КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

РУКОВОДСТВО ДЛЯ ВРАЧЕЙ

Под редакцией
акад. РАМН Е. И. СОКОЛОВА

Москва
"Медицина"
1998

Содержание

ПРЕДИСЛОВИЕ 2
ЧАСТЬ I. ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ИММУНОЛОГИИ 3
ГЛАВА 1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ИММУННОЙ СИСТЕМЕ 3
1.1.НЕКОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ 3
1.2. ЭЛЕМЕНТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 4
ГЛАВА 2 ФОРМИРОВАНИЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА 5
2.1. РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА 5
2.1.1. Основные постулаты 5
2.1.2. Молекулярный аппарат антигенного распознавания 6
2.1.3. Основные этапы процесса антигенного распознавания 8
2.2. ФОРМИРОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНОГО ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА 9
2.2.1. Антигензависимая дифференцировка клона В-лимфоцитов 9
2.2.2. Образование цитотоксических Т-лимфоцитов 10
2.3. ЭФФЕКТОРНОЕ ЗВЕНО ИММУННОГО ОТВЕТА 11
2.3.1. Защита от инфекции с помощью антител 11
2.3.2. РОЛЬ ОСТРОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В защите организма от инфекции 11
2.3.3. Взаимодействие цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью 13
ГЛАВА 3 МОРФОЛОГИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА 14
3.1. ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ 14
3.2. КЛЕТКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА 16
ГЛАВА 4 РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА 19
4.1. МЕХАНИЗМЫ ОГРАНИЧЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА 19
4.2. МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЗА СЧЕТ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ 20
4.3. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ИММУНОНЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ СЕТИ 24
ГЛАВА 5 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУННОГО ОТВЕТА 25
5.1. ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ 25
5.2. ПОЛИМОРФИЗМ АНТИГЕНОВ МНС 26
5.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА РАЗНООБРАЗИЯ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ И АНТИТЕЛ 27
5.4. ЭВОЛЮЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ЭВОЛЮЦИИ МОЛЕКУЛ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ 29
ЧАСТЬ II. КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ 30
ГЛАВА 7 ОСНОВЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ 31
7.1. СБОР ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ 31

7.2. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ПРОВОДИМЫЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО У БОЛЬНОГО (ТЕСТЫ IN VIVO) 33
7.3. ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ 33
7.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ 34
7.4.1. Методы, основанные на изучении поверхностных маркеров 35
7.4.2. Исследование функционального состояния лимфоцитов 36
7.4.3. Оценка гиперчувствительности замедленного типа 38
7.5. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАГОЦИТОВ 38
7.6. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И АНТИГЕНОВ 39
7.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТА 41
ГЛАВА 14 ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ ТЕРАПИ 43
14.1. ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ ПРЕПАРАТЫ 43

СОКРАЩЕНИЯ, ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В ТЕКСТЕ

АКТГ — адренокортикотропный гормон
АЛС — антилимфоцитарные сыворотки
АНФ — антинуклеарные факторы
АСЛО — антистрептолизин О
АФК — активные формы кислорода
БАВ — биологически активное вещество
ГКС — глюкокортикостероиды
ГЗТ — гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ — гиперчувствительность немедленного типа
ДТЗ — диффузный токсический зоб
ИФА — иммуноферментный анализ
ИФН — интерферон
Кон А — конканавалин А
ЛАК — лимфокинактивированные киллеры
МАК — мембраноатакующий комплекс
НПВП — нестероидные противовоспалительные препараты
ОБМ — основной белок миелина
ОПГ — острый постинфекционный гломерулонефрит
ПБЦ — первичный билиарный цирроз
ПСС — прогрессирующий системный склероз
ПЯЛ — палочкоядерный лейкоцит
РА — ревматоидный артрит
РБТЛ — реакция бласттрансформации лимфоцитов
РСК — реакция связывания комплемента
РТМЛ — реакция торможения миграции лейкоцитов
РФ — ревматоидный фактор
УП — узелковый периартериит
СКВ — системная красная волчанка
ТТГ — тиротропный гормон
ФГА — фитогемагглютинин
ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
ХПН — хроническая почечная недостаточность
ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы
ЦМВ — цитомегаловирус
ЦТЛ — цитотоксические лимфоциты
ЭОП — эндогенные опиоидные пептиды
HLA — главный комплекс гистосовместимости человека
MALT — лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками
TNF — фактор некроза опухолей

ПРЕДИСЛОВИЕ

Представление о том, что иммунная система наряду с другими регуляторными системами организма, нервной и эндокринной системами играет важную роль в патогенезе многих (если не большинства) заболеваний, прочно вошло в сферу клинического мышления современного врача.

