперы секретируют ИЛ-2. Секреция цитокинов сочетается с усилением экспрессии цитокиновых рецепторов (т.о., имеют место аутокринные и паракринные эффекты регуляции).

Подключение вспомогательных сигналов происходит в определенной

последовательности. Некоторые из контактных молекул (напр., CD4, CD2, CD28) **конститутивны**, т.е. присутствуют на покоеющихся клетках, другие (напр., CD23, CD152) являются **индуцибельными**, т.е. являются производными стимуляции и поэтому называются **маркерами активации** - активационными антигенами. Это положение распространяется и на цитокины и их рецепторы, гены которых экспрессируются при активации, отражая различные варианты изменения функционального состояния ИКК и обеспечивая избирательность иммунорегуляторных эффектов.

Схема индукции CD8 Т-лимфоцитов:

1. Первичная стимуляция в системе TCR (a-b, CD3,CD8):

- а) распознавание антигенных пептидов, презентруемых АПК в комплексе с молекулами МНС-I,
- б) укрепление контактов с АПК с участием обладающих взаимной комплементарностью молекул CD8 и МНС-I,
- в) CD3/CD8 опосредуют трансляцию в клетку активирующего сигнала.

2. Формирование вспомогательных костимулирующих контактов в системе взаимокплементарных CD-молекул АПК и лимфоцитов (особенно значим контакт CD80/CD86-CD28). Происходит созревание рецепторов для ИЛ-2.

3. Цитокиновая регуляция преимущественно за счет ИЛ-2, секретруемого Th1-лимфоцитами, а также за счет аутокринной регуляции ИЛ-2, секретруемого самими CD8 Т-лимфоцитами.

Лекция № 7. Воспаление.

Признаки воспаления и физиологическое значение этого процесса. Классификация типов воспаления. Контроль и регуляция воспаления медиаторами и регуляторами различного типа. Медиаторы воспаления: гистамин, серотонин, кинины, анафилатоксины. Метаболиты арахидоновой кислоты и их роль в процессах иммунорегуляции. Участие системы комплемента в развитии воспаления. Классический и альтернативный пути активации комплемента. Участие клеток СМФ в развитии и контроле воспалительных процессов.

Воспаление - типовой патологический процесс, заключающийся в преимущественно защитной реакции организма на различные болезнетворные воздействия.

Факторы, вызывающие воспаление:

Физические факторы:

- — травма (разрезы, уколы, укусы, ушибы, вибрация, воздействие шума, сдавление);
- — ионизирующая, ультрафиолетовая радиация;
- — электрическая энергия;
- — высокие (огонь) и низкие (холод) температуры.

Химические факторы:

- — кислоты;
- — щелочи;
- — минеральные и органические вещества;
- — эндогенные токсины (желчные кислоты, продукты азотистого обмена).

Биологические факторы:

- — вирусы;
- — бактерии;
- — грибы;
- — животные паразиты;
- — циркулирующие в крови антитела и активированные иммунные комплексы.

Воспаление выражается в следующих реакциях:

Повреждение тканей (альтерация),

Нарушение микроциркуляции с повышением сосудистой проницаемости,

Экссудация и миграция лейкоцитов,

Пролиферация, т.е. образование новых тканевых элементов.

Т.о., единый **комплекс трех компонентов: альтерация, экссудация с миграцией и пролиферация** составляют сущность воспаления, как качественно своеобразный процесс. Без любого из этих компонентов нет воспаления, но каждый из них может существовать самостоятельно вне воспалительной реакции.

Таблица **Медиаторы острого воспаления:**

Медиатор	Вазодилатация	Увеличение проницаемости		Хемотаксис	Опсонизация	Боль
		Немедленное	Отсроченное			
Гистамин	+	+++	—	—	—	—
Серотонин	+	+	—	—	—	—

Брадикинин	+	+	—	—	—	+++
Комплемент 3a	—	+	—	—	—	—
Комплемент 3b	—	—	—	—	+++	—
Комплемент 5a	—	+	—	+++	—	—
Простагландины	+++	+	+?	+++	—	+
Лейкотриены	—	+++	+?	+++	—	—
Лизосомальные протеазы	—	—	++1	—	—	—
Кислородные радикалы	—	—	++1	—	—	—

Ацетилхолин (лат. *Acetylcholinum*) — биогенный амин, хим. передатчик нервного возбуждения в холинергич. синапсах.

Синтезируется в организме из **холина** и **СНЗСООН** при участии **холинацетилтрансферазы**. Это химически нестойкое вещество, которое в организме при участии специфического фермента холинэстеразы. (ацетилхолинэстеразы) легко разрушается с образованием холина и уксусной кислоты).

Ацетилхолин накапливается в тканях не только при воспалении, но и при других патологических процессах, сопровождающихся повреждением ткани. Одновременно с накоплением ацетилхолина происходит снижение активности **холинэстеразы**.

Гистамин (Histaminum). 4-(2-Аминоэтил)-имидазол, или β-имидазолил-этиламин.

50% гистамина выделяется в первые 30 минут после начала острого воспаления. Под влиянием гистамина уже в малых концентрациях увеличивается проницаемость сосудов, а затем происходит расширение прекапиллярных сфинктеров, метартериол и артериол, а также изменяются физико-химические свойства коллоида эндотелия. Под влиянием гистамина происходит повышение протеолитической активности крови, снижение уровня ингибиторов протеаз и активация колликреин-кининовой системы.

Гистамин образуется в тучных клетках из **гистидина** под влиянием

гистидиндекарбоксилазы и находится в гранулах. Кроме того, гистамин освобождается из связи с белками в соединительной ткани при их денатурации.

Серотонин обладает прессорным действием, особенно по отношению к венулам, а также повышает проницаемость сильнее, чем гистамин.

Серотонин играет роль в ранней фазе повышения проницаемости у животных (крыс и мышей), у которых этот медиатор содержится в тучных клетках. У человека **серотонин**, в основном, содержится в клетках **энтерохромаффинной системы**, в желудочно-кишечном тракте и в ткани мозга. При воспалении у человека **серотонин** выделяется, в основном, из тромбоцитов, в которых содержится в большом количестве.

Кинины – физиологически и иммунологически активные пептиды.

В механизме воспалительной реакции большую роль играют пептиды, получившим название **кининов** (от греч. *kinéo* — двигаю, побуждаю).

Кинины - группа олигопептидов с большим спектром физиологической активности, участвующих в регуляции тонуса сосудов, уровня АД, сосудистой проницаемости, болевых реакций организма.

Кинины образуются как эффекторные субстанции **калликреиновой системы** и являются связующим звеном между системами регуляции сосудистого тонуса и системами свертывания крови и фибринолиза.

В тканях млекопитающих идентифицированы **четыре типа кининов**: **нонапептид брадикинин, каллидин, Met-Lys-брадикинин и Т-кинин.**

Кинины играют главную роль в развитии воспаления, вызывая все его основные признаки при введении **кининов** в кровь или кожу человека. Особено важно свойство кининов освобождать **цитокины** такие как **ИЛ-1, ФНО α** и другие вторично генерируемые медиаторы, в том числе, **НО, простагландины и лейкотриены**, образующиеся в рез-те активации фосфолипазы А2 кининами.

Реализация многообразных эффектов кининов определяется:

- (а) наличием и активностью энзимов, участвующих в метаболизме этих пептидов - **ангиотензин-превращающего фермента и нейтральной эндопептидазы;**
- (б) наличием и уровнем экспрессии **кининовых рецепторов**, воспринимающих эффекторный сигнал;

(в) соучастием других регуляторных субстанций, модулирующих специфичность физиологической/патофизиологической реакции.

Калликреины и прекалликреины.

Калликреины - **группа трипсиноподобных сериновых протеиназ**, локализованных в плазме крови (*плазменный калликреин*) и тканях некоторых органов, в частности в поджелудочной и слюнной железах и их секретах, стенке кишечника, почках и моче, половых и потовых железах (*тканевые калликреины*).

Калликреины регулируют освобождение **кининов** из **кининогенов**. **Калликреины** образуются из своих предшественников **прекалликреинов**.

Прекалликреин - **предшественник калликреина** плазмы крови, является гликопротеином, представленным одной пептидной цепью, состоящей из 619 аминокислотных остатков. Синтезируется **прекалликреин** в гепатоцитах, кодируется геном прекалликреина.

Прекалликреин активируется путем расщепления, катализируемого активными формами фактора XIIa свертывания крови (аXIIa и вXIIa), с образованием легкой и тяжелой цепей, связанных одной дисульфидной связью.

Легкая цепь содержит **каталитический домен**, типичный для **сериновых протеиназ**.

Тяжелая цепь состоит из 4-х повторяющихся доменов, в значительной мере гомологичных доменам **фактора XI гемокоагуляции**. Тяжелая цепь имеет участки связывания ВМК (**высокомолекулярного кининогена**), фактора XII и центр, взаимодействующий с **нейтрофилами**.

Брадикинин (греч.: βράδνς - медленный) - основное физиологически активное вещество **калликреин-кининовой системы**.

Брадикинин - полипептид, состоящий из девяти аминокислот.

Образуется в крови, оказывает выраженный сосудорасширяющий эффект, увеличивает проницаемость капилляров и вызывает сокращение гладкой мускулатуры. Играет важную роль в качестве **медиатора воспаления**.

Каллидин [синоним: *лизил-брадикинин, Lis-брадикинин, (греч.: κάλλος - красота; κάλλι - прекрасный + δύν- вероятно от δύναμις - сила, способность, могущество, значение, свойство)*] - кинин, образующийся в ответ на повреждение из кининогена под действием **калликреина**.

Каллидин является декапептидом. От брадикинина **каллидин** отличается наличием дополнительной аминокислоты на N-конце молекулы (лизин). Аминопептидаза катализирует распад каллидина до брадикинина.

Белки острой фазы воспаления (стресс-белки)

C-реактивный белок, сывороточный амилоидный A-белок, альфа1- антитрипсин, альфа2-макроглобулин, фибриноген, церулоплазмин, компонент комплемента C9 и фактор В, лактоферрин, белок SAA.

C-реактивный белок (CRP) - основной белок этой группы.

CRP, взаимодействуя с **фосфорилхолином** бактериальной стенки, выступает и как **опсонин** и как индуктор классического пути активации системы комплемента.

CRP человека состоит из пяти идентичных, нековалентно связанных полипептидных цепей, образующих замкнутый пентамер.

Важное свойство **CRP** - способность связываться при участии кальция с микроорганизмами, у которых в состав мембраны входит **фосфорилхолин**. Образовавшийся комплекс активирует систему комплемента (по классическому пути). Это приводит к связыванию C3b с поверхностью микроба, и в результате микроб опсонизируется, т.е. подготавливается к фагоцитозу.

Белок, связывающий маннозу (МСБ) -еще один белок острофазного ответа. Его структура подобна C1 -компоненту комплемента. В противои инфекционном ответе МСБ выполняет две функции:

выступает в качестве опсонина, взаимодействуя с маннозой бактериальных стенок,

2) активирует протеолитический белковый комплекс, который расщепляет C4 и C2 компоненты комплемента, т.е. инициирует развитие классического пути активации системы комплемента.

Что такое острофазовая реакция? Какие белки крови в ней участвуют?

Острофазовая реакция — сложный каскад в основном синтезированных печенью белков, содержание которых увеличивается при различных инфекциях или иммунном стимуле. Эта реакция проявляется многочисленными метаболическими и клеточными изменениями, которые обеспечивают защиту и поддержание гомеостаза.

Основные белки острой фазы воспаления (острофазовые белки) включают альфа-1-антитрипсин, СЗ, церулоплазмин, С-реактивный белок (СРВ), фибриноген, гаптоглобин, сывороточный амилоид А.

Какие механизмы запускают острофазовую реакцию (ОФР)?

Макрофаги и моноциты — основные клетки инициации ОФР. Активированные антигеном или другим раздражителем макрофаги секретируют ИЛ-1, ИЛ-6 и фактор некроза опухоли. ИЛ-6 — мощный гепатоцитстимулирующий фактор, увеличивающий синтез белков в острой фазе воспаления. ИЛ-1 облегчает действие ИЛ-6 на гепатоциты.

Главным условием успешного хода репаративного процесса при воспалении является затухание острых альтеративных и экссудативных изменений. Это достижимо лишь при условии полной деструкции или устранения флогогенного агента. Если флогогенный агент полностью не устранен, воспаление может стать хроническим и не приведет к полной реституции.

Второе условие перехода к репаративным процессам требует активизации действия противовоспалительных медиаторов.

К противовоспалительным медиаторам относятся ингибиторы экссудации и литических ферментов, инактиваторы провоспалительных сигнальных молекул, антиагреганты, антикоагулянты и фибринолизин.

Наиболее важные противовоспалительные медиаторы:

• Гепарин — медиатор из группы протеогликанов. Гепарин освобождается из гранул мастоцитов, эозинофилов и базофилов, а также синтезируется макрофагами и фибробластами заново. Гепарин связывает биогенные амины, ингибирует комплемент, коагуляцию, адгезию и агрегацию, снижает активность кининовой системы. Вместе с тем, гепарин служит структурным компонентом межклеточного вещества соединительной ткани и участвует в процессах регенерации в качестве строительного блока.

• Хондроитинсульфаты — медиаторы той же группы протеогликанов. Их источники и эффекты близки к гепариновым. Хондроитин-сульфаты входят в состав сосудистых стенок и значительно снижают проницаемость гистогематических барьеров.

• Апопротеин Е — медиатор макрофагального происхождения. Противовоспалительное действие данного медиатора связано с его иммуносупрессивной активностью. Кроме того,

апопротейн Е способствует транспорту стероидов, обладающих противовоспалительным эффектом.

Ингибиторы протеаз — разнообразны белки макрофагального происхождения, включая α 1-антитрипсин, α 2-микроглобулин, ингибиторы комплемента и плазмина, ТФРВ.

Данные медиаторы подавляют активность лизосомальных гидролаз и сторожевой полисистемы плазмы крови, уменьшая альтерацию и ликвидируя последствия экзоцитоза.

Наиболее известен из этой группы белков α 1-антитрипсин, так как его наследственный дефицит ведет к усиленной альтерации бронхолегочного аппарата при респираторных заболеваниях, что не позволяет разрешения бронхита и пневмонии полной реституцией и постепенно приводит к развитию эмфиземы легких, сопровождаемой у ряда больных циррозом печени. α 1-антитрипсин способен подавлять активность тромбина и других протеаз системы коагуляции.

Антифосфолипазы - важный класс противовоспалительных антиферментов, описанные под названиями «макрокортин», «ренокортин», «липомодулин». Все эти молекулы возникают в ходе ступенчатого протеолиза единого предшественника. Антифосфолипазы ингибируют образование медиаторов арахидонового каскада, а их синтез стимулируется глюкокортикоидными гормонами. Антифосфолипазы вырабатываются макрофагами.

Их действие опосредуется в клетках выработкой белковых ингибиторов фосфолипазы А.

Антиоксиданты — сульфгидрильные и металлосодержащие белки, инактивирующие активные кислородные радикалы и липоперекиси или прерывающие разветвленные цепные реакции, в связи с хелатированием железа. Антиоксиданты поставляются в очаг воспаления макрофагами и плазмой крови, поскольку кровь, в ходе иммунного ответа, насыщается глобулинами острой фазы, многие из которых проявляют антиокислительные свойства. К данной группе относятся церулоплазмин, гаптоглобин, гемопексин, транскобаламин, пероксидаза, супероксиддисмутаза, β 2-микроглобулин, амилоид А и С-реактивный белок.

Инактиваторы воспалительных медиаторов разрушают сигнальные молекулы, поддерживающие ход остро́го воспаления.

Арилсульфатаза ПВ - фермент эозинофильного происхождения, инактивирующий

лейкотриены. По содержанию арилсульфатазы эозинофилы превосходят другие гранулоциты в 8 раз.

Гистаминаза и кининаза содержатся в эозинофилах и нейтрофилах. Гистаминаза способствует окислительному дезаминированию гистамина в имидазолуксусную кислоту. Моноциты также содержат инактиваторы воспалительных медиаторов, например, гистаминметилтрансферазу, деактивирующую гистамин.

Полиамины (кадаверин, путресцин, спермин и спермидин), вырабатываемые различными клетками при участии орнитиндекарбоксидазы, подавляют экссудацию и оказывают стимулирующий эффект на клеточную пролиферацию.

Полиамины служат универсальными внутриядерными посредниками для действия соматомединов, а через них - и соматотропина, на процессы пролиферации.

Среди моноаминов выраженным стимулирующим действием на фиброгенез и синтез коллагена обладает серотонин.

Липоксины, вырабатываемые нейтрофилами из арахидоновой кислоты, представляют группу липидных противовоспалительных медиаторов.

Некоторые простагландины и лейкотриены также проявляют противовоспалительный эффект, оказывая иммуносупрессорное действие.

Глюкокортикоидные гормоны.

Их противовоспалительное действие связано с:

- 1) стимуляцией продукции макрофагальных антифосфолипаз, тормозящих арахидоновый каскад,
- 2) с подавлением экспрессии генов интерлейкинов,
- 3) индукцией апоптоза лимфоцитов и эозинофилов.

Интерлейкин-10, выделяемый Т-лимфоцитами, служит ингибитором продукции прочих цитокинов, блокирует функции Т-хелперов первого типа и может рассматриваться в роли понижающего регулятора воспалительных, а в частном случае, аллергических процессов различного типа.

Мощный фактор негативной регуляции иммуногенеза - Трансформирующий фактор роста β (TGF- β).

Лекция № 8. Цитокиновые механизмы регуляции иммуногенеза. Классификация цитокинов. Хемоаттрактанты, интерлейкины, колоние-стимулирующие факторы, факторы некроза опухоли, интерфероны. Характеристика механизмов продукции и действия цитокинов.

Цитокины — группа гормоноподобных *белков и пептидов, которые* синтезируются и секретируются клетками иммунной системы и другими типами клеток.

Термин «цитокины» предложен S. Cohen в 1974 г.

