

Тема 13

Реакция связывания комплемента. Реакция радиального гемолиза. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный метод (РИМ). Иммуноблоттинг (ИБ). Молекулярно-генетические методы и их применение в медицине. Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Молекулярная гибридизация. Секвенирование.

План занятия:

1. Реакция связывания комплемента (РСК) и ее сущность.
2. Механизм РСК и ее значение в диагностике.
3. Сущность реакций с использованием меченых антител.
4. Значение реакций с использованием меченых антител в экспресс диагностике.
5. Механизм реакции иммунофлюоресценции (реакция Кунса): прямой (РИФ) и непрямой (РНИФ) варианты.
6. Иммуноферментный анализ и его значение: прямой и непрямой варианты.
7. Радиоиммунный метод (конкурентный, обратный и непрямой), применение.
8. Иммуноблоттинг, механизм.
9. Применение генетических методов в микробиологической диагностике.
10. Молекулярно-генетические методы, их виды и применение в диагностике.
11. Значение, механизм и практическое применение полимеразной цепной реакции (ПЦР, ПЦР в реальном времени)
12. Метод молекулярной гибридизации, его сущность, механизм и практическое значение.
13. Рестрикционный анализ, сущность, механизм и практическое значение.
14. Метод секвенирования, сущность, механизм и практическое значение.

Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента комплексом антиген–антитело.

Реакция связывания комплемента (РСК) ставится с сывороткой крови больного или диагностической иммунной сывороткой, которые предварительно прогревают при температуре 56°C для инактивации собственного комплемента. РСК проводят в две фазы: 1-я фаза — инкубация смеси, содержащей три компонента (антиген + антитело + комплемент); 2-я фаза (индикаторная) — выявление в смеси свободного комплемента путем добавления к ней гемолитической системы, состоящей из эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, содержащей антитела к ним. В 1-й фазе реакции при образовании комплекса антиген–антитело происходит связывание им комплемента, и тогда во 2-й фазе гемолиз sensibilized антителами эритроцитов не произойдет; реакция положительная. Если антиген и антитело не соответствуют друг другу (в исследуемом образце нет антигена или антитела), комплемент остается свободным и во 2-й фазе присоединится к комплексу эритроцит–антиэритроцитарное антитело, вызывая гемолиз из-за образования мембраноатакующего комплекса комплемента; реакция отрицательная. РСК ранее применялась для диагностики сифилиса (реакция Вассермана).

Реакцию радиального гемолиза (РРГ) ставят в лунках геля из агар, содержащего эритроциты барана и комплемент. После внесения в лунки геля гемолитической сыворотки (антител против эритроцитов барана) вокруг них (в результате радиальной диффузии антител) образуется зона гемолиза. Таким образом можно определить активность комплемента и гемолитической сыворотки, а также антитела в сыворотке крови у больных краснухой, клещевым энцефалитом и др. Для этого на эритроцитах адсорбируют соответствующие антигены вируса, а в лунки геля, содержащего данные эритроциты, добавляют сыворотку крови больного. Противовирусные антитела взаимодействуют с вирусными антигенами, адсорбированными на эритроцитах, после чего к этому комплексу присоединяются компоненты комплемента, вызывая гемолиз.

Реакции с использованием меченых антител или антигенов

Реакция иммунофлюоресценции — РИФ (метод Кунса)

Различают три основные разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом. Реакция Кунса служит методом экспресс-диагностики для выявления антигенов микробов или определения антител.

Прямой метод РИФ основан на том, что препараты тканей или мазки микробов, обработанные иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии, присоединившие меченые антитела люминесцирующей сыворотки, светятся в виде каймы зеленого цвета.

Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген–антитело с помощью антиглобулиновой (противантительной) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс (микроб + антимикробные кроличьи антитела+антикроличьи антитела, меченные флюорохромом), обнаруживаемый с помощью люминесцентного микроскопа, как и при прямом методе.

Иммуноферментный метод, или анализ (ИФА) — выявление антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой (антитела, меченные пероксидазой хрена, β -галактозидазой или щелочной фосфатазой). После соединения антигена с меченной ферментом иммунной сывороткой в смесь добавляют субстрат/хромоген. Субстрат расщепляется ферментом, и изменяется цвет продукта реакции — интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител. Реакцию прерывают путем добавления кислоты для денатурации фермента.