К сожалению, из такого рода идей, когда они существуют в форме общих представлений и лишены конкретного наполнения, трудно извлечь практическую пользу. Недостатки отечественного медицинского образования и ряд других факторов ставят российского врача в достаточно трудное положение. Помимо причин

чисто экономического характера, развитие клинической иммунологии в России тормозится в результате существования своеобразного порочного круга: врач не располагает необходимой информацией из-за «слабости» лабораторной базы; лаборатории не получают нужного для их развития импульса, так как нет соответствующих квалифицированных запросов со стороны клиницистов. Единственным способом «переломить» сложившуюся ситуацию является систематическая и настойчивая работа по распространению иммунологических знаний в среде практикующих врачей. В течение последних 10 лет работа в этом направлении проводится на факультете постдипломного образования Московского медицинского стоматологического института, а накопленный за этот период опыт авторы попытались обобщить в настоящем руководстве.

Авторы стремились быть максимально лаконичными, понимая, что многим читателям будет трудно и не всегда интересно следить за цепью доказательств существования того или иного иммунологического феномена.

Настоящее руководство является первым отечественным (не переводным) изданием по клинической иммунологии. Это обстоятельство наряду с естественными недостатками, присущими всякому первому опыту, имеет одно важное преимущество: авторы хорошо представляют себе условия работы российского практического врача, для которого, собственно, и написана эта книга.

Все критические замечания и пожелания будут приняты с благодарностью.

Академик РАМН *Е. И. Соколов*

ЧАСТЬ 1. ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ИММУНОЛОГИИ

Среди фундаментальных наук, составляющих основу современной теоретической медицины, самую короткую историю (всего около 100 лет) имеет иммунология. За это время из частного раздела бактериологии она превратилась в крупную самостоятельную дисциплину, наиболее логично объясняющую, каким образом организму высших животных удается сохранять свою биологическую индивидуальность и поддерживать постоянство внутренней среды.

ГЛАВА 1
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ИММУННОЙ СИСТЕМЕ

1.1.НЕКОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «иммунитет» происходит от латинского слова «immunis» (так в древнем Риме называли гражданина, свободного от определенных государственных повинностей). Первоначально этот термин использовался для обозначения резистентности организма к инфекции, а иммунология составляла дисциплину, изучающую феномен иммунитета. В настоящее время это определение существенно расширено и касается множества реакций, направленных на элиминацию из организма любого чужеродного материала. К области иммунологии относятся также проблемы патологии, связанные с нарушением нормального хода иммунных реакций. Кроме того, наблюдается активное взаимопроникновение иммунологии и целого ряда ставших смежными дисциплин, таких как генетика, эмбриология, экология и др.

Антигены — вещества, специфически реагирующие с антителами или клеточными рецепторами и способные индуцировать продукцию антител либо специфические клеточные реакции. Вещества, реагирующие с антителами, но неспособные При введении в организм вызвать продукцию антител, называются гаптенами. Участок молекулы антигена, обладающий способностью связываться с активным центром антитела или антигенсвязывающего рецептора лимфоцита, называется антигенной детерминантной.

Антитела — вещества, продукция которых может быть вызвана введением в организм антигенов или гаптенов при условии, что последние химически связаны с носителем. Непременным свойством антител является их способность специфически связываться с антигенами или гаптенами.

Иммунологическая память — способность организма отвечать на повторное введение антигена иммунной реакцией, характеризующейся большей силой и более быстрым развитием.

Иммунная система, так же как и другие системы высших позвоночных (нервная, эндокринная), призвана обеспечивать наилучшую приспособляемость организма к условиям внешней среды. Если формализовать признаки, характерные для этих основных систем, то окажется, что иммунная система более всего напоминает нервную (табл. 1). Действительно, обе системы могут распознавать «свое» и «чужое», способствуя,, таким образом, самоидентификации организма в окружающей среде. Обе системы реагируют на внешние воздействия с исключительно высокой специфичностью. Обе системы обладают свойством памяти. В обоих случаях распро-

странение сигнала внутри системы осуществляется по принципу сетей. Следует, однако, заметить, что в основе указанного сходства могут лежать совершенно различные механизмы.