Цитокины - это гидрофильные сигнальные вещества, действие которых опосредовано *специфическими рецепторами* на внешней стороне плазматической мембраны.

Связывание цитокинов с рецептором приводит через ряд промежуточных стадий к активации транскрипции определенных генов.

Цитокины (от греч. *cytos* — клетка и *kines* — приводить в движение) - это группа из более, чем 100 молекул, медиаторов белковой природы.

По химической структуре - пептиды/гликопептиды с мол. массой 8—40 кДа, некоторые — до 80кДа.

Подавляющее большинство цитокинов в качестве характерного структурного элемента содержит 4 α -спирали и лишь для немногих (ИЛ-1, ФНО β , трансформирующий фактор роста) характерно преобладание β -слоистой структуры.

Биологические функции цитокинов подразделяются на три группы:

- 1) управляют *развитием и гомеостазом иммунной системы,*
- 2) осуществляют контроль за *ростом и дифференцировкой клеток крови* (системой гемопозза), принимают участие также в управлении апоптозом,
- 3) принимают участие в *неспецифических защитных реакциях* организма, оказывая влияние на воспалительные процессы, свертывание крови, кровяное давление.

Цитокины действуют как многофакторный, полифункциональный механизм, который обеспечивает межклеточные коммуникации, необходимые для индукции и реализации иммунного ответа, регуляции гемопозза, воспалительных и репаративных процессов.

Основная биологическая активность цитокинов - регуляция иммунного ответа на всех

этапах его развития, в которой они играют центральную роль. В целом вся эта большая группа эндогенных регуляторов обеспечивает самые разнообразные процессы, такие как:

- пролиферация и дифференцировка предшественников функционально активных иммунокомпетентных клеток,
- хемотаксис,
- изменение экспрессии антигенов и различных маркеров,
- переключение синтеза иммуноглобулинов ,
- индукция цитотоксичности у макрофагов ,
- формирование очага воспаления.

Различают **интракринный, аутокринный, паракринный и эндокринный** механизмы действия цитокинов.

1. Интракринный механизм - действие цитокинов внутри клетки -продуцента; связывание цитокинов со специфическими внутриклеточными рецепторами.

2. Аутокринный механизм - действие секретируемого цитокина на саму секретирующую клетку. Например, интерлейкины-1, -6 -18, ФНО α являются аутокринными активирующими факторами для моноцитов/макрофагов.

3. Паракринный механизм - действие цитокинов на близкорасположенные клетки и ткани. Например, ИЛ-1, -6 -12 и -18, ФНО α , продуцируемые макрофагом, активируют Т-хелпер (Th0), распознающий антиген и МНС макрофага.

4. Эндокринный механизм - действие цитокинов на расстоянии от клеток-продуцентов. Так, ИЛ-1, -6 и ФНО α , помимо ауто- и паракринных воздействий могут оказывать дистантное иммунорегуляторное действие, проявлять пирогенный эффект, индуцировать выработку белков острой фазы гепатоцитами, вызывать симптомы интоксикации и мультиорганные поражения при токсико-септических состояниях.

Признаки, по которым цитокины отличаются от классических гормонов:

1. Цитокины выделяются активированными клетками; базальный уровень их секреции незначителен. То же самое справедливо для клеток, которые служат мишенью для цитокинов: покоящиеся клетки, как правило, к ним нечувствительны.

Это говорит об индуцибельности генов, определяющих синтез цитокинов и их

рецепторов. Факторы, побуждающие к образованию цитокинов, многообразны. Это сами цитокины (гомологичные или гетерологичные), другие эндогенные медиаторы, микробные продукты, антигены (для лимфоцитов). Классическим индуктором макрофагальных цитокинов является липополисахаридный эндотоксин грамотрицательных бактерий. Для Т-лимфоцитов мощным стимулом служат так называемые суперантигены, которые в отличие от обычных антигенов неспецифически активируют лимфоциты, вызывая гиперпродукцию цитокинов.

2. В норме в кровь поступает минимальное количество цитокинов, большинство из них действует в зоне выделения (местные гормоны). Они влияют на соседние клетки (паракринный эффект) или на клетки, которые их продуцируют (аутокринный эффект). Эффекты телекринного (системного) типа проявляются у ограниченного числа цитокинов и обычно сопутствуют нарушениям гомеостаза.

3. Цитокины обладают полифункциональностью с перекрыванием (избыточностью) биологических эффектов. Это означает, что действие каждого цитокина вызывает не один, а несколько (нередко множество) эффектов, часть из которых дублируется другими цитокинами. Продукция и биологические эффекты цитокинов могут усиливаться действиями других цитокинов и наоборот, — некоторые из них находятся в антагонистических взаимоотношениях, подавляя секрецию и активность друг друга. Полифункциональность, избыточность и взаиморегуляция говорят о том, что система цитокинов организована и функционирует по сетевому принципу (сеть цитокинов), когда воздействие на единственное звено выводит из равновесия весь механизм.

Факторы, побуждающие к образованию цитокинов (Индукторы цитокинов:

1. Сами цитокины (гомологичные или гетерологичные),
2. Различные эндогенные медиаторы,
3. Микробные продукты (например, липополисахаридные эндотоксины грамотрицательных микроорганизмов),
4. Антигены (для лимфоцитов)

Номенклатура цитокинов.

Интерлейкины (ИЛ). Термин отражает ключевую позицию цитокинов в межлейкоцитарных взаимодействиях. Известно более 20 интерлейкинов, которые обозначаются номерами в порядке открытия (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3 и т.д.).

Колонiestимулирующие факторы (КСФ). Их первое описание связано с разработкой методов получения колоний кроветворных клеток *in vitro*. По преобладающему эффекту на гемопоэз выделяют три КСФ: гранулоцитарный (Г-КСФ); моноцитарный (М-КСФ) и гранулоцитарно-моноцитарный (ГМ-КСФ).

Функцией гемопоэтинов обладают и другие цитокины, такие как ИЛ-3, ИЛ-7 (лимфопоэтин), фактор стволовых клеток, эритропоэтин. Они часто действуют в комплексе, хотя каждый обладает элементами специфичности.

Интерфероны (ИНФ). Открыты в опытах с интерференцией вирусов как факторы, вызывающие устойчивость клеток к вирусной инфекции. Такой активностью обладают главным образом ИНФа и ИНФб (интерфероны I типа). ИНФг (интерферон II типа, иммунный интерферон) играет важную роль в индукции и реализации иммунного ответа (регуляция Th1/Th2-баланса, стимуляция макрофагов, регуляция экспрессии МНС I и II).

Факторы некроза опухоли (ФНО). Название отражает способность вызывать гибель (апоптоз) опухолевых клеток. Главными источниками являются активированные макрофаги (ФНОа) и Т-лимфоциты (ФНОб или лимфотоксин).

Трансформирующий фактор роста (ТФРб). Название дано в связи со способностью вызывать опухолевую трансформацию нормальных клеток, растущих в культуре. При действии на иммунную систему преобладают ингибирующие эффекты, в частности подавление синтеза других цитокинов.

Хемокины (хемотаксические цитокины). Семейство включает около 40 наиболее мелких цитокинов (мол. масса 8—12 кДа). Название дано по основному эффекту — стимуляции хемотаксиса лейкоцитов.

Характеристика структуры и функции ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО, ИНФ.

Интерлейкин 1 (IL-1a, IL-1b) с мол. весом 17 кД. Методами рентгеноструктурного анализа установлено, что ИЛ-1 представляет собой глобулу, N- и C-концевые последовательности которой находятся в пространственной близости. Именно эти концевые участки молекулы формируют центр, взаимодействующий с соответствующим рецептором. Структура обоих интерлейкинов включает 12-14 β-складок, образующих бочкообразный или цилиндрический белок.

IL -1 представляет собой систему из трех молекул: IL-1a , IL-1b , IL-1Ra (антагонист рецептора IL -1) и двух рецепторов IL -1 R1 и IL -1RII .

Интерлейкин 2 (IL-2). Этот цитокин с молекулярной массой 15 kDa играет исключительно важную роль в реализации механизмов иммунного ответа. Продукентами IL-2 являются Th 1-клетки. Помимо участия IL-2 в дифференцировке и пролиферации Т-лимфоцитов, этот лимфокин принимает непосредственное участие в реализации механизмов противоопухолевой защиты. Так, IL-2 повышает литическую активность НК-клеток, а также индуцирует клетки системы ЛАК (лимфокинактивированные киллеры). Кроме того, IL-2 усиливает секрецию IFN γ Т-лимфоцитами. Определение IL-2 является наилучшим показателем активации Т-клеток в *in vitro* тестах.

Фактор некрóза óпухоли (ФНО, фактор некроза опухоли-альфа, англ. *tumor necrosis factor, TNF*) - внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, образующийся в основном моноцитами и макрофагами. Влияет на липидный метаболизм, коагуляцию, устойчивость к инсулину и функционирование эндотелия.

Растворимый рецептор к фактору некроза опухолей I (sTNF-RI).

TNF проявляет свою биологическую активность при связывании со специфическими высокоаффинными мембранными рецепторами.

TNF-RI (CD120a), является белком с М.м. 55-60 kDa (p55) и экспрессируется клетками большинства типов тканей. Активация различных типов клеток приводит к протеолитическому расщеплению мембранных рецепторов и образованию их растворимых форм.

sTNF-RI стабилизирует циркулирующий TNF и увеличивает период полураспада данного цитокина. Он принимает участие в апоптозе и образовании герминативного центра, а также обладает антивирусной активностью. Уровень sTNF-RI повышен в сыворотке пациентов с онкологическими заболеваниями, хронической почечной недостаточностью и в бронхо-альвеолярном лаваже пациентов, страдающих ARDS (респираторный дистресс-синдром у взрослых). Уровень sTNF-RI также коррелирует со степенью тяжести паразитемии и малярии у человека.

Растворимый рецептор к фактору некроза опухолей II (sTNF-RII).

TNF-RII (CD120b) является белком с М.м. 75-80 kDa (p75), экспрессируется клетками большинства типов тканей. При активации клеток происходит протеолиз мембранных рецепторов, в результате чего образуются растворимые формы. sTNF-RII стабилизирует циркулирующий TNF и увеличивает период полураспада данного цитокина в сыворотке крови. Определение sTNF-RII позволяет оценить состояние иммунной системы.

TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей; TNF receptor-associated factor 6) – цитозольный адаптерный белок, относящийся к семейству факторов, связанных с рецептором ФНО (TRAF).

Важный компонент нескольких сигнальных путей, регулирующих воспаление и иммунитет.

Интерфероны – группа индуцибельных гликопротеинов с молекулярной массой от 17 до 80 кД.

Синтезируются клетками человека и животных под влиянием различных индукторов (вирусов, бактерий, простейших, различных микробных антигенов, нуклеиновых кислот, синтетических соединений и др.) и обладают противовирусной, антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью.

Образование интерферона состоит из двух фаз:

I фаза.

- Индукция интерферона при адсорбции вируса на клетке.
- Захват индуктора.
- Процесс инициации индуктора.
- Депрессия генов интерферона.
- Транскрипция иРНК для интерферона.

II фаза.

- Трансляция иРНК-интерферона.
- Образование интерфероида.
- Гликозирование интерфероида и образование интерферона.
- Выделение интерферона.

Взаимодействие интерферона с клеткой

1. Адсорбция на рецепторах клетки.
2. Индукция противовирусного состояния.

3. Развитие противовирусной резистентности.
4. Образование интерферон-индуцируемых белков.
5. Выраженная резистентность клетки.

Свойства интерферона.

- Экзогенный интерферон проявляет свое максимальное действие, если заражение клетки ещё не произошло.
- Стимулирует фагоцитоз
- Угнетает рост клеток
- Угнетает АТ-образование.
- Способствует усилению активности ЦТЛ.

Механизм противовирусного действия интерферона. Интерферон не влияет на адсорбцию вируса, на виropексис, на процесс высвобождения НК вируса, не влияет на композицию вирусной частицы и ее выход. Интерферон не действует на внеклеточный вирус в отличие от антител.

Интерферон подавляет репликацию вируса, т.е. он действует на вирус опосредованно, через чувствительную клетку в которой не нарушен синтез клеточной иРНК и клеточных белков.

Интерфероны делятся на экзо- и эндогенные. Эндогенные интерфероны образуются в пораженной клетке в ответ на введение вируса, т.е пока введенный вирус не успел достаточно разрушить клетку. Экзогенный интерферон попадает в клетку извне.

Дихотомия Т-хелперов на Тх-1, Тх-2, Тх-17: значение цитокинов и рецепторов к цитокинам в этом феномене.

Действие цитокинов тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями организма. Одной из важнейших функций системы цитокинов является обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной системы в ответ на стресс. Большую роль цитокины играют в формировании патогенеза опухолевых заболеваний иммунной системы. Эти заболевания развиваются из клеток основных продуцентов и/или потребителей цитокинов. **Гены цитокинов сопряженно активируются с онкогенами при хромосомных абберациях и при ретровирусных инфекциях.**

Вследствие этого опухолевые клетки продуцируют цитокины, стимулирующие пролиферацию неопластических иммунокомпетентных клеток.

Поскольку цитокины являются локальными медиаторами, целесообразно измерять их уровни в соответствующих тканях после экстракции тканевых протеинов или в естественных жидкостях.

Уровни цитокинов в сыворотке или других биологических жидкостях отражают текущее состояние работы иммунной системы, т.е. синтез цитокинов клетками организма *in vivo*.

Определение уровней продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови (МПК) *in vitro* показывает функциональное состояние клеток. Спонтанная продукция цитокинов МПК в культуре свидетельствует, что клетки уже активированы *in vivo*.

Индукцированный (различными стимуляторами, митогенами) синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул (в частности, на действие лекарственных препаратов).

РЕЦЕПТОРЫ К ЦИТОКИНАМ. Действие цитокинов на клетку-мишень опосредуется **высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами**. Все рецепторы цитокинов представляют собой **трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание цитокина.**

Большинство цитокиновых рецепторов - это мембранные гликопротеины 1 типа, состоящие из одного единственного трансмембранного домена. Однако, действительно функциональные рецепторы, как правило, состоят из двух или большего числа субъединиц, которые могут иметь одинаковую структуру даже у различных по специфичности рецепторных комплексов. Обычно, рецептор содержит «частную» высокоспецифичную субъединицу, способную связывать определенный цитокин, и «общую» субъединицу, которая встречается в рецепторах для других цитокинов. Например, рецепторный комплекс для ИЛ-2 состоит из трех субъединиц (a, b, g).

В составе клеточных мембран одни цепи реагируют только с определенным цитокином, в то время как другие способны формировать **общие рецепторы для разных цитокинов.** **Наличие общих структур в рецепторах может обуславливать функциональное сходство ряда цитокинов.**

Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином, - это отщепленный ферментом

внеклеточный домен мембранного рецептора. Растворимые рецепторы сохраняют высокую аффинность в отношении своих лигандов и благодаря этому способны нейтрализовывать цитокины, препятствуя их доступу к интактным мембранным рецепторам.

Растворимые рецепторы могут выполнять **функции конкурирующих антагонистов**, а также участвовать в транспорте, доставке цитокинов в очаг поражения и выведении их из организма.

Многие рецепторы цитокинов состоят из **2-3 субъединиц**, кодируемых разными генами и экспрессируемых независимо. Для формирования высокоаффинного рецептора требуется одновременное взаимодействие всех субъединиц. **Отдельные субъединицы** рецепторного комплекса ИЛ-2 являются общими для ИЛ-2 и некоторых других цитокинов. Так, **β -цепь** является одновременно компонентом рецептора для **ИЛ-15**, а **γ -цепь** служит общей субъединицей рецепторов для **ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-9, ИЛ-15 и ИЛ-21**. Рецепторная субъединица **gp140** для рецепторов ИЛ-3, ИЛ-5 и ГМ-КСФ, рецепторная субъединица **gp130**, общая для членов семейства ИЛ-6.

Связывание цитокинов с рецептором приводит через ряд промежуточных стадий к активации транскрипции определенных генов. Пример: Рецептор **ИЛ-6** (IL-6) после связывания с лигандом стимулирует димеризацию **GP130**. Димер мембранного белка **GP130** связывает и активирует цитоплазматическую **тирозинкиназу ЯК-семейства** (Янус-киназы, имеющие два активных центра). **Янус-киназы фосфорилируют цитокиновые рецепторы, БПС и различные цитоплазматические белки, которые осуществляют дальнейшую передачу сигнала; они также фосфорилируют факторы транскрипции - переносчики сигнала и активаторы транскрипции (STAT, от англ. signal transducers and activators of transcription)]**. Эти белки относятся к семейству БПС, имеющих в структуре **SH2-домен, узнающий остатки фосфотирозина**. Поэтому они обладают свойством ассоциировать с фосфорилированным цитокиновым рецептором. Если затем происходит фосфорилирование молекулы STAT, фактор переходит в активную форму и образует **димер**. После транслокации в ядро димер в качестве фактора транскрипции связывается с промотором инициируемого гена и индуцирует его транскрипцию

Лекция № 9. Механизмы противовирусного иммунитета.

Химические аспекты реализации противовирусного потенциала системы интерферона. Участие системы интерферона в развитии специфических противовирусных иммунологических механизмов. Понятие о вирусспецифической иммуносупрессии.

Клеточные механизмы противовирусной защиты.

Интерферон подавляет репродукцию вирусов, воздействуя на транскрипцию их геномов тремя различными способами.

1. Первый способ состоит в индукции синтеза 2',5'-олигоденилатсинтетазы. В присутствии двухцепочечной РНК 2',5'-олигоденилатсинтетаза полимеризует АТФ с образованием 2',5'-олигоденилатов, которые в свою очередь активируют эндорибонуклеазу L, разрушающую одноцепочечные РНК (не только мРНК, но и рРНК), что блокирует синтез белка в зараженных клетках.