Твердофазный ИФА — наиболее распространенный вариант иммунологического теста, когда один из компонентов иммунной реакции (антиген или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшеток из полистирола. При определении антител в лунки планшеток с сорбированным антигеном последовательно добавляют сыворотку крови больного, антиглобулиновую (противочеловеческую) сыворотку, меченную ферментом, и субстрат (хромоген)

для фермента. Каждый раз после добавления очередного компонента из лунок удаляют несвязавшиеся реагенты путем тщательного промывания. При положительном результате изменяется цвет раствора хромогена.

Твердофазный носитель можно сенсibilизировать не только антигеном, но и антителами. Тогда в лунки с сорбированными антителами вносят искомый антиген, добавляют иммунную сыворотку против антигена, меченную ферментом, а затем субстрата для фермента.

Конкурентный вариант ИФА: искомый антиген и меченный ферментом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки. Другой тест — искомые антитела и меченые антитела конкурируют друг с другом за антигены.

ИФА применяют для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных болезней, в частности для диагностики ВИЧ-инфекций, гепатита В и др., а также определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях — 10^{-10} – 10^{-12} г/л.

Радиоиммунный метод, или анализ

Высококчувствительный метод, основанный на реакции антиген–антитело с применением антигенов или антител, меченных радионуклидом (^{125}I , ^{14}C , ^3H и др.). После их взаимодействия отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют его радиоактивность в соответствующем счетчике (β - или γ -излучение): интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител.

При твердофазном варианте радиоиммунного анализа (РИА) один из компонентов реакции (антиген или антитело) сорбирован на твердом носителе, например в лунках микропанелей из полистирола. Другой вариант метода — конкурентный РИА: искомый антиген и меченный радионуклидом антиген конкурируют друг с другом за связывание ограниченного количества антител иммунной сыворотки. Этот вариант используют для определения количества антигена в исследуемом материале.

РИА применяют для выявления антигенов микробов, определения гормонов, ферментов, лекарственных веществ и иммуноглобулинов, а также иных веществ, содержащихся в исследуемом материале в минорных концентрациях — 10^{-12} – 10^{-15} г/л. Метод представляет определенную экологическую опасность.

Иммуноблоттинг (ИБ, вестернблоттинг) — высококчувствительный метод, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Антигены разделяют по молекулярной массе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем осуществляют блоттинг (от англ. blot — пятно), т.е. перенос антигенов из геля на нитроцеллюлозную мембрану, и проявляют невидимые «блоты» антигенов с помощью антител, меченных ферментами (ИФА). Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят сыворотку больного. Затем после инкубации отмывают от несвязавшихся антител больного и наносят сыворотку против иммуноглобулинов человека, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело больного + антитело против Ig человека) выявляют добавлением субстрата/хромогена, изменяющего окраску под

действием фермента. Метод используют при диагностике, например ВИЧ-инфекции и др.

Молекулярно-генетические методы и их применение в медицине

Метод молекулярной гибридизации позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения.

Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90°C) в щелочной среде денатурировать, т.е. расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10°C вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда. Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий радиоактивный зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. В случае наличия комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль.

Молекулярная гибридизация составляет основу микрочипа, который представляет собой стеклянную пластинку с присоединенными в определенных локусах молекулярными ДНК-зондами (от 100 до 1000), специфичными для некоторой таксономической единицы. Из исследуемого образца выделяют общую ДНК, амплифицируют по стабильной последовательности 16S РНК-гена. Выделенную ДНК метят флуорохромом или ферментом и обрабатывают ею микрочип, создавая условия для гибридизации. После отмывают несвязавшуюся ДНК и определяют локализацию молекулярных гибридов постановкой ИФА или денситометрией.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистой культуре.

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняется следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают, и она распадается на две нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена будет увеличиваться каждый раз вдвое. Проводят реакцию в специальных приборах — амплификаторах. ПЦР применяется для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.

ПЦР в реальном времени — это ускоренный метод, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводятся одновременно. Методика основана на том, что в амплификационную пробирку вводят молекулярный зонд, который в случае связывания с амплифицированной цепью генерирует флюоресцентный сигнал определенной длины волны. Реакция проводится в автоматическом режиме. ПЦР в реальном времени проводит полный анализ пробы в течение 20–60 мин. Метод позволяет обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе. Используется для определения вирусной нагрузки, проведения молекулярного типирования.