Помимо сходства, имеются и различия, главным из которых является способность клеток иммунной системы действовать в автономном режиме, что абсолютно исключено для клеток нервной системы. Такая автономность может быть наглядно проиллюстрирована с помощью следующего эксперимента. У мыши удаляют селезенку, лишая таким образом этот лимфоидный орган регуляторных сигналов со стороны нервной и эндокринной систем. Далее с помощью стеклянного гомогенизатора или металлических сит можно превратить селезенку во взвесь лимфоидных клеток, полностью разрушив сложную архитектонику органа и избавившись от элементов стромы. После многократных центрифугирований такой взвеси, при которых каждый раз удаляется надосадочная жидкость, можно быть вполне уверенным, что отмытые клетки селезенки больше не подвергаются каким-либо влиянием со стороны организма хозяина. Если затем данные клетки поместить в питательную среду, содержащую антиген, то через несколько дней в надосадочной жидкости такой клеточной культуры можно обнаружить специфические антитела против этого антигена даже в том случае, когда животное-донор никогда ранее с ним не контактировало (рис. 1).

Таблица 1. Сравнение свойств нервной и иммунной систем

Свойство	Нервная система	Иммунная систем
Умение распознавать «свое» и «чужое»	+	+
Специфичность	Очень высокая	Очень высокая
Память	+	+
Принцип распространения сигнала	Принцип сетей	Принцип сетей
Автономность	Нервные клетки могут действовать только в составе целостной системы	Иммунокомпетентные клетки могут действовать в автономном режим

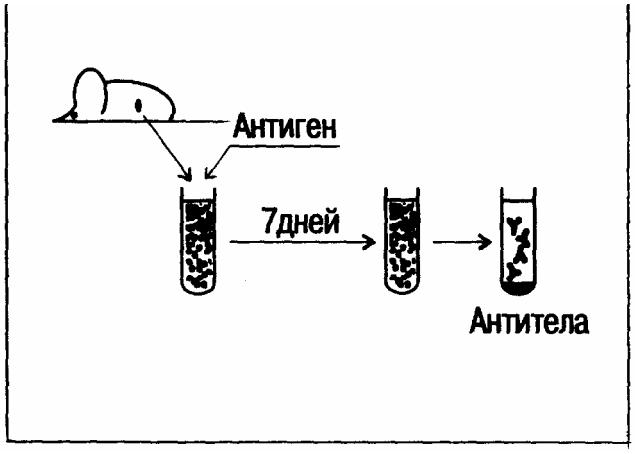


Рис. 1. Опыт, иллюстрирующий способность иммунокомпетентных клеток действовать в автономном режиме.

У мыши удаляют селезенку, из которой путем разрушения органа получают взвесь лимфоидных клеток. К такой клеточной культуре добавляют антиген, и через 7 дней культивирования в надосадочной жидкости могут быть обнаружены специфические антитела. Синтез антител происходит несмотря на то, что организм донора с этим антигеном никогда не контактировал.

1.2. ЭЛЕМЕНТЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Клетки. Лимфоциты — клетки, ответственные за специфичность действия иммунной системы, а также за сохранение иммунологической памяти. С помощью специализированных популяций лимфоцитов организм способен различать «свое» и «чужое», распознавать чужеродные антигены, продуцировать антитела, а также осуществлять специфически направленные цитотоксические реакции.

Макрофаги и моноциты— филогенетически наиболее древние клетки иммунной системы. Моноциты являются циркулирующими в периферической крови предшественниками макрофагов. Функции макрофагов разнообразны и не исчерпываются потребностями иммунной защиты организма. Впервые на защитную функцию макрофагов указал И. И. Мечников, открывший явление фагоцитоза (Нобелевская премия за 1908 г.). В настоящее время известна другая фундаментальная роль макрофагов — представление антигенов лимфоцитам.

Без этой функции макрофагов невозможно специфическое распознавание чужеродного антигена. Кроме того, макрофаги являются продуцентами многочисленных медиаторов иммунных реакций (простагландины, интерлейкины), а также факторов комплемента.

Клетки К и NK. К-клетки способны разрушать клетки-мишени, покрытые крайне малыми количествами IgG-антител. NK-клетки (естественные киллеры) также являются цитотоксическими клетками, осуществляющими цитотоксический эффект (главным образом против опухолевых клеток) без предварительной иммунизации и в отсутствие антител.