2. Второй способ заключается в индукции синтеза протеинкиназы PKR. Эта протеинкиназа активируется двухцепочечной РНК, путем фосфорилирования блокирует фактор инициации трансляции eIF2альфа и фосфорилирует связанный с рибосомой белок P1, что приводит к подавлению процесса инициации трансляции и синтеза белка в зараженной клетке, блокируя тем самым репликацию вируса.

3. В основе третьего способа лежит индукция синтеза белков Mx, блокирующих первичную транскрипцию вирусной генетической информации (нарушает элонгацию первичных праймированных транскриптов). Mx белки могут локализоваться как в ядре, так и в цитоплазме клетки. Обладают ГТФ-азной активностью. Имеют особое значение для подавления репродукции вирусов гриппа, ВВС и др..

Рибонуклеаза L (РНКаза L, ribonuclease L, RNase L, 2',5'-олигоденилат-зависимая эндорибонуклеаза) – ИФН-индуцируемая рибонуклеаза, после индукции, активации, расщепляет все РНК в клетке, участвует в антивирусном действии интерферонов и апоптозе. Открыта Е.Слаттери в 1979 г. Механизм действия: Врожденный иммунитет реагирует на вирусную РНК. При появлении в клетке необычных РНК-структур запускается антивирусный ответ.

Детекцией чужеродной РНК в клетках млекопитающих занимаются факторы RIG-1 и MDA5. Эти факторы активируют транскрипционный фактор Nf-kB, который запускает транскрипцию гена интерона-бета (IFN- β) - цитокина, препятствующего репликации вирусов и стимулирующего клетки иммунной системы.

Клеточные элементы противовирусной защиты функционируют на основе механизмов антиген-специфической цитотоксичности (ЦТЛ), а также – механизмов ЗАКЦ (ADCC) и механизмов с участием НК-лимфоцитов. Индукция апоптоза как эффективный механизм элиминации вирус-инфицированных клеток. Риски избыточной стимуляции антиген-

специфических клонов ЦТЛ и механизмов неспецифического киллинга – например, деструкция ткани печени и головного мозга при вирусных гепатитах и флавивирусных нейроинфекциях.

Лекция № 10. Канцерогенные вирусы и механизмы противоопухолевого иммунитета.

Классификация канцерогенных вирусов. Вирусы высокого канцерогенного риска. Понятие об опухоли-специфических и опухоли-ассоциированных антигенах. Роль клеток СМФ, Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, различных цитокинов в противоопухолевом иммунитете. Иммуносупрессия, индуцированная опухолью и риски иммуностимуляции при опухолевом процессе.

По специфичности выделяют 3 группы онкогенных вирусов:

1) Некоторые вирусы высокоспецифичны и способны вызывать опухоль только у своего естественного хозяина (вирусы папиллом, многие вирусы лейкозов).

2) Другие вирусы могут вызывать опухоли не только у своих хозяев, но и у других видов животных (вирус саркомы Рауса).

3) Третья группа онкогенных вирусов вызывает опухоли у лабораторных животных, но не вызывает опухолей у своего естественного хозяина (напр., вирус обезьян SV40, аденовирусы человека и животных).

Онкогенные вирусы могут оказывать либо прямое трансформирующее, либо не прямое промоторное действие.

В клетках, подвергшихся вирусной трансформации, инфекционный процесс всегда носит нецитотидный характер.

Если онкогенный вирус по своей природе является **цитотидным** (паповавирусы, аденовирусы, герпес-вирусы), то инфекция должна нести абортивный характер без образования вирионов.

Онкогенную активность вирусов определяет особый трансформирующий ген (онкоген). Принципиальное **отличие вирусных онкогенов от клеточных онкогенов** - отсутствие гомолога в геноме нормальной клетки.

Вирусы, содержащие онкоген в своём геноме, обозначают как **(onc+)-вирусы**. Большинство из них **ДНК-геномные**.

(onc+)-вирусы могут утрачивать онкоген и, соответственно, трансформирующую

активность; в этом случае их обозначают как **(onc-)-вирусы**.

Онкоген не кодирует репродукцию жизненно важных для вируса белков, и его утрата не лишает вирус способности репродуцироваться в чувствительных клетках.

Опухолеспецифические трансплантационные антигены представлены двумя группами поверхностных невирусных белков плазматических мембран клеток:

TSTA [от англ. tumor spesific transplantat antigen, опухолеспецифичные трансплантационные Ag] и

TSSA [от англ. tumor spesific surface antigen, опухолеспецифичные поверхностные Ag].

Синтез TSTA определяется не только типом вируса, но и видовой принадлежностью клеток.

TSTA распознаются иммунокомпетентными клетками.

Иммунотерапия опухолей на основе Т-клеточного иммунитета.

Показан терапевтический эффект IL-2 на метастатических меланомах и опухолях почки. Применение цитокинов в терапевтических целях, а также поиск противораковых вакцин на основе цитокинов.

Имуноферментный анализ в определении опухолеассоциированных антигенов (альфа-фетопротеин, раково-эмбриональный антиген и др.): диагностический аспект, оценка эффективности проводимого лечения.

Современная иммунология рака (методологические подходы:

- 1) иммунодиагностика ряда опухолей, включая иммунофенотипирование.
- 2) возможная иммунопрофилактика некоторых форм рака, связанных с вирусной инфекцией, на основе противовирусной вакцинации (рак печени, рак шейки матки, лимфома Бэркитта, рак носоглотки и лимфогранулематоз).
- 3) противораковые генетические вакцины и цитокиновая терапия опухолей. Эти работы составляют одно из важнейших направлений в онкологии
- 4) таргетно-ориентированная иммунокоррекция. Компенсация индуцированной опухолью иммуносупрессии. Иммунологическая инженерия экспрессии CTLA4 как пример эффективной стимуляции противоопухолевого иммунитета: проблемы и перспективы.

Иммунотерапевтические подходы в онкологии, связанные с селективной стимуляцией

клеток системы моноклеарных фагоцитов и дендритных клеток, лимфокинактивированных киллеров, естественных киллеров, а также – разработка векторных систем – иммунотоксинов.

Лекция № 11. Биотехнологические аспекты иммунохимии.

Генно-инженерные технологии в иммунологии. Моноклональные антитела. Гибридомы, получение моноклональных антител против антигенов бактерий и вирусов. Квадромы. Химерные антитела. Замещенные антитела. Биотехнология получения иммуноактивных веществ.

Генно-инженерная технология революционизировала иммунологию, сформировав направление, получившее название "инженерия антител", целью которого является получение на основе генов иммуноглобулинов несуществующих в природе конструкций с заданными свойствами.

Методы генетической инженерии дают возможность эффективно менять как макро- так и микроструктуру получаемых искусственных антител. Примером первого является изменение изотипа антитела путем использования генов, кодирующих соответствующую Fc-область. Примером второго - точечные замены аминокислот путем направленного мутагенеза, приводящие к изменению эффекторных функций, если замена произведена в Fc-области, или к изменению сродства (как повышению, так и понижению) к антигену, когда меняются остатки в CDR-участках вариабельных доменов.

Моноклональные антитела.

Моноклональные антитела (МАТ) секретируются иммунными клетками, происходящими от единственной антителообразующей клетки. Поэтому МАТ направлены только против определенного эпитопа иммуногенного вещества, так называемой "*антигенной детерминанты*". Для получения МАТ изолируют **лимфоциты** из селезенки иммунизированной мыши и производят их слияние с опухолевыми клетками мыши (клетками миеломы). Это необходимо, так как жизнеспособность антителопродуцирующих лимфоцитов в культуре ограничена лишь несколькими неделями. При слиянии с опухолевой клеткой возникают гибридные клетки, так называемые **гибридомы**, которые являются потенциально бессмертными.

Слияние клеток является редким событием, частота которого повышается в присутствии полиэтиленгликоля [ПЭГ (PEG)]. Отбор продуктивных гибридных клеток проводится при длительной инкубации **первичной культуры** в *ГАТ-среде* (НАТ-среде), содержащей

гипоксантин, аминоптерин и тимидин. *Аминоптерин*, аналог дигидрофолиевой кислоты, конкурентно ингибирует *дигидрофолат-редуктазу* и тем самым биосинтез дТМФ. Поскольку дТМФ существенно необходим для синтеза ДНК, миеломные клетки не могут выживать в присутствии аминоптерина. С другой стороны, клетки селезенки могут преодолевать действие ингибитора, используя для синтеза ДНК *гипоксантин* и *тимидин*, однако и они существуют в течение ограниченного времени. Только гибридома выживает в виде культуры в среде ГАТ, так как эти клетки обладают одновременно бессмертием миеломных клеток и способностью клеток селезенки приспосабливаться к аминоптерину. В действительности продуцировать антитела способны только единичные гибридомные клетки. Такие клетки необходимо выделить и размножить **клонированием**. После тестирования клонов на способность образовывать антитела отбираются положительные культуры, которые снова клонируются и подвергаются последующей селекции. В результате получают гибридому, продуцирующую *моноклональные антитела*. Производство моноклональных антител этими клетками осуществляют *in vitro* в биореакторе или *in vivo* в асцитной жидкости мыши.

Квадромы. Следующим этапом развития гибридомной технологии после получения гибридом стало получение "квадром" - клеточных линий, получаемых в результате слияния двух гибридом, продуцирующих антитела разной специфичности. В результате удается создать клетки, секретирующие бифункциональные иммуноглобулины, имеющие в одной молекуле два разных по специфичности центра связывания антигена и обладающие таким образом сродством к двум различным антигенам. Все упомянутые выше антитела и их производные широко используются главным образом для целей диагностики и биотехнологии. Их применение для терапии и диагностики *in situ* ограничивается тем, что в основном с помощью гибридомной технологии удается получить молекулы мышинных иммуноглобулинов, которые вызывают у человека иммунный ответ, что приводит к их нейтрализации. Именно это обстоятельство инициировало поиск путей снижения иммуногенности мышинных моноклональных антител путем удаления отдельных фрагментов или замены их на аналогичные участки иммуноглобулинов человека. В результате генно-инженерных манипуляций с иммуноглобулиновыми генами были получены химерные антитела и "замещенные" антитела .

Другим перспективным подходом для решения проблем, обусловленных применением мышинных антител в организме человека может стать использование "минимальных антител".

Антитела химерные. Химерные антитела (*chimaeric antibodies*) - искусственные

антитела, в которых константная часть мышинных антител замещена соответствующей константной областью иммуноглобулина человека. Поскольку большая часть антигенных детерминант молекулы иммуноглобулина находится в константных доменах и с ними же связаны основные эффекторные функции (взаимодействие с Fc-рецепторами, системой комплемента и др.), становится понятным, что использование химерных иммуноглобулинов мышья/человек должно обусловить практически нормальное их взаимодействие с иммунной системой человека при сохранении специфичности и сродства к антигену мышинных моноклональных антител. В настоящее время получены тысячи линий мышинных гибридом. В условиях быстро прогрессирующих методов генной инженерии рекомбинантная "хирургия" представляется весьма перспективной. Для этого требуется ограниченный набор С-генов человека, который достаточно будет сочетать с конкретными V-генами мыши. Для экспрессии "химерных" антител приходится использовать системы, основанные на эукариотических клетках, поскольку только в них возможна правильная сборка молекулы и корректное гликозилирование, необходимое для выполнения антителами эффекторных функций.

Антитела замещенные. "Замещенные" антитела ("reshaped" Ab) представляют собой конструкции, в которых лишь непосредственно контактирующие с антигеном участки переменных доменов (CDR) взяты у мышинных антител, а все остальное - включая каркасные участки V-доменов - человеческого происхождения. Они обладают еще более низкой, чем химерные антитела, иммуногенностью.

Антитела минимальные. Другим перспективным подходом для решения проблем, обусловленных применением мышинных антител в организме человека может стать использование не целой молекулы антитела, а лишь ее части, отвечающей за связывание чужеродного антигена. Такие "минимальные антитела", или Fv-фрагменты, из-за малого размера легче проникают в опухолевую ткань и в то же время обладают пониженной иммуногенностью. В отличие от "химерных", для наработки "минимальных" антител используются дешевые и биотехнологичные бактериальные продуценты. Среди этой группы молекул выделяют: одноцепочечные антитела (single chain Ab. sc Fv-fragments), которые получают в результате экспрессии V(H) и V(L)-участков, соединенных олигонуклеотидом, кодирующим гибкий гидрофильный пептид; Fv-фрагменты - нековалентно ассоциированные гетеродимеры V(H) и V(L) - доменов. Они менее стабильны, чем sc-Fv-фрагменты. Промежуточное положение между первыми и вторыми занимают конструкции, имеющие специально введенные в область контакта доменов дисульфидные связи.

V -домены (domain antibody, dAb) - переменные домены тяжелых цепей. Применение

основано на часто встречающемся свойстве отдельного варибельного домена тяжелой цепи сохранять специфичность и высокое сродство (10% и выше от сродства исходного полноразмерного антитела) к антигену.

Минимальные узнающие пептиды (minimal recognition units, m.r.u.) - наименьшие молекулы, сохраняющие способность связывать антиген, а именно аналоги CDR-участков варибельных доменов.

Иммунотоксины и иммуноферменты рекомбинантные. Рекомбинантные иммунотоксины и иммуноферменты получают в результате экспрессии иммуноглобулиновых генов, соединенных с генами токсинов или ферментов. В зависимости от размера фрагмента иммуноглобулинового гена различают, например, sc-Fv-токсин или Fab-токсин. Основные достоинства - воспроизводимость и биотехнологичность препаратов (в отличие от традиционных конъюгатов), а также значительно меньший размер получаемых молекул, что является принципиальным для использования в случае ряда заболеваний.

Иммуноадгезины. Иммуноадгезины (immunoadhesins) обычно состоят из Fc-фрагмента молекулы антитела и лиганда, специфичного к определенному рецептору, например CD4. Такая молекула за счет CD4-фрагмента будет связываться с белком gp120 на поверхности клеток, инфицированных ВИЧ, и за счет Fc-фрагмента вызывать их уничтожение посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности или действия системы комплемента.

Абзимы. Абзимы - рекомбинантные антитела, обладающие каталитической активностью (abzyme от англ. antibody и enzyme).

Лекция № 12. **Основы вакцинологии. Получение и испытания вакцинных и сывороточных препаратов.** Вакцины на основе индивидуальных и субъединичных антигенов возбудителей инфекционных заболеваний. Рекомбинантные противовирусные вакцины. ДНК-вакцины. Адьюванты.

Исторические вехи развития вакцинологии: 1798г. Наблюдения Э.Дженнера за коровьей и натуральной оспой привели его к созданию метода вакцинации. 1885г. Пастер - получает вакцину против бешенства. 20-е годы XX века – получены вакцины против дифтерии и столбняка. 1934г. – вакцина против коклюша. 1954г. – вакцина Солка против полиомиелита. 60-е годы XX века – получены вакцины против кори, краснухи, а также вакцина Сэбина против полиомиелита. 1985 г. - вакцина для профилактики инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae*. 90-е годы XX века – получены вакцины против вирусов гепатитов и

вируса *Varicella zoster* (возбудителя ветряной оспы и опоясывающего лишая).

Предупреждение инфекционных заболеваний базируется на двух принципах - неспецифической и специфической профилактике. **Неспецифическая профилактика** включает комплекс мероприятий, которые определяются эпидемиологическими особенностями заболевания и сводятся к тому, чтобы избежать заражения, т.е. предупредить контакт с возбудителем.

Специфическая профилактика основана на применении иммунных препаратов, нацеленных против конкретных возбудителей. Их действующим началом являются антигены или антитела. Антигены входят в состав вакцин и создают активный иммунитет, формирование которого требует активных (собственных) реакций хозяина. Антитела применяют в виде иммуноглобулиновых фракций, выделяемых из сывороток животных (гетерологичные иммуноглобулины) или людей (гомологичные иммуноглобулины), вакцинированных против данного возбудителя. Они вызывают пассивный иммунитет, который не зависит от иммунного ответа реципиента. Это вариант экстренной защиты, действующей короткое время, которое измеряется временем катаболизма иммуноглобулинов.

Для специфического противои инфекционного иммунитета принята следующая классификация:

1. Активный иммунитет:

1.1. Естественно приобретенный (постинфекционный иммунитет).

1.2. Искусственно приобретенный (поствакцинальный иммунитет).

2. Пассивный иммунитет:

2.1. Естественно приобретенный (антитела, получаемые от матери трансплацентарным путем или через грудное молоко).

2.2. Искусственно приобретенный иммунитет (результат серопрфилактики или серотерапии).

Основа специфической профилактики - это вакцины. Вакцины - собирательное понятие, которое объединяет разнообразные препараты, нацеленные на создание активного специфического иммунитета. Иммунологическая сущность вакцинации сводится к формированию памяти о микробных антигенах, которая при заражении обеспечивает быстрый (опережающий) иммунный ответ. Иными словами, вакцинация готовит иммунную систему к распознаванию инфекционных агентов до их внедрения в организм, подготавливая средства защиты - эффекторы гуморального и клеточного иммунитета. Вакцинация не предупреждает заражения, но снижает тяжесть инфекционного процесса вплоть до его

субклинических характеристик, снижает риск осложнений. Не каждый антиген годится для вакцины - эффективны лишь протективные антигены. Они называются так, потому что вызывают иммунный ответ, который защищает от болезнетворных проявлений инфекции.

Эмпирические и теоретические подходы к иммунизации.

Попытки искусственного воспроизведения противои инфекционного иммунитета начались задолго до получения первой вакцины. Они были связаны с вариоляцией, которая практиковалась для предупреждения натуральной оспы (от лат. variola — оспа, varius - рябой). Основой явились наблюдения о том, что люди, перенесшие легкую форму инфекции, больше не болеют оспой. Стандартная прививка предусматривала втирание материала из оспенных пустул (от больных легкой формой заболевания) в кожу или интраназальное распыление. Смертность от вариоляции составляла 0,5-2% против 10-50% при естественном заражении. Риск, на который шли при вариоляции, диктовался паническим страхом перед натуральной оспой.