Иммунопатология. Иммунодефициты. Реакции гиперчувствительности. Аутоиммунные заболевания. Кожно-аллергические реакции и их применение в микробиологической диагностике. Принципы иммунопрофилактики и иммунотерапии. Вакцины и иммунные сыворотки

К патологии иммунной системы относят иммунодефициты, аллергические болезни, различные типы гиперчувствительности, аутоиммунные болезни и болезни с синдромом иммунного воспаления.

Первичные и вторичные иммунодефициты

Иммунодефицит — состояние организма, при котором происходит нарушение иммунологических реакций вследствие дефекта одного из звеньев иммунитета. Различают первичные и вторичные иммунодефициты. Первые обусловлены нарушениями на генетическом уровне (мутация в генах, белковые продукты которых участвуют в реакциях иммунного ответа). Приобретенные (вторичные) иммунодефициты — это патология, для которой характерны нарушения иммунной системы, развивающиеся в постнатальном периоде (без генетических дефектов). Причиной такого иммунодефицитного состояния могут стать различные факторы, к примеру: инфекционный возбудитель (чаще вирусной природы — ВИЧ, вирусы герпеса и др.), иммуносупрессорная терапия, воздействие физических (радиация) или химических (яды) факторов и др.

Следствием первичных иммунодефицитов является развитие тяжелых рецидивирующих форм инфекций, которые не поддаются консервативному лечению (пневмонии, менингиты, отиты, сепсис и др.). Также на фоне первичных иммунодефицитов могут развиваться опухоли, аллерго- и аутопатология.

Приобретенные, или вторичные, иммунодефициты — это состояние организма, при котором происходит функциональное нарушение механизмов иммунитета (без генетических дефектов). Вторичные иммунодефициты могут быть излечены (в случае избавления от повреждающего фактора) или скорректированы иммуностимулирующими препаратами.

Можно выделить три формы вторичных иммунодефицитов: спонтанную (отсутствие явной причины), индуцибельную (обязательно есть причина — химическое, физическое или биологическое воздействие) и приобретенную.

Аллергия (от греч. *allos* — другой) — специфическая повышенная неадекватная реакция иммунной системы на повторное проникновение антигена/аллергена в организм. В аллергических реакциях на антиген/аллерген выделяют иммунную фазу (взаимодействие иммунных клеток с антигеном), патохимическую фазу (продукция медиаторов аллергии, эффекторных клеток и цитокинов) и патофизиологическую фазу клинических проявлений (кожные высыпания, отек, зуд, удушье и др.).

Повышенная чувствительность (гиперчувствительность) к антигенам/аллергенам рассматривается как результат гипертрофированной реакции иммунной системы с поражением органов и тканей.

Гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) обусловлена антителами (IgE, IgG, IgM) против аллергенов. Она развивается через несколько минут или часов после воздействия аллергена: расширяются сосуды, повышается их проницаемость, развиваются зуд, бронхоспазм, сыпь, отеки. Поздняя фаза ГНТ дополняется действием продуктов эозинофилов и нейтрофилов.

К ГНТ относятся I тип — анафилактический, обусловленный главным образом действием IgE, реже IgG4; II тип — цитотоксический, вызванный участием IgG, IgM в цитолитических реакциях; III тип — иммунореактивный, развивающийся при образовании иммунного комплекса IgG, IgM с антигенами.

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) относится к IV типу гиперчувствительности. Она обусловлена взаимодействием антигена (аллергена) с макрофагами и ТН1-лимфоцитами, стимулирующими клеточный иммунитет. Развивается главным образом через 1–3 сут после воздействия аллергена: происходит уплотнение и воспаление ткани в результате ее инфильтрации Т-лимфоцитами и макрофагами.

При I типе гиперчувствительности — анафилактическом — первичное поступление аллергена вызывает продукцию плазматическими клетками IgE, IgG4.

Аллергены, поступившие в организм, встречаются с АПК, которые мигрируют в лимфатические узлы, и представляют переработанные антиген-пептиды на свою поверхность вместе с МНС II для последующего взаимодействия с наивными Т-хелперами (ТН0), которые дифференцируются в ТН2. После взаимодействия В-лимфоцитов с ТН2 происходит процесс антителообразования плазматическими клетками. Синтезированные IgE прикрепляются Fc-фрагментом к Fc-рецепторам базофилов крови и тучных клеток слизистых оболочек или соединительной ткани. При повторном поступлении аллергена на тучных клетках и базофилах образуются комплексы IgE с аллергеном, вызывающие проникновение ионов кальция внутрь клеток и их дегрануляцию. Из гранул базофилов и тучных клеток в ткань выбрасываются БАМ: вазоактивные амины (гистамин), протеоглики