Другие клетки. Следует отметить тучные клетки и базофилы, играющие важную роль в реакциях воспаления и анафилактических реакциях, а также полиморфноядерные нейтрофилы и базофилы, участвующие в неспецифических иммунных реакциях. Гепатоциты, которые наряду с макрофагами являются продуцентами факторов комплемента.

Специфические медиаторы. Антитела представляют собой высокомолекулярные белки, относящиеся к семейству иммуноглобулинов (Ig). У человека и большинства млекопитающих различают 5 классов иммуноглобулинов: A, D, E, G и M.

Антигенсвязывающие рецепторы лимфоцитов представляют собой мембранные рецепторы иммуноглобулиновой (для В-лимфоцитов) или неиммуноглобулиновой (для Т-лимфоцитов) природы. С помощью этих рецепторов клетка специфически распознает антиген.

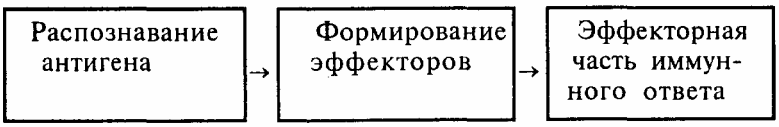
Антигенспецифические медиаторы, продуцируемые Т-лимфоцитами. К этой группе веществ относятся усиливающие и супрессорные факторы, синтезируемые лимфоцитами в процессе иммунного ответа.

Неспецифические медиаторы. К неспецифическим медиаторам иммунного ответа относятся лимфокины, монокины, фактор некроза опухоли, фактор торможения миграции макрофагов, медиаторы гиперчувствительности немедленного типа (гистамин, серотонин, фактор активации тромбоцитов), интерфероны, лизоцим, а также система комплемента.

ГЛАВА 2

ФОРМИРОВАНИЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

Иммунную реакцию от ее начала до завершения можно условно разделить на три блока.



2.1. РАСПОЗНАВАНИЕ АНТИГЕНА

2.1.1. Основные постулаты

В основе современной теории специфического распознавания антигенов иммунной системой лежат следующие представления.

1. Наличие на поверхности лимфоцитов предсуществующих специфических антигенсвязывающих рецепторов, экспрессия которых не зависит от того, встречался ли ранее организм с данным антигеном или нет.
2. На одном лимфоците может быть рецептор только одной специфичности.
3. Антигенсвязывающие рецепторы могут экспрессироваться на поверхности как Т-, так и В-лимфоцитов.
4. Лимфоциты с рецепторами определенной специфичности составляют клон, т. е. являются потомками одной родительской клетки.
5. Распознавание антигена невозможно без участия макрофагов. Последние осуществляют презентацию (представление) антигена лимфоциту.
6. Распознавание «чужого» происходит в «контексте» распознавания «своего». Иными словами, антигенсвязывающий рецептор Т-лимфоцита распознает на поверхности макрофага молекулярный комплекс, состоящий из собственного антигена гисто-совместимости и чужеродного антигена.

2.1.2. Молекулярный аппарат антигенного распознавания

Антигены главного комплекса гистосовместимости. Эти антигены экспрессированы на поверхности всех ядерных клеток организма. Свое название они получили в связи со способностью вызывать сильную реакцию отторжения при пересадке тканей в пределах одного вида. У представителей разных видов система антигенов главного комплекса гистосовместимости, MHC (major hystocompatibility complex), имеет разные названия. У человека она называется HLA (human leukocyte antigens), у мышей — H-2, у собак — DLA, у свиней — SLA и т.д. В антигенном распознавании участвуют антигены MHC классов I и II.

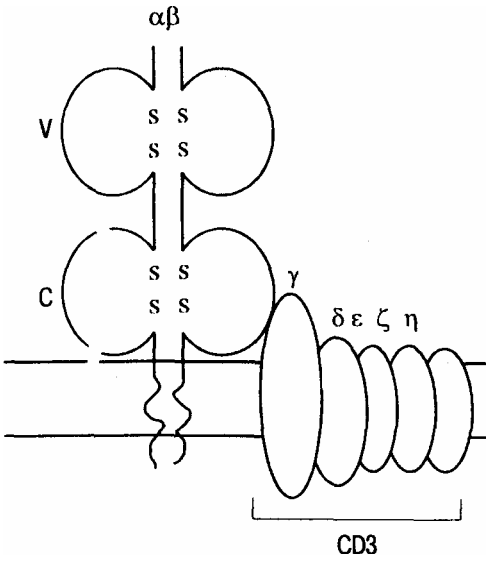


Рис. 2. Строение антигенсвязывающего рецептора Т-клетки.