Вариоляция не является единственным примером искусственного воспроизведения иммунитета в довакцинальный период. Известен, опыт, которым пользовались бедуины и курдские племена для профилактики лейшманиоза.: колючку, пропитанную материалом из лейшманиозных очагов, вносят в кожу незараженных людей. Это вызывает локальную инфекцию, после которой развивается устойчивость к повторному (естественному) заражению.

Термин «вакцина» (от лат. vacca - корова) связан с историей специфической профилактики натуральной оспы. В 1776—1778 гг. английский врач Э. Дженнер экспериментально доказал, что прививка коровьей оспы предохраняет от заражения натуральной оспой. Результаты его наблюдений были опубликованы в 1778 г. Эта дата, с которой началось широкое внедрение метода Э. Дженнера, завершившееся ликвидацией оспы, считается началом вакцинологии. Нарцательный смысл «вакцина» получила по рекомендации Л. Пастера, предложившего распространить этот термин на все прививочные препараты.

По рестриционным картам геномы вирусов коровьей оспы и современного вируса осповакцины существенно отличаются друг от друга. Допускают, что вирус осповакцины возник в результате генетической рекомбинации между вирусами коровьей и натуральной оспы при многочисленных вакцинальных пассажах. Кстати, крупный рогатый скот не является природным резервуаром вируса коровьей оспы, скорее всего заражение происходит от мелких грызунов.

Открытие Э. Дженнера было продуктом чистой эмпирики. В нем отсутствовала обобщающая идея, которую можно было бы использовать при других заболеваниях. Впрочем, другого и нельзя было ожидать от современников Э. Дженнера, которые не имели представлений об инфекционных заболеваниях и их возбудителях. Потребовалось более сотни лет, что бы сделать новый, стратегический шаг, основанный на научной концепции.

В 1880—1881 гг. Л. Пастеру удалось сознательно ослабить (аттенуировать) вирулентность бактерий, культивируя их в неблагоприятных условиях. Пользуясь этой идеей, он приготовил первые искусственные вакцины - против куриной холеры и сибирской язвы.

В 1885 г. Л. Пастер и его коллеги получили вакцину против бешенства. Позже оказалось, что она содержит не живой, а убитый вирус, и по сути это был первый опыт успешного воспроизведения протективного эффекта при помощи убитых микроорганизмов. Примерно тогда же были открыты дифтерийный и столбнячный токсины и антитоксины. Выяснилось, что для вакцинации необязательно применять живые микробы. Более того, положительного результата можно добиться, используя не только убитые микроорганизмы, но и их субкомпоненты (субъединичные вакцины).

Получение вакцин:

Несмотря на то, что главный принцип вакцинологии (конструирование препаратов на основе протективных антигенов) остался неизменным, его реализация претерпела существенную эволюцию, которая продолжается до сих пор. Она основана на стремлении к получению безвредных препаратов с максимальной протективностью. *Идеальная вакцина должна обеспечить синтез высоких титров сывороточных и секреторных антител, генерацию достаточного количества Т-эффекторов и развитие длительной иммунологической памяти.* Кроме того, *она не должна давать побочных (неспецифических) реакций.* Ни одна из вакцин не отвечает в равной мере этим требованиям, хотя новые идеи и технические решения приближают к их реализации.

Живые вакцины. Живые микроорганизмы были первыми препаратами, использованными для искусственного воспроизведения противои инфекционного иммунитета. Эмпирический подход Э.Дженнера сменился принципом аттенуации Л.Пастера, предусматривавшим ослабление вирулентности при культивировании бактерий в жестких условиях. Сегодня аттенуацию понимают не как тотальное подавление болезнетворности всей микробной популяции, а как селекцию мутантных клонов, утративших вирулентность. Поскольку болезнетворность — поливалентный признак, детерминируемый несколькими

(иногда многими) генами, аттенуация может иметь разную генетическую основу, а протективность и безвредность аттенуированных штаммов не всегда совпадают. Направленной аттенуации добиваются путем делеции генов вирулентности (например, плазмид) или их повреждения методом инсерционного мутагенеза (нарушение структуры генов при внедрении подвижных генетических элементов).

Достоинствами живых вакцин являются высокая иммуногенность и длительность вакцинального эффекта. Напряженный иммунитет возникает даже после однократной прививки, так как вакцинные штаммы способны размножиться (а иногда и персистировать) в организме хозяина (реплицирующиеся вакцины). К недостаткам относятся повышенная реактогенность, нестабильность, вероятность (хотя и ничтожная) реверсии вирулентного фенотипа (т.е. восстановления параметров инфекционности и вирулентности). Опасность осложнений возрастает у лиц с дефектами иммунитета.

Убитые вакцины. Понятие «убитые вакцины» относится к вакцинным препаратам, содержащим цельные инактивированные бактерии, простейшие, грибы или вирионы. Их достоинства и недостатки противоположны таковым живых вакцин. Поэтому при некоторых инфекциях убитые и живые вакцины используются на паритетных началах (полиомиелит, грипп).

Протективные антигены. Препараты из очищенных протективных антигенов можно объединить в понятие «субъединичные вакцины» подразумевая, что «единицей» являются цельные вирусы, микробные клетки и продукты их метаболизма. Их реактогенность минимальна. Основные проблемы связаны с низкой иммуногенностью, которую приходится усиливать при помощи адьювантов и искусственных носителей.

Анатоксины - обезвреженные токсины бактерий. Это исторически первая и наиболее известная группа такого рода препаратов. Идея их применения возникла после открытия дифтерийного и столбнячного токсинов, но была реализована лишь после разработки метода щадящей (сохраняющей иммуногенность) инактивации. Попытки распространить этот принцип на другие инфекции оказались менее удачными или неудачными. Главная причина в том, что моноинтоксикация определяет патогенез немногих инфекций. Механизм инфекционного процесса обычно сложнее, и антитела против токсинов не обеспечивают протективного эффекта.

Вместо цельных обезвреженных токсинов в перспективе могут быть использованы их фрагменты, ответственные за взаимодействие с рецепторами клеток. Расчет состоит в том, что, экранируя лигандные (рецепторные) сайты токсинов, антитела будут подавлять их агрессивность. Такой подход наиболее реален для бинарных токсинов у которых

рецепторные и токсигенные функции поделены между структурными субъединицами (дифтерийный, столбнячный, холерный, сибиреязвенный и другие токсины). Сходный принцип может быть использован для получения вакцин из микробных адгезинов и контактных (инъекционных) токсинов бактерий.

Кроме анатоксинов практическое применение нашли капсульные антигены палочки инфлюэнцы и пневмококка, гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа А (сплит-вакцина, т.е. расщепленная вакцина), поверхностный антиген вируса гепатита В и др.

Усиление и коррекция иммуногенности. Иммуногенность очищенных протективных антигенов можно изменить при помощи адъювантов и конъюгации с белковыми носителями.

Адъюванты. Включение в состав вакцинных препаратов адъювантов - наиболее универсальный способ усиления иммунного ответа или качественного изменения его результата (например, акцент в направлении реакций клеточного или гуморального иммунитета). **Адъювантность особенно ярко выражена при первичном иммунном ответе и слабо проявляется при повторных контактах с антигеном.**

Природа иммуноадъювантного эффекта во многом связана с усилением воспалительной реакции в зоне введения антигенов. Это может активировать антигенпредставляющие клетки, повышая их способность к презентации антигенов

Т-лимфоцитам и меняя баланс Th1/Th2-цитокинов. Действие некоторых адъювантов связано с депонированием антигенов (например, корпускуляризация растворимых антигенов на сорбентах или создание водно-масляного депо). Однако, и в этом случае иммунопотенцирующий эффект зависит от воспалительной реакции и активации вспомогательных клеток иммунной системы.

Адъювантными свойствами обладает множество веществ различной природы, но в медицинской вакцинологии пока применяются лишь минеральные сорбенты - гидроокись и фосфаты алюминия. Вызывают интерес адъювантные эффекты цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-12 и др). Возможно, с их помощью удастся прицельно воздействовать на качество иммунного ответа, активируя определенные субпопуляции Т-лимфоцитов.

Разновидностью адъювантов являются **системы доставки**. Они обеспечивают стабилизацию антигенов и/или способствуют их взаимодействию с иммунокомпетентными клетками. Примером служат липосомы (микроскопические пузырьки, построенные из фосфолипидных мембран), нагруженные антигенами. После поглощения макрофагами или слияния с мембранами антигенпредставляющих клеток они содействуют концентрации и презентации антигенов Т-лимфоцитам. Липосомы со встроенными цитокинами избирательно

активируют различные субпопуляции лимфоцитов.

Конъюгированные вакцины. Идея их использования базируется на представлениях о Т-зависимых и Т-независимых антигенах. Т-независимые антигены не имеют белкового носителя и поэтому не обеспечивают взаимодействия между Т- и В-лимфоцитами.

Т-независимость лишает антигены результативности полноценных вакцин. Они отличаются слабой иммуногенностью в раннем детстве (до 2 лет), не оставляют иммунологической памяти и не обеспечивают трансплацентарного иммунитета, так как не вызывают образования IgG антител. Это характерно для капсульных полисахаридов палочки инфлюэнцы, менингококка и пневмококка, наиболее опасных для детей первых лет жизни. С целью искусственного воспроизведения Т-зависимости предложено соединять (конъюгировать) такие антигены с белками, имитируя структуру гаптен - носитель. Примером является вакцина против палочки инфлюэнцы (*Haemophilus influenzae*, тип b) — конъюгат фрагментов b-капсульного полисахарида с дифтерийным или столбнячным анатоксином.

Опираясь на этот принцип, можно предвидеть конструирование препаратов, в которых единственный белок будет носителем для протективных эпитопов разных антигенов, сочетая в себе понятия об ассоциированных и поливалентных вакцинах. В качестве эпитопов могут быть использованы не только фрагменты Т-независимых антигенов, но и синтетические пептиды.

Генетические вакцины (ДНК-вакцины). Генетические вакцины представляют собой рекомбинантные молекулы ДНК, сконструированные на основе бактериальных плазмид, в которые встроены гены протективных микробных белков и эукариотические промоторы транскрипции. Попадая в клетки, такие ДНК начинают синтезировать антигены, индуцирующие гуморальный и клеточный иммунный ответ. Последнее особенно важно, так как убитые и субъединичные вакцины являются слабыми индукторами Т-клеточного иммунитета. Важно и то, что ДНК подвергается репликации, стабилизируя источник антигенов. В этом отношении ДНК-вакцины повторяют достоинство живых вакцин.

Иммуногенность ДНК-вакцин доказана в опытах на животных с антигенами из различных микроорганизмов, прежде всего вирусов. **Интенсивность иммунного ответа можно усилить, вводя в плазмиду гены иммуностимулирующих цитокинов.** Таким же путем удастся манипулировать качеством иммунного ответа, сдвигая его в направлении цитотоксических Т-лимфоцитов, образования секреторных IgA и пр.. Оказалось, что и сама бактериальная (плазмидная) ДНК обладает иммунопотенцирующими свойствами, выступая в роли адьюванта. Это объясняется наличием в ней так называемых иммуностимулирующих

последовательностей, которых почти нет в ДНК эукариот.

Разрабатываются два основных варианта ДНК-вакцин - голые и векторные. Голые вакцины: используют свободные плазмиды или плазмиды, сорбированные на искусственных (небиологических) носителях (микроскопические частицы золота, катионные липиды и пр.). Векторные вакцины: для доставки ДНК применяют живые аттенуированные бактерии, трансфицированные рекомбинантными плазмидами (трансгенные бактерии). Преимущество отдается бактериям, которые инвазируют клетки, внося вакцинную ДНК (микобактерии, сальмонеллы, шигеллы, листерии). Можно использовать и рекомбинантные вирусы. В этом случае гены вакцинных пептидов включаются в состав вирусного генома (например, аденовирусов и вируса осповакцины).

Предстоит еще многое сделать, чтобы довести эту блестящую идею (объединившую достижения молекулярной генетики, иммунологии и микробиологии) до практической реализации. Ведутся исследования по повышению экспрессии рекомбинантных генов, модуляции иммуностимулирующих эффектов, оптимизации способов доставки ДНК к месту назначения. В этом - будущее вакцинологии в ее наиболее современном варианте. Фантастикой (но в то же время реальностью) выглядит, например, предложение использовать в качестве вектора трансгенные растения. В этой связи говорят о съедобных вакцинах в частности, о банановых и морковных вакцинах против ротавирусных кишечных инфекций.

Т-вакцины. До недавних пор единственным критерием иммуногенности вакцин был титр антител. В связи с развитием представлений о протективных функциях

Т-лимфоцитов возникло новое направление - разработка вакцин, предназначенных для стимуляции Т-клеточного иммунитета. Есть основания полагать, что они окажутся полезными не только для профилактики от облигатных внутриклеточных паразитов, но и для лечения хронических вирусных инфекций, когда необходима элиминация персистентных вирусов. В таких случаях антитела малоэффективны и требуется участие эффекторов (прежде всего цитотоксических CD8 Т-лимфоцитов), способных распознать и уничтожить зараженные клетки. Большой интерес к Т-вакцинам проявляют онкоиммунологи, рассматривая их как перспективный способ борьбы со злокачественными опухолями.

Работа над Т-вакцинами стала возможной после открытия механизма распознавания антигенов Т-клетками. Оно базируется на МНС-зависимом представлении антигенов, определяя главный принцип конструирования Т-вакцин: их основой должны быть фрагменты молекул, адекватные пептидам, которые образуются в антиген-представляющих клетках. Выполнение данного условия требует решения сложных задач по изысканию

способов и систем доставки Т-пептидов в антиген-представляющие клетки с учетом особенностей экспрессии эпитопов, распознаваемых CD4 и CD8 Т-лимфоцитами. С этой целью испытываются технологии, повышающие вероятность презентации антигенных пептидов по экзогенному или эндогенному пути, т.е. в системах “МНС-I –CD8 лимфоциты” и “МНС-II—CD4 лимфоциты”.

Другая возможность связана с применением ДНК-вакцин. Оказалось, что антигены, синтезируемые клетками на основе рекомбинантных ДНК, хорошо вписываются в конвейер МНС презентруемых пептидов, а индуцируемый ими иммунный ответ сдвинут в направлении Th1-зависимых реакций, т.е. эффекторов клеточного иммунитета. Этому можно содействовать, включая в препараты цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-12 и др./

Мукозальные вакцины. Парентеральное введение лекарств уже давно приводило к мысли о возможности аппликации вакцин на слизистые оболочки. Современное возрождение интереса к этой идее связано с осознанием относительной автономии мукозальной иммунной системы и того, что парентеральная доставка антигенов не обеспечивает полноценного иммунитета слизистых оболочек. Это принципиально для инфекций, патогенез которых не зависит от внутрисосудистой инвазии и/или токсинемии, а ограничивается поражением в зоне входных ворот возбудителя. В таких случаях сывороточные антитела не предупреждают развития патологического процесса, так как их действие проявляется с опозданием.

Мукозальные вакцины нацелены на индукцию опережающего (профилактического) иммунитета слизистых оболочек против инфекций респираторного, кишечного и полового трактов. Это не означает, что их действие строго регионально: реакция в одном из участков мукозального тракта находит отклик в других отделах слизистых оболочек и, кроме того, вызывает общий (системный) иммунный ответ. В этом отношении мукозальные вакцины повторяют эффект парентеральной иммунизации.

В качестве мукозальных вакцин могут быть использованы те же препараты, что и для парентерального введения. Главная особенность — адьювантное сопровождение. Среди прочих (более узких) задач мукозальные адьюванты и системы доставки должны обеспечить устойчивость антигенов при аппликации на слизистые оболочки (это прежде всего относится к энтеральным вакцинам) и их проникновение в регионарную лимфоидную ткань. Кроме липосом и различного рода микрокапсул, ведутся поиски оптимальных векторных вакцин на основе рекомбинантных (трансгенных) бактерий и вирусов. Примером специфического мукозoadгезивного адьюванта для энтеральных вакцин является В-субъединица холерного токсина. Обладая сродством с ганглиозидами, она усиливает рецепцию энтероцитами конъюгированных антигенов или содержащих ее микросфер.

Несмотря на многочисленные экспериментальные разработки, внедрение в медицинскую практику мукозальных (как и других новых) вакцин идет медленно, с большой осторожностью. Единственным препаратом, доказавшим свою эффективность, остается живая пероральная вакцина против полиомиелита.

Неспецифическое действие микробных вакцин

При введении в организм вакцины вызывают не только специфические сдвиги, т.е. образование антител и Т-лимфоцитов против иммунизирующего агента. Они неизбежно затрагивают сферу неспецифической реактивности, что иногда сопровождается побочными реакциями, не имеющими отношения к основному эффекту. Опасения перед вакцинальными осложнениями служат поводом (часто необоснованным) для уклонения от прививок, особенно детей из так называемых групп риска. Это создает прослойку лиц, лишенных иммунитета против эпидемически опасных инфекций, поддерживая циркуляцию возбудителей с угрозой новых вспышек.

Но неспецифические эффекты могут быть и полезными. Убитые бактерии и их дериваты (липополисахаридные эндотоксины, производные пептидогликана и пр.) применяются в качестве биостимуляторов для повышения резистентности организма, в частности при лечении хронических инфекций, когда требуется обострить процесс, чтобы проактивировать санирующие реакции воспаления и иммунитета.

Иммуностимулирующие свойства вакцины БЦЖ пытались использовать для иммунотерапии больных раком. В ряде случаев был получен существенный лечебный эффект. Однако, данный эффект не был стабильным. К тому же, онкологи в ряде случаев столкнулись с эффектом усиления опухолевого роста при проведении неспецифической иммунотерапии.

Много лет развивалась идеология аутовакцин, которые готовили из собственных бактерий больного. Это делалось для того, чтобы сблизить вакцинные и этиологически/патогенетически значимые штаммы, добившись максимального сходства их антигенной композиции. В конце концов оказалось, что действие аутовакцин не отличается от гетерологичных препаратов (т.е. вакцин из чужих штаммов) и скорее всего связано с неспецифическим эффектом.