(гепарин), липидные медиаторы (лейкотриены, простагландины и PAF), ферменты (триптаза, химаза, катепсин G) и цитокины. Гистамин, лейкотриен D и простагландины способствуют активному сокращению гладких мышц. Метаболиты клеток вызывают сокращение гладких мышц, ослабление сердечной деятельности, развитие коллапса, повышение сосудистой проницаемости, гиперсекрецию слизи, отек, зуд и т.д. Гиперчувствительность I типа — пример типичной воспалительной реакции, вызванной определенным антигеном/аллергеном.

К проявлениям гиперчувствительности I типа относят следующие. Аллергическая крапивница — увеличивается проницаемость сосудов, кожа краснеет, появляются пузыри, зуд. Ангиоздема — отек подкожных и субмукозных тканей; часто сочетается с крапивницей. Аллергический ринит или риноконъюнктивит — развивается отек, раздражается слизистая. Поллиноз (сенная лихорадка) — аллергия к пыльце растений, для которой характерны вазомоторные проявления слизистых оболочек (ринит, конъюнктивит) и бронхоспазм. Бронхиальная астма (атопическая форма — IgE-зависимая) — развиваются воспаление, бронхоспазм, усиливается секреция слизи в бронхах. Пищевая аллергия — повышенная чувствительность человека к определенным продуктам питания; развиваются тошнота, диарея, сыпь, зуд, анафилаксия. Лекарственная аллергия — иммунопатологическая реакция организма на лекарственные средства и продукты их превращения в организме. Инсектная аллергия — повышенная чувствительность человека на укусы насекомых, а также на аэрогенное или контактное воздействие компонентов насекомых.

II тип гиперчувствительности — цитотоксический (цитолитический). Эндогенные антигены или экзогенные химические вещества, лекарственные препараты (гаптены), прикрепленные к мембранам клеток, могут вызвать образование антител против них и привести ко II типу гиперчувствительности. Антигены, расположенные на клетках, «узнаются» антителами классов IgG, IgM. При взаимодействии типа клетка–антиген–антитело происходит активация комплемента и разрушение клетки по трем направлениям: комплементзависимый цитолиз, фагоцитоз и антителозависимая клеточная цитотоксичность. Время реакции — минуты или часы.

III тип гиперчувствительности — иммунокомплексный, основанный на образовании растворимых иммунных комплексов (антиген–антитело и комплемент) с участием IgG, реже — IgM.

Первичными компонентами III типа гиперчувствительности являются растворимые иммунные комплексы антиген–антитело и комплемент. При избытке антигенов или недостатке комплемента иммунные комплексы откладываются на стенке сосудов, базальных мембранах, т.е. структурах, имеющих Fc-рецепторы. Повреждения обусловлены тромбоцитами, нейтрофилами, иммунными комплексами, комплементом. Привлекаются провоспалительные цитокины, включая ФНО и хемокины. В поздних стадиях в процесс вовлекаются макрофаги.

IV тип — гиперчувствительность замедленного типа, обусловленная макрофагами и TH1-лимфоцитами, которые отвечают за стимуляцию клеточного иммунитета.

Гиперчувствительность замедленного типа развивается главным образом через 1–3 сут после повторного воздействия аллергена: происходит уплотнение и воспаление ткани в результате ее инфильтрации Т-лимфоцитами и макрофагами. В фазу сенсибилизации поступивший антиген или гаптен, связавшийся с белками организма, процессируется и презентруется дендритной клеткой Т-хелперу (ТН0), который формирует клон воспалительных ТН1. При повторном поступлении антигена (эффektorная фаза) происходит повторная его презентация ТН1, который, активируясь, продуцирует хемокины и IFN- γ , соответственно привлекающие и активирующие макрофаги. Активированные макрофаги секретируют цитокины, в том числе ФНО- α — ключевой фактор в формировании гранулем. Феномен вызывается CD4+ Т-лимфоцитами (субпопуляция ТН1) и CD8+ Т-лимфоцитами, которые секретируют цитокины (IFN- γ), активирующие макрофаги, и индуцируют воспаление (ФНО- α). При некоторых нарушениях CD8+ ЦТЛ непосредственно убивают клетку-мишень, несущую комплексы МНС I + антиген (аллерген).