Трансмембранный гетеродитмер (α- и β-цепи, связанные между собой дисульфидными мостиками, на схеме не показаны) узнает номинальный антиген в комплексе с молекулами MHC. Гетеродимер прочно связан с комплексом CD3, состоящим из цепей γ, δ, ε, ξ, η.

Антигенсвязывающие рецепторы лимфоцитов. Эти молекулы представлены на поверхности В- и Т-лимфоцитов. В первом случае они представляют собой молекулы иммуноглобулинов, а во втором составляют самостоятельное семейство гликопротеидных молекул.

Рецепторы Т-лимфоцитов существуют только в форме молекул, прочно связанных с клеточной мембраной. Этот рецептор представляет собой гетеродимер, состоящий из двух полипептидных цепей. Большая часть каждой из двух цепей рецептора находится вне клетки и свернута в виде двух доменов — вариабельного (V) и константного (C). Известно два типа Т-клеточных рецепторов. Большинство Т-лимфоцитов несет рецепторы I типа, состоящие из α- и β-цепей. Рецепторы некоторой части периферических лимфоцитов несут гетеродимеры, состоящие из γ- и δ-цепей (рецепторы II типа). У всех Т-лимфоцитов, несущих антигенсвязывающий рецептор (как α/β, так и γ/δ), последний нековалентно связан в единый комплекс с молекулой CD3 (рис. 2). Молекула CD3, состоящая из нескольких пептидных цепей (γ, δ, ε, ξ, η), участвует в передаче сигнала от распознающего антиген гетеродимера (α, β) внутрь клетки. Таким образом, весь этот комплекс, состоящий из 7 пептидных цепей, следует рассматривать как единую функциональную структуру.

Иммуноглобулины. Иммуноглобулины представляют собой группу сывороточных белков, обладающих рядом общих свойств и играющих важную роль в реализации иммунного ответа высших позвоночных. Все антитела являются иммуноглобулинами. Молекула иммуноглобулина состоит из двух тяжелых (H) и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (рис. 3). H- и L-цепи одной молекулы полностью идентичны. Существует два класса легких цепей — κ и λ и 5 классов тяжелых цепей: α, β, γ, μ и ε. Два класса тяжелых цепей содержат субклассы: α_1, α_2 и γ_1, γ_2, γ_3, γ_4. С помощью протеолитических ферментов молекула иммуноглобулина может быть расщеплена в области так называемого шарнирного участка. Например, с помощью папаина из одной молекулы может быть получено три фрагмента: два одинаковых Fab-фрагмента (fragment antigen binding), каждый из которых обладает одним антигенсвязывающим центром, и Fc-фрагмент (fragment crystallizable). При обработке пепсином молекула расщепляется в другом месте. При этом из одной молекулы образуется два фрагмента — pFc' и $P(ab')_2$. В обозначении последнего отражена его бивалентность в отношении связывания антигена. Молекулы антител отличаются исключительным разнообразием. Это разнообразие в первую очередь связано с вариабельными областями, расположенными в N-концевых участках как легких, так и тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина. Остальные участки относительно неизменны. Это

позволяет выделить в молекуле иммуноглобулина вариабельные и константные области тяжелых и легких цепей. Отдельные участки вариабельных областей (так называемые гипервариабельные участки) отличаются особым разнообразием (табл. 2).

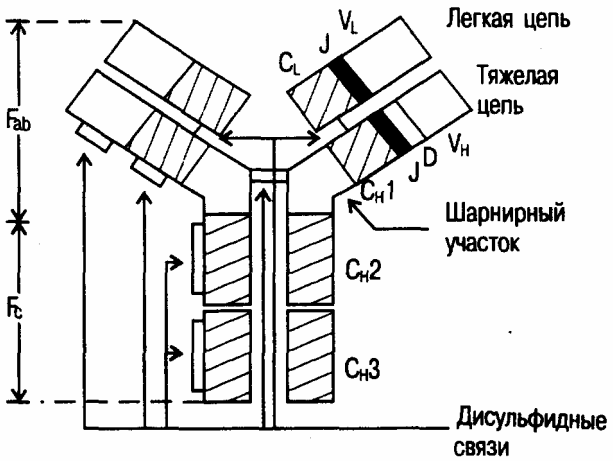


Рис. 3. Топология и функциональная архитектоника молекулы IgG.