В последние годы интерес к неспецифическому действию микробных вакцин получил новый импульс в связи с представлениями о функциональной неоднородности Т-лимфоцитов. Идея сводится к регуляции иммунных реакций на основе изменения баланса Th1/Th2-цитокинов. Если учесть, например, что аллергическое воспаление (отсроченная фаза немедленных аллергических реакций) эволюционирует благодаря Th2-цитокинам, то

торможение их синтеза может быть полезным при заболеваниях, основанных на данном механизме. Напротив, при аутоиммунной патологии, которая обычно прогрессирует через Th1-зависимые реакции, следует стремиться к подавлению Th1-цитокинов. И того и другого можно добиться при помощи цитокинов полярной группы или индукторов их секреции. С этой целью могут быть использованы микробные продукты (в частности, вакцинные препараты), обладающие способностью активировать дискретные субпопуляции Т-лимфоцитов. Это определяет подходы к лечению заболеваний разной иммунопатогенетической ориентации.

Современный этап развития вакцинологии характеризуется повышенным интересом к использованию субъединичных антигенов и адъювантных носителей для них. Активно разрабатываются **адъювантные носители** на основе различным образом модифицированных липосом (например, с липосомы с ПЭГ и ткане-специфическими рецепторами), ИСКОМ и других наноструктур. Разрабатываются **синтетические пептидные вакцины** (молекула синтетических вакцин может содержать разнородные участки-эпитопы, которые способны формировать иммунитет к разным инфекциям. Синтетические вакцины обладают высокой степенью стандартизации, слабореактогенны, безопасны.

Разрабатываются **антиидиотипические вакцины** (антиидиотипические антитела являются зеркальным отражением антигена и поэтому способны вызывать образование антител, реагирующих с антигеном. Антиидиотипические вакцины получены к разнообразным возбудителям вирусных и бактериальных инфекций. Их введение вызывает в организме экспериментальных животных образование антител и генерацию клеток иммунологической памяти. Тем не менее, надежды, возлагавшиеся на антиидиотипические вакцины, пока не оправдываются т.к. с их помощью не удается достичь необходимого уровня напряженности иммунитета.

Съедобные вакцины (растительные вакцины). Это перспективное направление связано с разработкой вакцин на основе трансгенных растений, в геном которых встроен соответствующий фрагмент генома патогенного микроорганизма. Эти вакцины, естественно, предназначены для орального способа иммунизации. Первая такая вакцина получена в 1992 г.: трансгенное растение табака стало продуцировать «австралийский» антиген, вызывающий иммунный ответ против гепатита В. В 1998г. С помощью картофеля, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина, была получена выраженная защита у поедавших его мышей при заражении этих мышей возбудителем холеры. Аналогичная вакцина против кори была получена на растениях табака.

В 1998г были проведены опыты на добровольцах: участники эксперимента получали по

100 г сырого картофеля, продуцирующего антигены энтеропатогенной кишечной палочки. В слизистой кишечника подопытных начали вырабатываться антитела к этому возбудителю. Испытываются «картофельные» вакцины к вирусу диареи и гепатиту В. На животных проводятся испытания «помидорных» вакцин против бешенства.

Микрокапсулированные вакцины. Биодegradирующие микрокапсулы состоят из нетоксичных полимеров лактида или гликолида или их сополимеров. Максимальный диаметр не превышает 10 нм. Такие вакцины можно вводить любым способом (парентерально, орально, интраназально). С помощью микросфер можно проводить комплексную вакцинацию против нескольких инфекций одновременно: каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать смесь различных микрокапсул.

Вакцины-леденцы. Создание этих вакцин основано на способности сахара трегулозы сохранять клетки живыми при крайней степени обезвоживания. Трегулозы особенно много в растениях пустынь. Трегулоза обладает способностью при охлаждении насыщенного раствора постепенно переходит в состояние леденца, которое иммобилизует, защищает и сохраняет белковые молекулы. При контакте с водой леденец быстро тает, высвобождая белки. С помощью такой технологии можно создать разнообразные формы, например вакцинные иглы, которые при введении в кожу постепенно растворяются и высвобождают вакцины с определенной скоростью. Возможен вариант приготовления вакцины в виде быстрорастворимого порошка для ингаляции или для инъекции в кожу.

Чрезкожная иммунизация – еще одно новшество в производстве вакцин. Кожные пластыри, пропитанные В-субъединицей холерного токсина, не вызывают токсического эффекта. При этом, они активируют АПК кожи, способствуя развитию иммунного ответа гуморального и клеточного типов. Такой путь иммунизации испытывается для возбудителей бешенства, столбняка, дифтерии, гриппа.

Последним достижением генной инженерии и биотехнологии стало создание **рекомбинантных противовирусных вакцин, содержащих гибридные молекулы нуклеиновых кислот.** Данные вакцины обладают целым рядом преимуществ. Они характеризуются отсутствием (или значительным снижением) балластных компонентов, полной безвредностью, низкой стоимостью, которая связана с удешевлением промышленного производства вакцин. Экспрессируемый в клетках вакцинированного животного белок имеет конформацию, близкую к нативной, и обладает высокой антигенной активностью.

Таким образом, рекомбинантные противовирусные вакцины являются новейшим поколением вакцин. Их очевидное преимущество обуславливает широкое применение данного типа вакцин в медицине и ветеринарии для вакцинации населения и сельскохозяйственных животных.

Принципы конструирования рекомбинантных противовирусных вакцин. Важным условием получения эффективного вакцинного препарата является соблюдение основных принципов его производства. Конструирование рекомбинантных противовирусных вакцин предполагает: 1) получение соответствующего фрагмента нуклеиновой кислоты; 2) выбор высокоактивной и хорошо изученной в иммунологическом отношении модели вектора-носителя и клонирование соответствующего гена (или генов); 3) выбор системы экспрессии клонированного гена, способной обеспечить максимальный выход и функциональную полноценность продукта; 4) создание достаточно удобных и по возможности универсальных векторов для целевой доставки генов в клетки и ткани организма.

Важным моментом при конструировании ДНК-вакцин является проблема целенаправленной доставки генов в необходимые клетки и защиты вводимых ДНК от действия нуклеаз крови. В результате экспериментальной работы были созданы разнообразные конструкции, позволяющие доставлять целевые гены в клетки-мишени.

Одной из подобных конструкций является модель молекулярного вектора для доставки генов в такие клетки, как лимфоциты и кераноциты. В качестве модельного был использован ген, кодирующий гибридный белок: фактор некроза опухолей-альфа - интерферон-гамма. В центре вектора находится интактная плазмидная ДНК, содержащая доставляемый ген, а на поверхности располагаются антитела к клеткам-мишеням. Конъюгат полиглюкина со спермидином и антителами применяется для связи компонентов (положительно заряженный спермидин обеспечивает связывание конъюгата с плазмидной ДНК). Описанный молекулярный вектор позволяет целенаправленно доставлять гены в клетки-мишени, сводя до минимума их попадание в другие виды клеток, защищать доставляемые гены от нуклеаз крови и использовать положительно заряженный комплекс спермидин-полиглюкин в качестве стимулятора проникновения ДНК в клетки.

Пример генноинженерной вакцины: Вакцина против лейкемии кошек, изготовленная с помощью генной инженерии. Возбудителем лейкемии кошек является ретровирус типа С. Вирус лейкемии кошек (FeLV) имеет в качестве генетического материала молекулу РНК. Вакцина против FeLV, изготовленная традиционным путем, была разработана в Швейцарии. Высокая цена современных вакцин и отсутствие уверенности в отношении длительности

эффекта и надежности вакцины вызвали необходимость создания вакцины с помощью генной инженерии.

При конструировании рекомбинантной вакцины оболочечный протеин вируса (env-ген) клонировался в пивных дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*). Env-ген вначале лигировался с промотором дрожжей (пируваткиназный промотор), а затем клонировался в так называемом "Shuttle"-векторе. Вектор "Shuttle" (челночный вектор) может размножаться как в бактерии *E. coli*, так и в пивных дрожжах *S. cerevisiae*. Он содержит с одной стороны репликационные originiны как для дрожжей, так и для *E. coli*, а с другой стороны селекционный маркер для дрожжей (*leu2* ген) и для *E. coli* (резистентность к ампицилину). Из литра дрожжевой культуры выделяют множество миллиграмм env-протеина и затем тестируют в опыте по вакцинации. Результат вселяет надежду: 10 кошек были иммунизированы env-протеином, причем 4 дали ответ антителами. Через 2 недели провели заражение FeLV. Теперь все животные давали ответ антителами.

Таким образом, полученная вакцина оказалась эффективным средством для борьбы с данным заболеванием.

Адьюванты: Гидрооксид и соли алюминия и кальция. Минеральные масла без бактерий. Минеральные масла с бактериями (микобактерии). Бактерии как адьюванты (*Bordetella pertussis*, *Mycobacterium bovis* (BCG and others). Бактериальные продукты – мурамилпептиды. Синтетические полимеры (Liposomes, ISCOM, Poly-lactate). Полинуклеотиды (CpG). Цитокины (ИЛ-1, 2, 12, ИФНγ и др.).

Лекция № 13. Методы иммунохимического анализа.

Индикация антигенов и антител, их качественное и количественное определение. Определение цитокинов. Определение молекул межклеточной адгезии. Иммунофенотипирование по экспрессии мембранных CD-антигенов.

Существуют следующие основные методы иммунохимического анализа:

Серодиагностика – методы исследований, основанные на закономерностях гуморального иммунитета, а именно – на взаимодействии антигена и специфических антител (преципитинов, агглютининов, антитоксинов, комплементсвязывающих антител). Серологические реакции позволяют во-первых, установить вид антигена, во-вторых, позволяют судить об активности защитных механизмов организма, напряженности иммунитета и его длительности. Результат этих реакций можно наблюдать макроскопически.

Наличие стандартной сыворотки (с известной концентрацией антител) позволяет путем раститровки стандарта получить калибровочную кривую и количественно оценивать содержание антител в испытуемых сыворотках. В случае отсутствия такого стандарта результаты серологических реакций трактуются как качественные или полуколичественные.

Преципитация. Реакция преципитации основана на том, что антитела, соединяясь с растворимым антигеном, вызывают его агрегацию, которая визуализирует образование комплекса Антиген+Антитело. Существуют варианты реакции преципитации в растворе и в геле агарозы (реакции иммунодиффузии в геле, в том числе – ее электрофоретические модификации). Важным условием для протекания реакций преципитации является наличие электролитов (0,15-0,5М раствор NaCl) и pH 6.7-8.7.

Феномен преципитации заключается в образовании нерастворимых комплексов антиген — антитело в результате соединения растворимого антигена со специфическими антителами и выпадении этого комплекса в осадок. Особый случай реакции преципитации — **реакция иммунной флоккуляции**, которая происходит только в относительно узком диапазоне концентраций антигена, а при незначительном избытке антител и антигена образуются растворимые комплексы. Реакцию преципитации используют для количественного определения антигенов и антител, концентрации иммуноглобулинов различных классов в крови людей, в судебно-медицинской экспертизе для определения видовой принадлежности белков сыворотки крови.

Если раствор антигена в определенном соотношении смешать с антисывороткой, то образуется преципитат. Количественный анализ этого процесса дает информацию как о содержании антител в иммунной сыворотке, так и о валентности антигена, т.е. числе участков связывания с антителами. Эта величина может существенно варьировать в зависимости от структуры антигена, его размеров, а также вида животного, от которого были получены антитела. Кривая преципитации по мере добавления антигена вначале показывает максимум преципитата, а затем его количество постепенно уменьшается. При этом в супернатанте появляются растворимые комплексы антигена (Ar) и антител (At), многие из которых имеют строение Ar_4At_3 , Ar_3At_2 и Ar_2At . Небольшие агрегаты увеличивают мутность раствора, которая может быть измерена по рассеянию падающего света (нефелометрия). Данный метод постепенно вытесняет простую радиальную иммунодиффузию при количественной оценке иммуноглобулинов, компонента комплемента C3, C-реактивного белка и т.д. Помимо простой радиальной иммунодиффузии при визуализации реакции преципитации в гелях используются также метод двойной диффузии

по Ухтерлони и иммуноэлектрофорез).

Агглютинация. Феномен агглютинации заключается в том, что микроорганизмы, животные клетки или другие корпускулярные антигенные частицы, находящиеся во взвеси, под влиянием антител склеиваются между собой. Реакция агглютинации нашла широкое применение для определения групп крови человека, резус-фактора, количественного определения антител и антигенов. Реакцию проводят на стеклах, в пробирках или в лунках серологических планшетов. Положительной реакцией считают при выпадении комплексов Антиген+Антитело в виде зонтика.

Взаимодействие антител с клетками или другими крупными частицами приводит к агглютинации последних. Поскольку большинство клеток несет электрический заряд, для преодоления их взаимного отталкивания и связывания между собой требуется довольно значительное количество антител. Реакция агглютинации используется для идентификации бактерий или типирования эритроцитов. Кроме того, удавалось наблюдать агглютинацию лейкоцитов, тромбоцитов и даже сперматозоидов в некоторых случаях мужского бесплодия, связанного с наличием антител к сперматозоидам. Отличаясь чувствительностью и простотой, реакция агглютинации используется и для идентификации антител к растворимым антигенам, которыми нагружают различные частицы. Особенно часто для этой цели используют эритроциты). Существуют модификации реакции агглютинации: Реакция непрямой агглютинации (растворимый антиген фиксируют на корпускулярном носителе (например, на частицах латекса) или эритроцитах).

Способность антител соединять антигенные частицы в крупные конгломераты (агглютинация бактериальных и других клеток, преципитация растворенных антигенов) обуславливается наличием по крайней мере двух активных центров в молекуле антитела. Одна специфическая группа соединяется с одной антигенной детерминантой, другая — с аналогичной детерминантой другой антигенной частицы. Двухвалентность антител обеспечивает возможность соединения неограниченного числа антигенных частиц в конгломераты. При различном числе антигенных детерминант на молекуле антигена характер структуры конгломератов комплекса антиген — антитело может быть разным. При избытке антигена или антител крупные конгломераты вообще не возникают вследствие заполнения реагирующих участков молекул избыточным количеством второго компонента. Вследствие этого реакция Антиген+Антитело максимально проявляются только в определенном диапазоне концентрации обоих реагентов, в так называемой зоне эквивалентности.

Реакция нейтрализации токсинов основана на свойствах антитоксинов (антител против токсинов), которые, соединяясь с соответствующими токсическими веществами, нейтрализуют их. Степень нейтрализации может быть учтена посредством введения восприимчивому животному смеси токсин — антитоксин. Количество антитоксина в иммунной сыворотке характеризуют тем количеством минимальных смертельных доз токсина, которое может быть нейтрализовано определенным количеством сыворотки. Реакцией нейтрализации пользуются для определения концентрации токсинов возбудителей дифтерии, столбняка и др. Для этого применяют стандартизированные антитоксические сыворотки.

Реакция связывания комплемента. В основе РСК лежит взаимодействие комплемент-связывающих антител и соответствующего антигена при участии комплемента. РСК характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью и применяется для диагностики многих инфекционных заболеваний. Реакция протекает в два этапа с использованием двух систем: антигенной (например, бактериальный антиген+специфические антитела в исследуемой сыворотке) и гемолитической (эритроциты барана +гемолизины). Положительной реакция будет считаться в то случае если комплемент свяжется антигенной системой и реакция гемолиза в гемолитической системе не произойдет (т.е. комплекс Антиген+Антитело в первой ситеме прореагировал с комплементом и связал его).

Хроматография аффинная (применяется для очистки антигенов).

Иммунологический анализ с помощью меченых реагентов (в качестве меток используют как радиоактивные, такие как изотопы йода, так и ферменты, в частности, пироксидазу и фосфатазу. На использовании ферментов основан, в частности, метод ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ). Широко используются хемилюминесцентные и флуоресцентные метки). В качестве флуорохромов часто используются флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), дающий в ультрафиолете зеленое свечение, а также тетраметилродаминизотиоцианат (ТРИТЦ), дающий оранжево-красное свечение.

Иммуноблоттинг (вестерн-блоттинг). Иммуноблоттинг (иногда называемый вестерн-блоттингом от английского Western - западный) - это метод исследования белковых антигенов. Белки разделяют с помощью электрофореза и переносят на мембрану. Затем мембрану инкубируют в растворе антител и связанные антитела выявляют с помощью радиоизотопного или ферментного методов. Если белки антисыворотки разделить

изоэлектрофокусированием, а затем перенести (это и называется блотингом) на мембрану, то с помощью меченого антигена можно установить и так называемый спектротип антисыворотки, т.е. определить изотип антител, взаимодействующих с данным антигеном).

Иммуногистохимия. Иммуногистохимия - это определение локализации антигена в клетках и тканях. Флуоресцентные красители, такие как флуоресцеин и родамин, можно химически пришить к антителам, не нарушая их специфичности. Такие конъюгаты взаимодействуют на срезе ткани и могут быть выявлены с помощью микроскопа. При этом можно установить распределение антигена в тканях и клетках. С другой стороны, также можно обнаружить антитела, направленные к известному антигену данной ткани или клетки. Существуют три основных варианта постановки реакции иммунофлуоресценции: прямой иммунофлуоресцентный метод, непрямой иммунофлуоресцентный метод и метод сэндвича. С помощью меченых антител можно обнаружить и поверхностные антигены и выяснить их локализацию. Количество флуоресцирующих антител, связавшихся с каждой клеткой, можно измерить с помощью проточной цитофлуорографии. Помимо иммунофлуоресценции разработаны и методы, предусматривающие использование антител, меченных ферментами, такими, как пероксидаза или фосфатаза. Комплекс антител с ферментами можно выявить обычными гистохимическими методами как на уровне световой, так и электронной микроскопии).