Лекарства, косметические препараты, низкомолекулярные вещества (гаптены) могут соединяться с белками тканей, образуя комплексный антиген с развитием контактной ГЗТ. Инфекционные болезни (бруцеллез, туляремия, туберкулез, лепра, токсоплазмоз, многие микозы и др.) сопровождаются развитием ГЗТ, поэтому при диагностике используют кожно-аллергические пробы с аллергенами возбудителей: туберкулинами, лепромином, бруцеллином, тулярином, токсоплазмином.

Кожные пробы — одно из основных исследований в диагностике аллергии. С помощью данного тестирования выявляют сенсибилизацию различными аллергенами. Панели аллергенов для проведения проб содержат аллергены — пищевые, бытовые, аллергены пыльцы, инсектные и др. За один тест можно проверять сенсибилизацию на 10–20 аллергенов. Для проведения теста используют кожу предплечья или спины. Скарификацию проводят поверхностно, частично нарушая целостность эпидермиса. Через некоторое время проводят оценку результатов: нет никаких реакций — результат отрицательный; небольшая гиперемия — результат сомнительный; если появляется волдырь — результат положительный (чем больше волдырь, тем больше степень реакции).

Другой вариант — провокационные пробы: изучение реакций, которые возникают при контакте аллергена с шоковым органом (введение аллергена интраназально, перорально и другими путями).

Для диагностики контактных дерматитов и других аллергических патологий используют аппликационные пробы (аллергены нанесены на пластины, которые в течение пары суток контактируют с кожей). Результаты (эритема, папулы и др.) оцениваются через некоторое время после удаления пластин.

Большое значение в аллергодиагностике имеет определение IgE. В норме данный иммуноглобулин практически не определяется, при аллергопатологии уровень IgE может возрасти в разы. В некоторых случаях происходит спонтанный рост уровня IgE: ВИЧ-инфекция, лимфомы, паразитозы, микозы и др.

Лабораторная диагностика I типа гиперчувствительности основывается на определении в сыворотке крови больного:

общего IgE, а также IgE- и IgG-антител к предполагаемым аллергенам; уровня гистамина, триптазы, интерлейкинов (IL-5, IL-4). У больных поллинозом при обострении в мазках из носа возрастает количество эозинофилов. Возможна эозинофилия в крови. Ставят провокационные назальные, ингаляционные и кожные тесты с атопическими аллергенами: пыльцевыми, бытовыми, пищевыми, эпидермальными и др.

Лабораторная диагностика II типа гиперчувствительности включает определение циркулирующих противотканевых антител, а также определение с помощью РИФ наличия антител и комплемента в поврежденных участках (биопсия).

Лабораторная диагностика III типа гиперчувствительности основана на исследовании биоптатов тканей для выявления отложений иммуноглобулинов и комплемента с помощью РИФ. В иммунных комплексах, осаждаемых полиэтиленгликолем из крови, определяют IgG.

Лабораторная диагностика ГЗТ включает постановку кожных тестов. Применяют внутрикожные тесты с аллергенами микробов (с туберкулином, бруцеллином, токсоплазмином и др.). Реакция оценивается через 24–48 ч. Возможно гистологическое изучение кожи.

Аутоиммунные болезни

В организме иммунные механизмы активируются в ответ на генетически чужеродные антигены, в крайнем случае — на изменившиеся собственные (опухолевые). При сбое нормального течения иммунологических реакций вследствие инфекционных или другого рода факторов происходит образование аутореактивных клонов и развиваются аутоиммунные реакции, обусловленные появлением антител (аутоантител) или цитотоксических Т-лимфоцитов к собственным антигенам. Разнообразие клинических проявлений аутоиммунных заболеваний объясняется различиями в локализации, выраженности и механизмах повреждения собственных тканей и органов.

Аутоиммунные болезни можно разделить на органоспецифические и системные. Возможно развитие нескольких форм аутоиммунных заболеваний у одного человека.

Аутоиммунные болезни — это мультифакторные нарушения, в развитии которых принимают участие многие факторы — экзогенные (частые инсоляции, УФ-излучение или переохлаждение, инфекции, вакцинные и лекарственные препараты) и эндогенные (генетические, гормональные и др.). Для многих аутоиммунных болезней выявлена ассоциация с маркерами в генах HLA, генах иммуноглобулинов и др. Потенциально возможна роль инфекционных агентов в развитии заболевания. Некоторые белки вирусов, бактерий обладают гомологией с белками человека, таким образом, антитела к белкам патогенов могут запускать аутоиммунную реакцию.