Иммуноглобулины могут быть классифицированы в зависимости от строения константных и вариабельных областей.

Изотипы отражают разнообразие иммуноглобулинов на уровне биологического вида. При иммунизации животных одного вида сывороткой крови особи другого вида образуются антитела, распознающие изотипические специфичности молекулы иммуноглобулина. Каждый класс иммуноглобулинов имеет свою изотипическую специфичность, против которой могут быть получены специфические антитела, например кроличьи антитела против IgG мыши (препарат, широко применяемый в различных иммунодиагностических тестах). Характеристика основных классов иммуноглобулинов представлена в табл. 3.

Таблица 2. Разнообразие иммуноглобулинов

		Локализация	Гетерогенность
Изотипическое	Классы Подклассы Типы Подгруппы	C_H C_H C_L C_L или V_HV_L	На уровне вида
Аллотипическое	Аллотипы	C_H/C_L (иногда V_H/V_L)	На уровне индивидуума
Идиотипическое	Идиотипы	Вариабельная область	На уровне клона

Таблица 3. Характеристики основных классов иммуноглобулинов человека

Характеристика	Класс				
	M	G	A	D	E
Мол. Масса	900000	150000	160000	185000	200000 (мономер)
Число основных 4-цепочечных цепей	5	1	1,2	1	1
H-цепи	μ	γ	α	δ	ε
L-цепи	κ+λ	κ+λ	κ+λ	κ+λ	κ+λ
Концентрация в сыворотке(норма)	0,5—2 мг/мл	8—16 мг/мл	1,4—4 мг/мл	0—0,4 мг/мл	17—45 нг/м
Общее содержание, %	6	80	13	0—1	0,002

Наличие аллотипов обусловлено генетическим разнообразием внутри вида и касается особенностей строения константных областей молекул иммуноглобулинов у отдельных лиц или семей. Это разнообразие имеет такую же природу, как и различия людей по группам крови системы АВО.

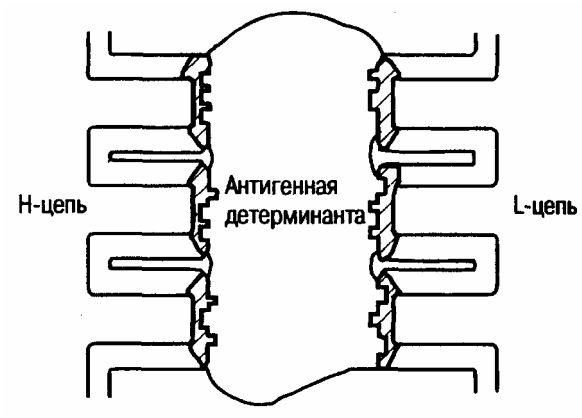


Рис. 4. Упрощенное изображение антигенсвязывающего центра.

Этот участок вариабельного домена иммуноглобулина представляет собой полость, образованную пептидными петлями тяжелых и легких цепей. Гипервариабельные участки заштрихованы.

Идиотипы представляют собой участки вариабельной части молекулы иммуноглобулина, которые сами являются антигенными детерминантами. Антитела, полученные против таких антигенных детерминант (антиидиотипические антитела), способны различать антитела разной специфичности. С помощью антиидиотипических сывороток можно обнаружить одну и ту же вариабельную область на разных тяжелых цепях и в разных клетках.

Пространственная структура молекулы иммуноглобулина обеспечивается дисульфидными связями внутри цепей, существующими помимо дисульфидных мостиков, соединяющих Н- и L-цепи. В результате пептидная цепь образует компактно свернутые петли с характерной β-складчатой структурой — так называемые глобулярные домены. Соответственно существуют вариабельные и константные домены. Гипервариабельные последовательности сосредоточены на одном конце вариабельной области, образуя часть β-поворота пептидной цепи. Гипервариабельные области легких и тяжелых цепей совместно образуют антигенсвязывающий центр, «отвечая», таким образом, за специфичность антитела (рис. 4).