Методы разделения клеток иммунной системы. Эти приемы позволяют, в частности, определять антигены клеточных мембран различных популяций и субпопуляций клеток. Клетки СМФ можно выделить, используя их способность прикрепляться к поверхности пластика. Пропускание исходной взвеси иммунокомпетентных клеток через колонку с нейлоновой ватой сильно обогащает популяцию лимфоцитов Т-лимфоцитами. Суспензию лимфоцитов можно получить, центрифугируя клетки над раствором фикола; лимфоциты при этом отделяются от других лейкоцитов. Более эффективное разделение иммунокомпетентных клеток можно провести с помощью набора моноклональных антител, направленных к специфическим дифференцировочным антигенам, которые экспрессируются на поверхности разных типов клеток. Существует также метод, основанный на способности Т- и В-лимфоцитов образовывать розетки – морфологические комплексы с эритроцитами, которые можно отделить центрифугированием ЕА-, ЕАС-розетки, нагруженными антителами к иммуноглобулинам. Возможно также образование лимфоцитами «розеток» с эритроцитами, нагруженными антителами к иммуноглобулинам. Иногда требуется устранить определенные популяции клеток, например, зрелые Т-лимфоциты из суспензии клеток костного мозга, чтобы ограничить реакцию "трансплантат против хозяина". Для этого

клетки, инкубированные с антителами к Т-лимфоцитам, обрабатывают комплементом или антиглобулиновыми антителами, конъюгированными с высокотоксичными молекулами, например А-цепью рицина. Это приводит к гибели клеток, связавших такие антитела.

Цитофлуориметрический анализ и его мультиплексные варианты. Иммунофенотипирование с использованием цитофлуориметра BD FACS Calibur, определение цитокинов мультиплексными наборами пр-ва BD (США).

Лекция № 14. **Итоговое занятие:**

Динамика формирования иммунного ответа при патологических процессах. Детальная характеристика стадий взаимодействия патогена и чувствительного организма: участие механизмов неспецифической резистентности и специфического иммунного ответа. Вакцины. Принципы усиления иммуногенности антигенов в вакцинных препаратах.

На примере типичных (неинтегративных) вирусных инфекций.

Большая часть вирусов проникает в организм хозяина через барьеры слизистых дыхательных путей и пищеварительного тракта. Поверхность слизистых оболочек обычно защищена рядом неспецифических хозяйских защитных факторов, таких как протеолитические ферменты, слизь, соли желчных кислот. **Для того чтобы заразить клетку, вирусы должны обладать резистентностью к этим агентам.** Так, кишечные вирусы обычно устойчивы к кислым рН, к детергентному действию солей желчных кислот и к разрушению протеолитическими ферментами. Вирус полиомиелита проникает через барьер слизистой кишечника на ранних стадиях заражения перед системным распространением и накапливается в пейеровских бляшках.

Наследственный иммунитет к вирусам зависит от наличия или отсутствия вирусных рецепторов у чувствительных клеток. У чувствительных клеток и тканей на клеточной поверхности есть особые рецепторы, к которым вирус имеет сродство. Например, рецепторы В-лимфоцитов, оказались подходящими для прикрепления вирусов Эпштейна Барр.

Вторым важным фактором устойчивости к вирусам является отсутствие в организме животных ферментов для депротенизации вирусов.

Существенными факторами устойчивости могут быть **вируснейтрализующие ингибиторы**. Ингибиторы могут быть термолабильными и термостабильными, липопротеинами и

гликопротеинами по химической природе. Вирусные ингибиторы содержатся в кожно-слизистых секретах, в сыворотке крови. Механизм действия ингибиторов сходен с действием антител. Ингибиторы, так же как и антитела, соединяются непосредственно с вирусом, блокируют его рецепторы, в результате чего вирус утрачивает способность фиксироваться на поверхности чувствительной клетки и проникать в нее.

Повышение температуры тела до 39-40⁰ С приводит к подавлению репродукции вирусов теплокровных, их температурный оптимум ниже этой точки на 2-3 градуса. Защитная роль лихорадки дополняется стимулирующим влиянием температуры на продукцию интерферона и специфические реакции противовирусного иммунитета.

Интерферон (ИНФ) 1-го типа вырабатывается всеми клетками организма, даже нейронами, но в наибольшей мере макрофагами и лимфоцитами - гамма-ИНФ и фибробластами бета-ИНФ. Бурная выработка ИНФ 1-го типа начинается вслед за проникновением вируса в организм в местах входных ворот. Длительность интерферонообразования зависит от времени репродукции вируса в клетках и может составлять от 5 до 28 дней. Индуцирует интерферонообразование вирионная нуклеиновая кислота. Роль интерферона в защите хозяина от вирусных инфекций не вполне ясна. Интерферон может действовать непосредственно на зараженные вирусом клетки и угнетать продукцию вируса или же активировать противовирусную активность естественных киллерных клеток.

В противовирусном иммунитете многообразно участвует комплемент. Комплемент повышает вируснейтрализующую функцию антител, возникающих в ранние сроки иммунизации (IgM); совместно с антителами вызывает лизис некоторых вирусов, содержащих гликолипидные вещества в структурах их наружных оболочек. Комплемент принимает участие в цитолизе инфицированных вирусами клеток при наличии антител к антигенам, локализованным на их поверхности. Дефицит продукции C3, C1г, C5, C6, а также других компонентов комплемента ведет к снижению защитных реакций в отношении вирусов.

Вирус, нейтрализованный антителами, становится способным фиксировать комплемент, вирус же, нейтрализованный ингибиторами, этим свойством не обладает. При одновременном присутствии в иммунной сыворотке ингибиторов и антител к вирусу присоединяются, прежде всего, антитела, в то время как ингибиторы могут взаимодействовать с вирусом только при наличии свободных, не нейтрализованных антителами рецепторов.

Вирусы обычно плохо фагоцитируются из-за малых размеров и устойчивости к лизосомальным ферментам. Вирусы кори и герпеса могут даже размножаться в фагоцитах. Эффективность фагоцитоза зависит от природы вируса. Макрофаги, полученные от иммунных животных, активно фагоцитировали вирус гриппа. Макрофаги мигрируют и переносят размножающиеся в них вирусы на чувствительные клетки. Способность макрофагов переваривать вирусы постепенно нарастает и у взрослых особей выражена сильнее. Положительным моментом является участие макрофагов в выработке интерферонов, в поглощении заражённых вирусами клеток, медленной инактивации вирусов.

Клеточный иммунитет в отношении вирусов, вследствие особой их природы и своеобразия взаимоотношений с клетками, не ограничивается участием иммунокомпетентных клеток Т, В и макрофагов. Он определяется в значительной мере и функцией многих других клеточных систем.

Защитная функция антител сводится к нейтрализации вируса на его пути к чувствительной клетке, разобщению контактов между вирусом и клеткой, препятствию распространения инфекции от клетки к клетке. Укрупненный комплекс вирус - антитело - комплемент задерживается в барьерных органах (лимфатические узлы, селезенка, печень и др.) и становится достоянием макрофагов и ферментов.

Секреторным антителам отводится большое место в защите от вирусов, проникающих в организм через поверхность слизистых оболочек. Секреторные антитела имеют особое значение при тех инфекциях, при которых поверхности слизистых оболочек являются одновременно входными воротами и местом локализации возбудителя. Состояние иммунитета к гриппу больше коррелирует с секреторными антителами, чем с сывороточными.

Специфические антитела действуют не только на экстрацеллюлярный вирус, но и на вирус, фиксированный рецепторами чувствительной клетки. В первые 15-30 мин после адсорбции вируса на клетках при 37°C антитела могут нейтрализовать от 40 до 70% адсорбированного вируса.

По мнению многих исследователей, внутриклеточный вирус недоступен для антител.

Предполагают, что при наличии в питательной среде антител вирус герпеса избегает их действия в результате перехода из клетки в клетку, минуя внеклеточную среду. Вирусы герпеса и цитомегалии распространяются через контактирующие друг с другом клеточные мембраны, что защищает их от воздействия антител или термолабильных ингибиторов. Не эффективны гуморальные факторы и в отношении онкогенных вирусов, интегрированных с геномом клетки хозяина. Основную роль в подавлении активности внутриклеточных вирусов играют сенсibilизированные Т-лимфоциты, ответственные за развитие гиперчувствительности замедленного типа и отторжение чужеродных трансплантантов. Такие Т-лимфоциты, реагируя с поражёнными клетками, выделяют лимфоцитотоксины, которые парализуют деление, а затем разрушают клетки. Одновременно Т-лимфоциты выделяют другие цитокины, повышающие фагоцитарную активность макрофагов. При распаде инфицированных клеток вирусы обезвреживаются вируснейтрализующими антителами.

Предохранить от возникновения вирусной инфекции может очень малое количество антител. Всего двух или четырех молекул антитела достаточно, чтобы, присоединившись к критическим местам отростка фага, они предотвратили присоединение его к бактериям.

Опсонизирующее и агглютинирующее действие антител на вирусы имеет фундаментальное значение для устранения вирусемии. Антитела агломерируют вирионы и тем способствуют барьерной функции регионарных лимфатических узлов, делая их практически непроницаемыми для соответствующего вирусного антигена.

Длительный и напряжённый противовирусный иммунитет создаётся в результате наработки вируснейтрализующих антител и активации Т-лимфоцитов. Если вируснейтрализующих антител не образуется, инфекция протекает тяжело, затягивается, даёт высокий процент летальности. Высокий уровень вируснейтрализующих антител приводит к быстрому выздоровлению. Значение антител в активно и пассивно приобретенном иммунитете хорошо доказано. Совпадение времени появления специфических антител с прекращением или ослаблением инфекции, вызванной вирусом, даёт основание усматривать причинную связь между этими процессами. При многих вирусных инфекциях установлена прямая зависимость между титрами антител в крови переболевших и резистентностью к инфекции. Многочисленные серологические и эпидемиологические наблюдения показали, что эпидемиям гриппа предшествуют низкие

титры антител в крови. Заболевания гриппом чаще наблюдались у лиц с низкой нейтрализующей активностью носового секрета.

Развитие гуморального иммунитета играет важную роль в защите хозяина от повторной инфекции тем же вирусом.

Несмотря на то, что иммунный ответ в целом полезен для хозяина и приводит организм к выздоровлению, в разных отделах иммунной системы отмечен и противоположный эффект, который может вносить вклад в патогенное действие вируса. Так, группа детей, иммунизированных экспериментально убитой вирусной вакциной, более тяжело переносила болезнь, вызванную естественным заражением респираторно-синцитиальным вирусом по сравнению с контрольной.

Иммунный ответ на вирусную инфекцию может также завершаться образованием аутоантител, направленных против нормальных тканей, не зараженных вирусом.

Состояние персистенции или латентности может быть также естественным следствием заражения нормального хозяина некоторыми вирусами. При персистентной или латентной инфекции организм может быть резервуаром для дальнейшего распространения вируса. Многие хронические инфекции, вызываемые вирусами, развиваются в результате иммуносупрессии.

Несмотря на то, что точные биохимические механизмы, регулирующие персистенцию вирусов, еще неизвестны, изучение персистентно зараженных культур-носителей представляет уникальную модель совместной эволюции вирусов и клеток хозяина. Эти культуры представляют собой источник вирусных мутантов и мутантов клеток хозяина.

В процессе эволюции складываются наиболее удачные, с точки зрения сохранения вида, взаимоотношения между вирусами и хозяевами. Это чаще всего соответствует среднему уровню вирулентности возбудителя и восприимчивости хозяина.

Нередко, для вирусной популяции персистирующая инфекция является выгодным типом взаимоотношений с хозяевами. Особенно большое значение такой тип взаимоотношений имеет в период, неблагоприятный для передачи данного возбудителя и для состояния популяции хозяев. Персистенция вирусов в организме птиц и летучих мышей может обеспечить диссеминацию адаптированных к этим хозяевам возбудителей на огромной территории в период сезонных миграций. Вирусная персистенция в ряде случаев

приводит к изменению свойств вирусной популяции. Хронические и латентные формы, вероятно, играют решающую роль в сохранении вирусов в межэпидемическом периоде. При многих персистирующих вирусных инфекциях (лимфоцитарный хориоменингит, лейкозы у мышей и кур и т. д.) антитела синтезируются, но они обнаруживаются в виде комплексов с антигенами и комплементом и являются нередко причиной болезни «иммунных комплексов». На естественную резистентность к вирусам существенное влияние оказывают гормональные факторы. Так называемые ослабленные вакцинные штаммы, дефектные по некоторым генетическим маркерам вирусы, по-видимому, обладают повышенной способностью к развитию персистирующей инфекции на этом генетическом уровне. Вакцинные вирусы (вакцины против кори, полиомиелита и оспы) способны проникать в мозг с дальнейшей их персистенцией от 6 до 20 сут. Прививка осповакцины детям с недостаточностью клеточного иммунитета может вызвать диссеминированную инфекцию. Недостаточность продукции антител секреторного типа (IgA) сопровождается более частыми вирусными инфекциями легких и кишечника.

Продвижение возбудителя через барьеры (на примере вирусных инфекций)

Стадии внедрения патогенных микробов в организм человека хорошо изучены и имеют общие черты, как для вирусов, так и для бактерий. Вирусные инфекции на сегодняшний день преобладают. Ниже приводится описание процесса продвижения вирусов по организму в процессе развития инфекции. Защитные реакции организма от вирусов проявляются на трех условно разделяемых линиях защиты: 1) у входных ворот; 2) на пути продвижения вируса к чувствительной клетке; 3) на территории инфицированной клетки.

1-ая линия обороны (у входных ворот). Вирусы могут проникать в организм или через поврежденную кожу или, чаще, через слизистые оболочки дыхательных путей и пищеварительного тракта, а также конъюнктиву глаза. Нормально функционирующая кожа служит надежной защитой от вирусов, и только повреждение кожных покровов открывает путь для проникновения вирусов в организм.

Многочисленные виды кровососущих членистоногих могут вносить через кожные покровы в организм человека возбудителей различных трансмиссивных заболеваний: клещевого и японского энцефалита, желтой лихорадки, лихорадки Денге и др. Через укусы собак, волков, лисиц, грызунов передается вирус бешенства.

Слизистые оболочки являются менее надежной защитой, чем кожа. Этим можно объяснить тот факт, что большинство вирусов - респираторные вирусы, энтеровирусы и др. - проникает в организм через слизистые покровы. Однако и слизистые оболочки не беззащитны. У входных ворот, т. е. на первой линии защиты организма от вирусной инфекции, проявляют свою активность как неспецифические, так и специфические факторы иммунитета. Помимо механической защиты - удаления с поверхности слизистой оболочки посторонних частиц, а вместе с ними и вирусов ресничками мерцательного эпителия и жидкостью, омывающей клетки, у входных ворот происходит нейтрализация вирусов ингибиторами и секреторными антителами. Антитела и ингибиторы в секретах слизистой оболочки респираторного тракта — первый барьер, определяющий резистентность к заражению. Эффективность защитного действия антител и ингибиторов у входных ворот также зависит от природы вируса и, прежде всего, от его вирулентности и инфицирующей дозы.

При повышении дозы вируса увеличивается возможность преодоления им защитных факторов. Противовирусный иммунитет зависит и от патогенеза инфекции. При гриппе, например, когда эпителиальные клетки дыхательного тракта являются не только местом проникновения вируса, но и основным местом его репродукции, наибольшее значение имеют антитела экстрацеллюлярной жидкости, которая омывает поверхность чувствительных к вирусу клеток и тонким слоем покрывает их. Для инфекций же, характеризующихся вирусемической фазой, будут иметь значение антитела не только у входных ворот инфекции, но и в кровяном русле, по которому вирусу предстоит проделать путь к чувствительным клеткам. Чем длиннее путь до чувствительных клеток, который необходимо вирусу пройти, тем больше препятствий он встретит. Например, вирусу полиомиелита, прежде чем он достигнет клеток передних рогов спинного мозга, где он локализуется. Этим можно объяснить сравнительно высокую эффективность иммунитета после прививок к полиомиелиту. Наоборот, если входные ворота и чувствительные к вирусу клетки локализованы в одном и том же месте, как при гриппе, - в слизистой оболочке верхних дыхательных путей, то организму труднее реализовать защитные факторы иммунитета. Вируснейтрализующие антитела крови при этом будут действовать лишь в той степени, в какой они в состоянии проникать на поверхность оболочки.

Многие вирусы, прежде чем распространиться по системам, реплицируются в месте первичного проникновения в организм хозяина. При заражении вирусом полиомиелита

первичная репликация происходит в лимфоидных фолликулах дыхательных путей и пищеварительного тракта.

Вирусы могут распространяться несколькими путями в зависимости от места проникновения и поражаемых ими органов-мишеней: нейронный путь (например, при бешенстве); лимфатический путь; гематогенный: а) ассоциированный с клеточными элементами, например, при краснухе; б) в свободном виде с плазмой, например, в случае энтеровирусов.

Вирус краснухи распространяется в ассоциации с лимфоцитами крови, как цитомегаловирус и вирус лимфоцитарного хориоменингита. Реовирус и вирус полиомиелита распространяются из пейеровских бляшек к лимфоузлам, очевидно, через лимфу.

2-ая линия обороны (на пути продвижения к чувствительной клетке).

Прямое соответствие между концентрацией антител в крови и титром их в секретах респираторного тракта не всегда имеет место. При определенных условиях вирус может преодолевать первую линию защиты - ингибиторы и антитела (если таковые имелись) — и проникать в эпителиальные клетки слизистой оболочки дыхательного тракта (респираторные вирусы) или в подлежащие ткани (вирусы, имеющие другую локализацию), где и образуется *первичный очаг вирусной инфекции*. Однако, разовьется ли инфекция в заболевание или защитные факторы окажутся в состоянии преодолеть ее у входных ворот, будет зависеть как от природы вируса, так и от активности защитных факторов.