Еще один вариант пусковых механизмов аутоиммунных заболеваний — нарушение естественных барьеров, вследствие чего компоненты иммунной системы в полной мере могут проникать в «забарьерные» органы, т.е. органы, которые в силу анатомических особенностей (наличие тканеспецифичных антигенов, незнакомых для иммунной системы) не контактируют с факторами иммуно- тета. К ним относятся головной мозг, хрусталик, сетчатка, щитовидная железа, семенные канальцы яичек и др. Пример аутоиммунных заболеваний,

связанных с нарушением целостности барьера, — аутоиммунный тиреоидит. Аутоиммунные механизмы участвуют в диффузных поражениях нервной системы (острые диссеминированные энцефаломиелиты). Данная патология может развиваться вследствие гнойных синуситов у детей, а также на фоне гипоксии мозга и родовой травмы. Нарушение регуляции продукции цитокинов, приводящее к активации экспрессии, может способствовать развитию воспалительных реакций в тканях и повреждению органов. Считается, что провоспалительные и противовоспалительные цитокины могут принимать участие в развитии аутоиммунной патологии (в том числе системной красной волчанки).

Перечисленные выше механизмы так или иначе приводят к активации главного звена в патогенезе аутоиммунных заболеваний, а именно, к нарушению толерантности к собственным антигенам, а также к увеличению продукции аутоантител и аутореактивных Т-лимфоцитов, ведущих к развитию иммунопатологии.

Системная красная волчанка — аутоиммунное заболевание с системным поражением соединительной ткани, связанное с образованием аутоантител и иммунных комплексов, протекающее с прогрессирующим иммуновоспалительным процессом (дерматит, сыпь, серозит, поражение почек, легких, суставов, сердца и ЦНС). На лице часто появляется красноватая сыпь, напоминающая крылья бабочки.

Ревматоидный артрит — хроническое прогрессирующее аутоиммунное заболевание, сопровождающееся развитием симметричного воспаления синовиальных оболочек с поражением периферических суставов (синовит, эрозивный артрит) и системным воспалением внутренних органов. Ревматоидный фактор (IgM, IgG, IgA) и другие аутоантитела участвуют в повреждении суставных тканей и формировании иммунных комплексов. IL-33, выделяемый синовиальными эндотелиальными клетками и фибробластами, способствует усилению раннего ответа

Синдром Шегрена — хроническое заболевание, обусловленное взаимодействием антигенов экзокринных желез (слезных, слюнных и др.) с аутоантителами; сопровождается гипофункцией желез и иммуновоспалительными процессами. Разрушаются слюнные и слезные железы; развиваются сухой кератоконъюнктивит, прогрессирующая сухость слизистых оболочек носа, рта и гениталий.

Васкулиты обусловлены развитием воспалительной инфильтрации и некроза стенок кровеносных сосудов. Клинические признаки связаны со степенью поражения сосудов и их расположением в органах и системах организма. Васкулиты классифицируют по морфологическим критериям — по калибру пораженных сосудов, по образованию гранул в участках поражения, клиническим проявлениям и по механизму развития. Различают васкулиты с поражением мелких сосудов (гранулематоз Вегенера, синдром Черджа–Стросса), васкулиты с поражением средних сосудов (узелковый полиартериит, болезнь Кавасаки), васкулиты с поражением крупных сосудов (гигантоклеточный височный артериит, артериит Такаясу).

Иммунопрофилактика и иммунотерапия являются разделами иммунологии, которые изучают и разрабатывают способы и методы специфической

профилактики, лечения и диагностики инфекционных и неинфекционных болезней с помощью иммунобиологических препаратов, влияющих на функцию иммунной системы или действие которых основано на иммунологических принципах.

Иммунопрофилактика направлена на создание активного или пассивного иммунитета к возбудителю инфекционной болезни или его антигенам в целях предупреждения возможного заболевания путем формирования невосприимчивости к ним организма. Иммунотерапия направлена на лечение уже развившейся болезни, в основе которой лежит нарушение функции иммунной системы или же иммунной системе принадлежит ведущая роль в восстановлении здоровья.

При этом иммунопрофилактика, а иногда и иммунотерапия являются единственными или же ведущими способами среди других медицинских воздействий для предупреждения или лечения болезней. Например, профилактику полиомиелита, кори и других массовых инфекционных болезней невозможно себе представить без вакцинации. Только благодаря вакцинации на земном шаре ликвидирована натуральная оспа, полиомиелит на большинстве континентов, резко снижена заболеваемость корью, эпидемическим паротитом, краснухой.

Действующим началом в иммунобиологических препаратах являются антигены, антитела, микробные клетки и их дериваты, цитокины, иммунокомпетентные клетки и другие иммунореагенты.

В настоящее время выделяют пять групп иммунобиологических препаратов:

Первая группа — препараты, получаемые из живых или убитых микробов (бактерий, вирусов, грибов) или микробных продуктов и используемые для специфической профилактики или терапии (живые и инаktivированные корпускулярные вакцины, субклеточные вакцины из микробных продуктов, анатоксины, бактериофаги и пробиотики)

Вторая группа — иммунобиологические препараты на основе специфических антител. К ним относятся иммуноглобулины, иммунные сыворотки, иммунотоксины, антитела-ферменты (абзимы), рецепторные антитела, мини-антитела.

Третья группа — иммуномодуляторы для иммунокоррекции, лечения и профилактики инфекционных и неинфекционных болезней, иммунодефицитов.

Четвертая группа — адаптогены — сложные химические вещества растительного, животного или иного происхождения, обладающие широким спектром биологической активности.

Пятая группа — препараты для специфической диагностики инфекционных и неинфекционных болезней, с помощью которых можно обнаруживать антигены, антитела, ферменты, продукты метаболизма, биологически активные пептиды, чужеродные клетки и т.д.

Вакцины используют в основном для активной специфической профилактики, а иногда и для лечения инфекционных болезней. Действующим началом в вакцинах является специфический антиген.

Вакцина представляет собой сложный иммунобиологический препарат, в состав которого наряду со специфическим антигеном, исходя из природы и

лекарственной формы препарата, включают стабилизаторы, консерванты, адъюванты.

Живые вакцины представляют собой препараты, в которых действующим началом являются ослабленные тем или иным способом, потерявшие вирулентность, но сохранившие специфическую антигенность штаммы патогенных микробов, получившие название аттенуированных штаммов. Аттенуация (ослабление) возможна путем длительного воздействия на штамм химических (му- тагены) или физических (температура, радиация) факторов или же длительных пассажей через организм невосприимчивых животных или другие биообъекты (эмбрионы птиц, культуры клеток).

В качестве живых вакцин можно также использовать дивергентные штаммы, т.е. непатогенные для человека микробы, имеющие общие протективные антигены с патогенными для человека возбудителями инфекционных болезней. Классическим примером дивергентных живых вакцин является вакцина против натуральной оспы человека, в которой используется непатогенный для человека вирус оспы коров. К дивергентным вакцинам следует также отнести БЦЖ — вакцину, в которой используются родственные в антигенном отношении микобактерии бычьего типа.

Инактивированные (убитые) вакцины в качестве действующего начала включают убитые химическим или физическим методом культуры патогенных бактерий или вирусов (цельноклеточные, цельновирсионные вакцины) или же извлеченные из патогенных микробов (иногда вакцинных штаммов) комплексы, содержащие в своем составе протективные антигены (субклеточные, субвирсионные вакцины). Для инактивации бактерий и вирусов применяют формальдегид, спирт, фенол, температурное воздействие, УФ-облучение, ионизирующую радиацию.

В вакцинный препарат обязательно добавляют консервант, иногда — адъюванты. Дозируют вакцину в антигенных единицах; применяют, как правило, подкожно, внутримышечно в виде нескольких инъекций на курс вакцинации. В практике применяют убитые вакцины против гриппа, полиомиелита, коклюша, бешенства и др.

Молекулярные вакцины. В молекулярных вакцинах антиген находится в молекулярной форме или же в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т.е. в виде эпитопов. Протективный антиген в виде молекул можно получить биологическим синтезом в процессе культивирования природных патогенных микробов или вирусов. Таким образом можно получить антигены ВИЧ, вирусных гепатитов, малярии, кори, полиомиелита, гриппа, туляремии, бруцеллеза, сифилиса и других возбудителей болезней. В медицинской практике уже используется молекулярная вакцина против гепатита В, полученная из антигена вируса, продуцируемого рекомбинантным штаммом дрожжей.

Анатоксины (токсоиды) являются примером молекулярных вакцин: дифтерийный, столбнячный, ботулинический, гангренозный (перфрингенс, нови и др.), стафилококковый, холерный анатоксины.