В первичном очаге могут функционировать вируснейтрализующие антитела, ингибиторы, комплемент, поступающий из жидкой части крови и потенцирующий нейтрализующую функцию антител. Развивается местная воспалительная реакция, в очаг привлекаются полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги, лимфоциты. Клетки первичного очага в результате взаимодействия с вирусом вырабатывают интерферон, защищающий не только уцелевшие от инфекции клетки у входных ворот, но и удаленные от первичного очага. В первичном очаге создаются условия, приводящие к местному повышению температуры, ацидозу, гипоксии, а все эти факторы способствуют инактивации вирусов. В первичном очаге в ответ на поступление чужеродных антигенов начинают функционировать иммунокомпетентные клетки и макрофаги. На пути продвижения вируса к чувствительной клетке (вторая линия защиты) продолжают действовать в более активной форме ингибиторы и антитела. Клеточная реакция лимфатических узлов создает значительную преграду для

вируса, особенно если он был нейтрализован антителами. В лимфатических узлах, как известно, сосредоточены в значительном количестве как фагоцитирующие, так и образующие антитела клетки, т. е. элементы, наиболее активные в иммунологическом отношении. Здесь часто создаются непреодолимые для микробов защитные барьеры, благодаря чему развитие инфекции приостанавливается.

3-я линия обороны (в инфицированной клетке). Однако и клетки лимфатических узлов с их многообразными функциями оказываются не всегда в состоянии купировать развитие инфекционного процесса. В этом случае вирусы по лимфатическим и кровеносным сосудам продвигаются к чувствительным клеткам, где они преимущественно и размножаются. Вирусы, которым удалось преодолеть специфические и неспецифические клеточные и гуморальные факторы иммунитета, приходят в контакт с чувствительными клетками, проникают в них и репродуцируются.

Однако и восприимчивые клетки (третья линия защиты) не остаются пассивными к вирусу. Они проявляют разнообразные защитные реакции и на этой последней, третьей, линии защиты от инфекции. Клетки начинают вырабатывать интерферон, способствуя возникновению невосприимчивости у неинфицированных клеток. Усиленная секреция инфицированными клетками способствует выведению из них вируса.

Образование внутриклеточных включений ведет к ограничению распространения вируса по организму. Иммуный цитолиз, осуществляемый антителами и комплементом, ведет к деструкции инфицированных клеток, а вместе с ними и вируса. Цитолиз пораженных клеток, вызываемый сенсibilизированными Т-лимфоцитами, приводит к такому же эффекту. Фагоцитоз инфицированных клеток, а также клеток, адсорбировавших на своей поверхности вирусные антигены, окончательно устраняет не только пораженные клетки, но и вирусы.

Защита организма от вирусной инфекции, таким образом, реализуется на трех уровнях: молекулярном, клеточном и уровне организма. На молекулярном уровне происходит взаимодействие иммуноглобулинов и комплемента с молекулярными группами вирусов. Молекулярные механизмы лежат в основе действия ингибиторов, кофактора, ферментов, интерферона. Иммунокомпетентные клетки Т, В и макрофаги осуществляют распознавание вирусных антигенов, продукцию антител, выработку различных медиаторов, координирующих функцию как самих этих клеток, так и веществ, воздействующих на антиген, вызывают цитолиз пораженных вирусами клеток, а также их фагоцитоз.

Молекулярные и клеточные факторы и механизмы иммунитета находятся под регулирующим влиянием функций и систем целостного организма: повышенной местной и общей температуры, гормональных реакций, секреторно-выделительных процессов и др..

Специфические и неспецифические реакции иммунитета направлены также и на восстановление постоянства внутренней среды, нарушаемого вторжением вируса и вызванными им изменениями. Нейтрализация токсических продуктов, возникающих в результате взаимодействия вируса и клеток и повреждения последних, так же необходима организму, как и нейтрализация специфических вирусных белков и нуклеиновых кислот.

Клеточные и гуморальные иммунные реакции направлены к новым антигенам, возникающим в клетках под действием вирусов. В результате синергической активности вирусов, например вируса гриппа, в клетках респираторного тракта возникает новый антиген Томсена - Фриденрейха. В ответ на его появление образуются антитела, которые вместе с комплементом участвуют в повреждении клеток, содержащих этот антиген. В цитолизе этих клеток принимают участие сенсибилизированные Т-лимфоциты и Мф.

Стойкость противовирусного иммунитета переменна. При нарушении функций иммунной системы вирусы способны ускользать от действия иммунных факторов. Активность Т-лимфоцитов резко снижается при герпесе. Вирусы ветряной оспы, цитомегалии, инфекционного мононуклеоза стимулируют систему Т-супрессоров. Персистируя в клетках-мишенях, вирусы могут нарушать их функции (фагоцитоза, хемотаксиса, секреции антител, продукции медиаторов иммунного ответа). Именно по такому пути протекает цитомегаловирусная инфекция. Иногда в макрофагах может происходить репликация вируса, и вирус способен вызвать цитопатический эффект в различных органах, что может привести к летальному исходу. При вирусных инфекциях происходит интенсивный распад инфицированных клеток хозяина под влиянием иммунных факторов, что может запустить аутоиммунный процесс с образованием большого количества иммунных комплексов и развитием иммунокомплексных поражений. Развивающаяся воспалительная реакция может быть проявлением иммунопатологии. Многие вирусы запускают аутоиммунные воспалительные ответы, обычно включающие Т-клетки, что объясняют общностью антигенов вирусов, в том числе и ВПГ, с антигенами тканей хозяина (молекулярная мимикрия).

В защите от ряда вирусных инфекций важное значение принадлежит местному иммунитету. Продукция противовирусных антител IgA локально расположенными иммунными клетками имеет важнейшее значение для предотвращения развития заболевания.

Вакцинопрофилактика, Серотерапия, Индукторы цитокинов (преимущественно, индукторы интерферона), Иммуoadъюванты, Иммуномодуляторы, Специфические антибактериальные и противовирусные препараты составляют современный арсенал борьбы с инфекционными заболеваниями.



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Дальневосточный федеральный университет»
(ДФУ)

ШКОЛА ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

ФОНД ОЦЕНОЧНЫХ СРЕДСТВ

по дисциплине «Иммуногенетика и основы патологии»
Направление подготовки –06.04.01 Биология
магистерская программа «Биологические системы: структура,
функции, технологии»
Форма подготовки очная

Владивосток
2017

Код и формулировка компетенции	Этапы формирования компетенции	
<p>ПК-1 способностью творчески использовать в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность (профиль) программы магистратуры</p>	Знает	основные понятия; достоинства и недостатки методов современной биологии
	Умеет	применять теоретические знания в решении исследовательских задач
	Владеет	современным представлением о методах исследования белков и ферментов, классификации ферментов, принципах работы активаторов и ингибиторов ферментативных реакций, биологических процессах, в которых участвуют ферменты.
<p>ПК-8 готовностью способствовать развитию аквакультуры и рыбохозяйственных комплексов как важного стратегического потенциала региональной экономики</p>	Знает	теоретические основы работы современной приборно-исследовательской базы
	Умеет	осуществлять отбор материала, проводить пробоподготовку иммунокомпетентных клеток и различных иммуноактивных молекул и последующий их анализ
	Владеет	навыками работы с иммунокомпетентными клетками, препаратами иммуноглобулинов и цитокинов, основными методами их анализа
<p>ПК-13 готовностью использовать в педагогической деятельности знания об истории развития морской биологии на Дальнем Востоке, вкладе дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-производственный потенциал страны</p>	Знает	современные методы и информационно-коммуникационные технологии для использования в педагогической деятельности
	Умеет	использовать современные в области биохимии, микробиологии и биотехнологии
	Владеет	современными методами и информационно-коммуникационными технологиями для

		педагогической деятельности, разъясняет слушателям вклад дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-производственный потенциал страны
--	--	---

пп/п	Контролируемые разделы / темы дисциплины	Коды и этапы формирования компетенций		Оценочные средства - наименование	
				Текущий контроль	Промежуточная аттестация
1	Раздел 1. Генетические механизмы иммунитета. Иммуногенетика как научное направление, изучающее генетическую обусловленность факторов иммунитета	ПК-1 ПК-8 ПК-13	Знает Умеет Владеет	УО-1	Вопросы 1-61
				УО-1	Вопросы 1-61
				УО-1	Вопросы 1-61 Экзамен
2	Раздел II. Основы патологии Фундаментальные основы патологии. Характеристика молекулярных и клеточных механизмов формирования иммунопатологических состояний, дегенеративных и онкологических заболеваний у человека и животных	ПК-1 ПК-8 ПК-13	Знает Умеет Владеет	УО-1	Вопросы 62-80 Экзамен

Шкала оценивания уровня сформированности компетенций

Код и формулировка компетенции	Этапы формирования компетенции	
<p>ОПК-3 готовность использовать фундаментальные биологические представления в сфере профессиональной деятельности для постановки и решения новых задач</p>	Знает	<p>Основы иммунологии, генетические механизмы иммуногенеза, фундаментальные механизмы развития патологии человека и животных необходимые для работы в проектных междисциплинарных командах</p>
	Умеет	<p>Использовать знания основ иммуногенетики и основ патологии для работы в проектных междисциплинарных командах</p>
	Владеет	<p>Навыками работы в проектных междисциплинарных командах, в том числе в качестве руководителя с использованием знаний основ иммуногенетики и фундаментальных вопросов патологии</p>
<p>ПК-1 способностью творчески использовать в научной и производственно-технологической деятельности знания фундаментальных и прикладных разделов дисциплин (модулей), определяющих направленность (профиль) программы магистратуры</p>	Знает	<p>Основы иммунологии, генетические механизмы иммуногенеза, фундаментальные механизмы развития патологии человека и животных, необходимые для научной и производственно-технологической деятельности для решения задач профессиональной деятельности</p>
	Умеет	<p>Творчески использовать знание основ иммунологии, иммуногенетики и фундаментальных механизмов развития патологии человека и животных для решения задач в научной и производственно-технологической деятельности</p>
	Владеет	<p>Навыками для решения задач профессиональной деятельности с использованием знаний иммунологии, генетических механизмов иммуногенеза, фундаментальных механизмов развития патологии человека и животных</p>
<p>ПК-8 готовность способствовать развитию аквакультуры и рыбохозяйственных комплексов как важного стратегического потенциала</p>	Знает	<p>Основы иммунологии, генетические механизмы иммуногенеза, фундаментальные механизмы развития патологии человека и животных, необходимые для развития аквакультуры и рыбохозяйственных комплексов как важного стратегического потенциала региональной экономики (в том числе – для получения БАВ и лекарственных препаратов из морских гидробионтов)</p>

региональной экономики	Умеет	Использовать знание основ иммунологии, иммуногенетики и основ патологии для развития аквакультуры и рыбохозяйственных комплексов как важного стратегического потенциала региональной экономики (в том числе – для получения БАВ и лекарственных препаратов из морских гидробионтов)
	Владеет	Навыками руководства коллективом в сфере развития аквакультуры и рыбохозяйственных комплексов как важного стратегического потенциала региональной экономики
ПК-13 готовность использовать в педагогической деятельности знания об истории развития морской биологии на Дальнем Востоке, вкладе дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-произв. потенциал страны	Знает	Основы иммуногенетики и основ патологии, необходимые для развития морской биологии на Дальнем Востоке
	Умеет	использовать знание основ учения о биосфере, понимание современных биосферных процессов для развития морской биологии на Дальнем Востоке
	Владеет	Навыками использования знаний об истории развития морской биологии на Дальнем Востоке, вкладе дальневосточных ученых в научно-исследовательский и научно-производственный потенциал страны

ОЦЕНОЧНЫЕ СРЕДСТВА:

1. Устный опрос (УО):
 - а) собеседование (УО-1).
 - б) доклад, сообщение (УО-3).
 - в) дискуссия (УО-4).
2. Письменные работы (ПР):
 - а) тесты (ПР-1).
 - б) реферат (ПР-4).

Устный опрос - наиболее распространенный метод контроля знаний студентов. При устном опросе устанавливается непосредственный контакт между преподавателем и студентами, в процессе которого преподаватель получает широкие возможности для изучения индивидуальных возможностей усвоения студентами учебного материала. Он

является наиболее распространенной и адекватной формой контроля знаний учащихся. Включает в себя собеседование.

Критерии оценки устного ответа:

Оценка «отлично» ставится тогда, когда студент свободно владеет материалом в полном объеме, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в качестве ответов на дополнительные вопросы.

Оценка «хорошо» ставится тогда, когда студент уверенно владеет материалом, кроме того, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в ответах на дополнительные вопросы, и если допускает ошибки при ответе на вопросы преподавателя, то при этом может исправить ошибку при задании ему наводящих вопросов.

Оценка «хорошо» ставится тогда, когда студент уверенно владеет материалом, кроме того, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в ответах на дополнительные вопросы, и если допускает ошибки при ответе на вопросы преподавателя, то при этом может исправить ошибку при задании ему наводящих вопросов.

Оценка «удовлетворительно» ставится тогда, когда студент испытывает затруднения при ответе на экзаменационные вопросы преподавателя, неуверенно владеет материалам изучаемой дисциплины, однако может ответить на вопросы экзаменационного билета при задании преподавателем наводящих вопросов.

Доклад, сообщение.

Продукт самостоятельной работы обучающегося, представляющий собой публичное выступление по представлению полученных результатов решения определенной учебно-практической, учебно-исследовательской или научной темы. Доклад делается по теме, которую студент выбирает из предложенных в рамках каждого практического занятия.

Критерии оценки доклада, сообщения:

5 баллов выставляется студенту, если он полностью раскрыл предложенную тему, провел анализ проблемы с привлечением дополнительной литературы; выводы обоснованы; представляемая информация систематизирована, последовательна и логически связана; отсутствуют ошибки в представляемой информации; ответы на вопросы полные, с приведением примеров и/или пояснений.

4 балла выставляется студенту, если проблема раскрыта, проведен анализ проблемы, но без привлечения дополнительной литературы; не все выводы сделаны и/или

обоснованы; представляемая информация не систематизирована и не последовательна; не более 2 ошибок в представляемой информации; ответы на вопросы полные и/или частично полные.

3 балла выставляется студенту, если проблема раскрыта не полностью, выводы не сделаны и/или выводы не обоснованы; представляемая информация не систематизирована и/или не последовательна; 3-4 ошибки в представляемой информации; были даны только ответы на элементарные вопросы.

2 балла выставляется студенту, если проблема не раскрыта; отсутствуют выводы; представляемая информация логически не связана; больше 4 ошибок в представляемой информации; нет ответов на вопросы.

Дискуссия – это оценочное средство, позволяющее включить обучающихся в процесс обсуждения спорного вопроса, проблемы и оценить их умение аргументировать собственную точку зрения. Дискуссия используется для обсуждения основных тем докладов в рамках практических занятий. Чтобы быть готовым к дискуссии необходимо готовиться к каждому практическому занятию, используя рекомендуемую основную и дополнительную литературу, а также лекционный материал.

5 баллов выставляется студенту, если он/она не менее двух-трех раз включался в дискуссию по обсуждаемой проблеме; выразил своё мнение по сформулированной проблеме, аргументировал его, точно определив ее содержание и составляющие; были приведены данные отечественной и зарубежной литературы, статистические сведения, информация нормативно-правового характера; продемонстрировано знание и владение навыком самостоятельной исследовательской работы по теме исследования; фактических ошибок, связанных с пониманием проблемы, в процессе обсуждения допущено не было.

4 балла выставляется студенту, если он/она хотя бы один-два раза включался в дискуссию по обсуждаемой проблеме; его выступления характеризовались смысловой цельностью, связностью и последовательностью изложения; допущено не более 1 ошибки при объяснении смысла или содержания проблемы; для аргументации приводились данные отечественных и зарубежных авторов; продемонстрированы исследовательские умения и навыки; фактических ошибок, связанных с пониманием проблемы, в процессе обсуждения допущено не было.

3 балла выставляется студенту, если он/она только один раз включался в дискуссию, при этом не выражая свою точку зрения по обсуждаемой проблеме; из выступления было видно, что проведен достаточно самостоятельный анализ основных составляющих

проблемы; есть понимание базовых основ темы; при подготовке были привлечены основные источники по рассматриваемой теме; допущено не более 2 ошибок в смысле или содержании проблемы.

2 балла выставляется студенту, если он, присутствуя на занятии, никак не включался в дискуссию по теме практического занятия; не было высказано каких бы то ни было комментариев, не проведено анализа; допущено три или более трех ошибок смыслового содержания раскрываемой проблемы.

Тест является письменной или компьютерной формой контроля, направленной на проверку владения терминологическим аппаратом и конкретными знаниями в области фундаментальных и прикладных дисциплин.

Критерии оценки теста:

5 баллов выставляется студенту, если он ответил на 100-85 % от всех вопросов.

4 балла выставляется за правильный ответ на 75-85 % от всех вопросов.

3 балла выставляется за правильный ответ на 65-75 % от всех вопросов.

2 балла выставляется за правильный ответ на 50-65 % от всех вопросов.

1 балл выставляется за правильный ответ менее чем на 50 % от всех вопросов.

Реферат. Продукт самостоятельной работы обучающегося, представляющий собой краткое изложение в письменном виде полученных результатов теоретического анализа определенной научной (учебно-исследовательской) темы, где автор раскрывает суть исследуемой проблемы, приводит различные точки зрения, а также собственные взгляды на нее. Тема реферата выбирается студентом самостоятельно из предложенных тем в рамках каждого практического занятия.

Критерии оценки реферата:

5 баллов выставляется студенту, если реферат показывает глубокое и систематическое знание всего программного материала и структуры конкретного вопроса; студент демонстрирует отчетливое и свободное владение концептуально-понятийным аппаратом, научным языком и терминологией соответствующей научной области, знание основной литературы и знакомство с дополнительно рекомендованной литературой; логически корректное и убедительное изложение ответа.

4 балла выставляется студенту за знание узловых проблем темы и основного содержания вопроса; умение пользоваться концептуально-понятийным аппаратом в процессе анализа основных проблем в рамках данной темы; знание важнейших работ из

списка рекомендованной литературы; в целом логически корректное, но не всегда точное и аргументированное изложение ответа.

3 балла выставляется за фрагментарные, поверхностные знания важнейших разделов темы и содержания вопроса; затруднения с использованием научно-понятийного аппарата и терминологии учебной дисциплины; неполное знакомство с рекомендованной литературой; частичные затруднения с выполнением предусмотренных программой заданий; стремление логически определенно и последовательно изложить ответ.

2 балла выставляется за незнание, либо отрывочное представление о данной проблеме в рамках учебно-программного материала; неумение использовать понятийный аппарат; отсутствие логической связи в ответе.

В качестве заключительного этапа промежуточной (семестровой) аттестации по дисциплине «Иммуногенетика и основы педиатрии», предусмотрен экзамен.

ТЕМЫ ДЛЯ ДИСКУССИЙ

Тема 1. Основные фундаментальные и практические задачи, решаемые иммуногенетикой. Предмет и задачи иммуногенетики. Иммунологическая реактивность и технологии иммунологической инженерии.

Тема 2. Основные понятия об антигенах. Генетика эритроцитарных и лимфоцитарных антигенов совместимости. HLA-антигены 1, 2 и 3 классов.

Тема 3. Иммуноглобулины. Идиотопы. Генетика изотипов и идиотипов антител. Генетические особенности кодирования синтеза легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Тема 4. Клеточные элементы иммуногенеза. Генетика антиген-распознающих рецепторов В- и Т-лимфоцитов. Механизмы рестрикции Т-клеточного иммунного ответа по антигенам МНС.

Тема 5. Иммунохимия факторов неспецифической резистентности. HLA-гены 3 класса и генетика системы комплемента. Гены и псевдогены дефензинов человека.

Тема 6. Молекулярные взаимодействия в межклеточной кооперации при иммунном ответе. Гены корецепторных и адгезивных молекул лимфоцитов и антиген-презентирующих клеток.

Тема 7. Воспаление: механизмы индукции, контроля и разрешения. Гены иммунологической реактивности: их роль в контроле силы иммунного ответа, а также – в индукции и регуляции воспалительных процессов.

Тема 8. Цитокиновые механизмы регуляции иммуногенеза. Гены цитокинов и механизмы регуляции их экспрессии.

Тема 9. Биотехнологические аспекты иммунологии. Получение и испытания цитокиновых, а также вакцинных и сывороточных препаратов.

Тема 10. Динамика иммуногенеза. Гены иммунологической реактивности: сильный и слабый варианты иммунного ответа на различные антигены.

Тема 11. Иммунологические чек-пойнты и их роль в поддержании антигенно-структурного гомеостаза. Роль иммунологических чекпойнтов CD28/CTLA-CD80/86 и PD1/PD1L в патогенезе иммунологических нарушений при аутоиммунных и онкологических заболеваниях.

Тема 12. Регуляция клеточного цикла. Циклины и CDK. Онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста: их роль в канцерогенезе.

ЗАЧЕТНО-ЭКЗАМЕНАЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Образец экзаменационного билета.

Вопрос 1.	Какие классы иммуноглобулинов вам известны. Что такое изотипы, аллотипы и идиотипы антител?
Вопрос 2	Генетические механизмы разнообразия variability антител по изотипам и специфичности. Каковы генетические механизмы, определяющие различия классов иммуноглобулинов? Характеристика генетических механизмов переключения изотипа синтезируемых антител в процессе антителогенеза.
Вопрос 3	Гормоны и цитокины, факторы роста: роль в канцерогенезе. Применение гормональных и цитокиновых препаратов в комплексной терапии рака.

Пояснение принципа составления экзаменационного билета и критерии оценки экзамена. В каждом билете имеется по 3 вопроса. В первом вопросе тестируется знание базовых вопросов иммунологической науки – строение и механизмы функционирования гуморальных и клеточных факторов Innate и Adaptive Immunity. Во втором вопросе тестируется знание генетических механизмов функционирования иммунной системы. В третьем вопросе тестируется знание этиологических и патогенетических факторов

развития различных типов патологии человека и животных (преимущественно – иммунопатологии, дегенеративных и онкологических заболеваний).

Критерием оценки ответов экзаменуемого является знание всех представленных в билете разделов.

Оценка «отлично» ставится тогда, когда студент свободно владеет материалом в полном объеме, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в качестве ответов на дополнительные вопросы.

Оценка «хорошо» ставится тогда, когда студент уверенно владеет материалом, кроме того, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в ответах на дополнительные вопросы, и если допускает ошибки при ответе на вопросы преподавателя, то при этом может исправить ошибку при задавании ему наводящих вопросов.

Оценка «хорошо» ставится тогда, когда студент уверенно владеет материалом, кроме того, легко ориентируется в материале изучаемой дисциплины, что отмечается в ответах на дополнительные вопросы, и если допускает ошибки при ответе на вопросы преподавателя, то при этом может исправить ошибку при задавании ему наводящих вопросов.

Оценка «удовлетворительно» ставится тогда, когда студент испытывает затруднения при ответе на экзаменационные вопросы преподавателя, неуверенно владеет материалам изучаемой дисциплины, однако может ответить на вопросы экзаменационного билета при задавании преподавателем наводящих вопросов.

Вопросы для экзамена:

1. Принципы классификации антигенов. Гены МНС и антигены главного комплекса гистосовместимости.

2. Генетические механизмы разнообразия вариабельности антител по изотипам и специфичности.

3. Какой участок молекулы антигена называется «детерминантной группой»? Какими генными кластерами кодируется?

4. Какие функции в молекуле антигена выполняют эпитоп, несущая часть митогенный участок и агретоп? Варианты строения идиотопов этих участков иммуноглобулиновой молекулы.

5. Хромосомная локализация генов МНС(человек и мышь) и принципы их функционирования.

6. Какие классы иммуноглобулинов вам известны. Каковы генетические механизмы, определяющие различия классов иммуноглобулинов? Характеристика генетических механизмов переключения изотипа синтезируемых антител в процессе антителогенеза.

7. Изотипы. Происходят ли изменения специфичности, аффинности и авидности антител при переключении синтеза иммуноглобулинов с одного класса на другой? Генетический механизм такого переключения.

8. Генетические механизмы разнообразия специфичности антиген-распознающих рецепторов В-лимфоцитов.

9. В чем отличие Т-зависимых и Т-независимых антигенов? Какие антигены: Т-зависимые или Т-независимые вызывают образование антител с большей аффинностью?

10. Хромосомная локализация и характеристика кластерной структуры генов МНС I и II классов у человека и мыши.

11. Дайте определение понятий аффинность и авидность антител. Генетические механизмы образования антител с максимальной аффинностью к антигену.

12. В чем состоит отличие полных и неполных антигенов? Антигены возбудителей инфекционных заболеваний. Перекрестно-реагирующие антигены микробной природы и иммунопатология. Дайте определение протективности антигена.

13. Генетические механизмы разнообразия специфичности антиген-распознающих рецепторов Т-лимфоцитов.

14. Чем обусловлено отличие сильных и слабых антигенов? Ir-гены и сила иммунного ответа на антиген. Принципы выявления сцепленности генов иммунологической реактивности с МНС-генами.

15. Генетические механизмы контроля иммунологической реактивности. HLA-типирование и выявление генетической предрасположенности человека к различным заболеваниям.

16. В чем отличие конформативных и секвенциальных эпитопов? Какие антигены оптимальны для их использования в вакцинных препаратах?

17. Какие иммунокомпетентные клетки участвуют в распознавании антигена, синтезе антител и его контроле? Генетический контроль синтеза мембрано-связанных антиген-распознающих рецепторов различных популяций и субпопуляций лимфоцитов.

18. Каковы механизмы киллинга инфекционных патогенов, осуществляемого макрофагами при фагоцитозе? Принципы иммунологической инженерии, направленные на модуляцию активности макрофагов и дендритных клеток.

19. Какие выделяют стадии фагоцитарного процесса и какие им соответствуют

иммунохимические феномены? Характеристика молекулярных механизмов процессинга и презентации антигенов.

20. Популяции и субпопуляции лимфоцитов. Какой тип рецепторов для антигена характерен для каждого из этих типов? Механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих рецепторные и корецепторные комплексы лимфоцитов.

21. Каковы различия в валентности антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов? Какое значение имеет генетически закрепленный механизм поддержания моноспецифичности паратопов молекулы антитела?

22. Характеристика системы комплемента? Генетика системы комплемента. Какие компоненты ответственны за связывание с молекулой иммуноглобулина, какие - за формирование мембран-атакующего комплекса, какие – за связывание с мембранными рецепторами иммунокомпетентных клеток?

23. Генетика факторов неспецифической резистентности гуморального и клеточного типов. Система интерферона и интерферо-индуцируемые белки. Гены и псевдогены дефензинов.

24. Механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих рецепторные и корецепторные комплексы фагоцитов.

25. Антигены МНС I и II классов: на каких клетках экспрессируются и с какой плотностью. Интерпретация терминов: антигены, и трансплантационные антигены.

26. Назовите главные корецепторные группы, необходимые для функционирования антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов. Механизмы контроля экспрессии этих корецепторных структур.

27. Естественная и искусственная иммунизация. Типы вакцинных препаратов.

28. Модуляция механизмов естественного иммунитета (неспецифической резистентности клеточного и гуморального типа). В чем состоят преимущества и недостатки механизмов неспецифической резистентности?

29. Белки острой фазы воспаления и цитокины: роль в естественном неспецифическом и специфическом иммунитете. Цитокиновые технологии иммунологической инженерии. Дайте определение понятия «цитокины» и приведите примеры их иммунорегуляторного и прямого эффекторного защитного действия.

30. На каких молекулярно-генетических механизмах основано разнообразие специфичности антител, рецепторов лимфоцитов и HLA-антигенов?

31. Гибридные технологии и получения моноклональных антител. Чем отличаются моноклональные антитела от поликлональных? Описать технологии получения мон АТ.

Применение моноклональных антител в диагностике и терапии инфекционных и онкологических заболеваний..

32. Методы получения рекомбинантных препаратов цитокинов и других иммуноактивных препаратов. Их использование в практике биотерапии различных заболеваний человека.

33. Принципы классификации вакцин. Технология получения рекомбинантных антигенов бактерий и вирусов. Преимущества и недостатки вакцинных препаратов на основе рекомбинантных антигенов.

34. Какие препараты используются для создания искусственного пассивного антимикробного, антитоксического и противовирусного иммунитета? Технологии получения ДНК-вакцин и их использование в медицине и ветеринарии.

35. Технологии получения различных типов препаратов антител для пассивной иммунотерапии. Какую опасность представляют некоторые из них и как предупредить возможные осложнения? Химерные, минимальные и другие современные типы препаратов антител.

36. Методы генотерапии в практике лечения тяжелых иммунологических дефектов у человека.

37. Каковы природа и функции антигенов главного комплекса гистосовместимости I, II и III классов?.

38. Дать характеристику белков теплового шока (HSP – heat shock proteins). Перспективы применения HSP-белков для построения лекарственных и вакцинных комбинаций противоопухолевой направленности.

39. Гены и псевдогены дефензинов у человека: перспективы разработки способов регуляции их экспрессии для борьбы с инфекционными заболеваниями.

40. Методы изучения полиморфизма генов цитокинов.

41. Методы изучения экспрессии генов цитокинов.

42. Строение молекул иммуноглобулинов. Какие классы иммуноглобулинов вам известны. Чем определяется различия классов иммуноглобулинов? Генетика изотипов молекул антител. 43. Генетические механизмы переключения синтеза иммуноглобулинов с одного класса на другой?

44. Популяции и субпопуляции лимфоцитов. Антиген-распознающие рецепторы Т- и В-лимфоцитов (TCR и BCR). Гены TCR и BCR и механизмы их экспрессии. Каковы различия в валентности антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов?

45. Характеристика системы комплемента? Компоненты системы комплемента, кодируемые генами HLA 3 класса. Какие компоненты ответственны за связывание с молекулой иммуноглобулина, какие - за формирование мембран-атакующего комплекса, какие – за связывание с мембранными рецепторами иммунокомпетентных клеток?

46. Факторы неспецифической резистентности гуморального и клеточного типов. Генетика системы интерферона. Продукты генов, индуцируемых интерферонами, и их роль в индукции противовирусного состояния, иммунорегуляции, регуляции пролиферативных и других биологических процессов.

47. Генетика синтеза тяжелых и легких цепей молекул иммуноглобулинов. Какова валентность каждого из классов иммуноглобулинов? CDR-области переменных доменов иммуноглобулинов и их роль в формировании паратопа антитела.

48. Опишите строение Т-клеточного антиген-распознающего рецептора (TCR). Генетические механизмы изменчивости специфичностей TCR.

49. На каких клетках экспрессируются антигены MHC I и II классов. Хромосомная локализация и генетическая структура комплекса генов HLA 1 и 2 классов.

50. Назовите главные корецепторные группы, необходимые для функционирования антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов. Их роль в процессах внутриклеточного сигналинга.

51. Основные пути активации системы комплемента. Генетическая детерминация активации системы комплемента.

52. Цитокины: эффекторные и регуляторные функции. Генетика системы цитокинов: механизмы контроля экспрессии генов цитокинов и их рецепторов. Янус-киназы и STAT-белки.

53. Система интерферонов. Назовите основные разновидности ИФН, их роль в противовирусном иммунитете, противоопухолевой защите, регуляции иммунных и других функций организма. Система Интерферона как мишень для применения ряда эффективных технологий иммунологической инженерии. Индукторы интерферона, рекомбинатные

препараты интерферонов.

54. Каковы особенности строения и функций иммуноглобулинов разных классов? Оценка количественного содержания и изотипового состава иммуноглобулинов сыворотки крови как высокоинформативный параметр иммунного статуса. Препараты иммуноглобулинов и современных технологиях иммунологической инженерии.

55. На каких молекулярно-генетических механизмах основано разнообразие специфичности антител и рецепторов лимфоцитов?

56. Чем отличаются моноклональные антитела от поликлональных? Гибридомы и описание принципиальной технологии получения препаратов моноклональных антител. Применение моноклональных антител в научных исследованиях, в иммунофенотипировании и диагностике инфекционных заболеваний.

57. Охарактеризуйте строение молекулы иммуноглобулина, роль ее доменов и активного центра. Технологии иммунологической инженерии, направленные на получение химерных препаратов иммуноглобулинов и отдельных компонентов молекул антител.

58. Дать определение воспаления. Роль воспаления в защите организма от патогенных агентов различной природы. Генетические механизмы, обуславливающие интенсивность и тип воспалительного процесса. Медиаторы воспаления (гистамин, серотонин, кинины, анафилатоксины, белки острой фазы воспаления) и их роль в контроле воспаления. Роль генов иммунологической реактивности. Роль молекул межклеточной адгезии в контроле воспаления.

59. Дать характеристику белков теплового шока (HSP – heat shock proteins). Перспективные технологии (в том числе, генно-инженерные) создания вакцинных препаратов (противоопухолевой и противоинойфекционной направленности) на основе комбинации индивидуальных антигенов с HSP-70 и другими препаратами белков теплового шока.

60. Генетический механизм переключения синтеза молекул мембрано-связанной формы иммуноглобулинов на секретлируемую форму. Длинный и короткий РНК-транскрипты и различия в сплайсинге продуктов генов иммуноглобулинов как фактор выбора мембрано-связанной или секретлируемой формы молекулы иммуноглобулинов.

61. Признаки типового патологического процесса. Полиэтиологичность, монопатогенетичность, комплексность, стандартность проявлений.
62. Бронхиальная астма. Иммунопатологические механизмы патогенеза бронхиальной астмы. Экспериментальные модели и экспериментальная фармакотерапия.
63. Контактный аллергический дерматит. Особенности воспалительного процесса. Экспериментальные модели и экспериментальная фармакотерапия.
64. Механизмы развития хронических воспалительных неспецифических заболеваний легких. Роль нейтрофильной эластазы и ее ингибиторов в генезе ХНЗЛ.
65. Механизмы малигнизации клеток доброкачественных опухолевых образований.
66. Дислипидемические процессы и синдром эндотелиальной дисфункции: их связь с развитием атеросклероза, ИБС, инфарктов миокардов и инсультов. Современные генноинженерные технологии терапии тяжелых форм дислипидемий.
67. Канцерогены. Классификация канцерогенных химических соединений. Особенности действия полициклических ароматических углеводородов на клеточные структуры.
68. Физические факторы мутагенеза и канцерогенеза.
69. Вирусный канцерогенез. Вирусы высокой канцерогенности. Онкогены: с- и v- онкогены. Онко (+) и онко (-) канцерогенные вирусы.
70. Нарушения механизмов репарации ДНК и канцерогенез. Эндогенные канцерогены.
71. Раково-специфические и раково-ассоциированные антигены. Дигностическая, прогностическая значимость.
72. Иммунологический надзор: противораковые аспекты.
- 73 *Helicobacter pylori*: оценка роли в этиопатогенезе рака желудка.
74. Особенности липидного и углеводного метаболизма при онкологических заболеваниях. Энергопластический обмен в организме опухоленосителей. Патогенез развития кахексии.

75. Современное состояние и перспективы методов биотерапии злокачественных опухолей. Рекомбинантные препараты цитокинов в биотерапии онкологических заболеваний.

76. Эндокринные нарушения как промоторный механизм развития опухолевого процесса.

77. Старение и рак. Возрастная метаболическая и иммунологическая супрессия как фактор патогенеза рака.

78. Гормоны и цитокины, факторы роста: роль в канцерогенезе. Применение гормональных и цитокиновых препаратов в комплексной терапии рака.

46. Ответ клетки на стрессовые и токсические повреждения: адаптация, альтерация, репарация или гибель.

79. Болезни иммунной системы: различные варианты иммунологической недостаточности, срыв толерантности, аллергическая и аутоиммунная патология.

80. Апоптоз: механизмы развития. Нарушения регуляции механизмов extrinsic и intrinsic апоптозных программ при различных типах патологии. Современные технологии, направленные на управление процессами индукции и регуляции апоптоза.