Принцип получения анатоксинов состоит в том, что образующийся при культивировании соответствующих бактерий токсин превращают в нетоксичную, но сохраняющую специфическую антигенность форму — анатоксин путем

воздействия 0,4% формальдегида и тепла в течение 3–4 нед. К очищенному и концентрированному анатоксину для повышения его иммуногенности добавляют адъюванты, обычно сорбенты — гели $Al(OH)_3$ и $Al(PO_4)$. Полученные препараты назвали очищенными сорбированными (адсорбированными) анатоксинами. Дозируют анатоксины в антигенных единицах: единицах связывания (ЕС) анатоксина специфическим антитоксином или в единицах флоресценции (Lf). Благодаря иммунизации дифтерийным и столбнячными анатоксинами резко снижена заболеваемость и ликвидированы эпидемии дифтерии и столбняка.

Синтетические вакцины. Ведутся поиски повышения иммуногенности молекулярных антигенов путем искусственного укрупнения их молекул за счет химической или физико-химической связи (сшивки) антигена или его детерминанты с полимерными крупномолекулярными безвредными для организма носителями, который бы играл роль «шлеппера» и адъюванта. Таким образом, искусственно создается комплекс, состоящий из антигена или его детерминанты + полимерный носитель + адъювант. Вакцины, созданные по такому принципу, получили название синтетических. Проблема создания синтетических вакцин довольно сложная, но она активно разрабатывается, так создана вакцина против гриппа с использованием полимера полиоксидония, а также ряд других экспериментальных вакцин.

Ассоциированные вакцины. С целью проведения массовой вакцинопрофилактики разработаны и совершенствуются ассоциированные вакцины, т.е. препараты, включающие несколько разнородных антигенов и позволяющие проводить иммунизацию против нескольких инфекций одновременно. В состав ассоциированных препаратов могут входить как инаktivированные, так и живые вакцины. Примером может служить живая полиомиелитная поливакцина, в которую входят аттенуированные штаммы вируса полиомиелита I, II, III типа, или полианатоксин, куда входят анатоксины против столбняка, газовой гангрены и ботулизма. Если ассоциированный препарат состоит из разнородных антигенов, то его целесообразно называть комбинированной вакциной. Комбинированной является, например, АКДС-вакцина, состоящая из инаktivированной корпускулярной коклюшной вакцины, дифтерийного и столбнячного анатоксинов, или вакцина против кори, эпидемического паротита и краснухи.

К иммунологическим препаратам на основе антител относятся иммунные сыворотки, иммуноглобулины (цельномолекулярные и доменные), моноклональные антитела, иммунотоксины, иммуноадгезины, абзимы (антитела-ферменты). К настоящему времени существуют не только антитоксические сыворотки для лечения и профилактики дифтерии, столбняка, газовой гангрены, ботулизма, но и противобактериальные (противотифозная, противочумная и др.), а также противовирусные сыворотки (против бешенства, клещевого энцефалита и др.). Иммунные сыворотки получают путем гипериммунизации, т.е. многократной интенсивной иммунизации животных (лошадей, ослов, иногда кроликов) специфическим антигеном с последующим, в период максимального антителообразования, кровопусканием и выделением из крови иммунной сыворотки.

Иммунные сыворотки, полученные от животных, называют гетерогенными, так как они содержат чужеродные для человека сывороточные белки.

Для получения гомологичных иммунных сывороток используют сыворотки переболевших людей или специально иммунизированных людей-доноров либо сыворотки из плацентарной, а также абортной крови, содержащие антитела к ряду возбудителей инфекционных болезней. Гомологичные сыворотки дают гораздо меньше побочных реакций в ответ на их введение, чем гетерогенные.

С лечебной целью сывороточные препараты вводят как можно раньше внутримышечно (иногда внутривенно) в больших дозах. Профилактические дозы сывороточных препаратов значительно меньше лечебных, а препараты вводят внутримышечно обычно лицам, имевшим контакт с больным или иным источником инфекции, для создания пассивного иммунитета. При введении сывороточных препаратов иммунитет наступает через несколько часов, сохраняясь 2–3 нед. после введения гетерологичных и в течение 4–5 нед. — гомологичных сывороточных препаратов. После введения сывороточных препаратов возможны осложнения в виде анафилактического шока и сывороточной болезни. Поэтому перед введением препаратов ставят аллергическую пробу на чувствительность к ним пациента, а вводят их по методу Безредки дробно, небольшими порциями.