Молекулы клеточной адгезии. Эти молекулы могут оказывать костимулирующее действие в процессах иммунного распознавания. Они представляют собой чрезвычайно разнообразную группу молекул, часть из которых филогенетически родственна иммуноглобулинам, антигенсвязывающим рецепторам Т-клеток и антигенам главного комплекса гистосовместимости.

2.1.3. Основные этапы процесса антигенного распознавания

Неспецифический этап антигенного распознавания. На начальных этапах каскада событий, условно называемых антигенным распознаванием, этот процесс имеет неспецифический характер. Первой клеткой, вступающей во взаимодействие с антигеном, является макрофаг. Фагоцитоз, представляющий собой филогенетически наиболее древнюю иммунную реакцию, является также и первой реакцией иммунной системы на внедрение чужеродных антигенов. Антигены могут поступать в организм в составе бактериальной клетки или вирусной частицы, а также в виде высокомолекулярного белка или полисахарида (например, при вакцинации). И в том, и в другом случае антиген подвергается фагоцитозу и внутриклеточному перевариванию. Результатом переваривания является «разборка» крупных молекул на отдельные «блоки». Для обозначения этого процесса в иммунологии применяется специальный термин — «процессинг антигена». Такой процессированный антиген экспрессируется на поверхности макрофага в комплексе с собственным антигеном главного комплекса гистосовместимости.

Распознавание антигена Т-клетками. Объектом распознавания для антигенсвязывающего рецептора Т-хелпера является комплекс чужеродного антигена (часто используется термин «номинальный антиген») и

собственного антигена МНС. При этом распознаются не только антигенная детерминанта чужеродного антигена, но и структуры, относящиеся к антигенам МНС. В тех случаях, когда в условиях эксперимента антигенпрезентирующие клетки экспрессировали антигены МНС, не свойственные тому генотипу, к которому принадлежали Т-лимфоциты—носители антигенсвязывающего рецептора, распознавание оказывалось невозможным. Этот феномен, называемый ограничением, или рестрикцией по МНС, является важным свидетельством того, что для ответа на чужеродный антиген необходимо одновременное распознавание как номинального антигена, так и собственного антигена МНС.

Распознавание антигена В-клетками. В-клетки распознают антигены с помощью своих иммуноглобулиновых рецепторов. В ходе взаимодействия В-клетки и антигена последний также может подвергаться процессингу. Такой процессированный антиген презентируется на поверхности В-клетки, где он доступен для распознавания активированным Т-хелпером. Следует заметить, что Т- и В-клетки распознают разные антигенные детерминанты одной и той же молекулы. В-клетка, как правило, не способна к самостоятельному ответу на антигенную стимуляцию. Для того чтобы В-клетка начала реагировать на антиген, ей необходимо получить второй сигнал от Т-хелпера. Антигены, иммунный ответ на которые невозможен без такого второго сигнала, называются тимусзависимыми.

Важную роль во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов играет ряд поверхностных рецепторов, обеспечивающих передачу костимулирующих сигналов. Так, на поверхности В-клеток экспрессируется дифференцировочный антиген CD40, относящийся к тому же семейству молекул, что и фактор роста нервов, TNF и Fas. Вскоре после активации на мембране Т-клетки начинает экспрессироваться лиганд для CD40 (контррецептор) — CD40L. Взаимодействие CD40— CD40L стимулирует В-клеточную пролиферацию, а также индуцированную интерлейкином 4 (ИЛ-4) дифференцировку В-клеток. Контактные взаимодействия между Т- и В-лимфоцитами могут также стимулировать пролиферацию Т-клеток. Такая стимуляция осуществляется за счет взаимодействия CD28 и B7/BB1 (CD80). B7/BB1 экспрессируется на поверхности активированных В-клеток, а CD28 присутствует на мембране большинства Т-клеток. Взаимодействие между CD28 и B7/BB1 усиливает пролиферацию Т-клеток, стимулирует продукцию цитокинов и образование цитотоксических Т-лимфоцитов, инициированных антигеном или митогеном.

В некоторых случаях активация В-клеток возможна и без участия Т-клеток. Так, бактериальный липополисахарид в высоких концентрациях способен вызывать поликлональную активацию В-клеток. При этом антигенная специфичность иммуноглобулиновых рецепторов В-клетки не играет роли. При более низких концентрациях таких антигенов иммуноглобулиновые рецепторы пассивно концентрируют антиген на поверхности В-клетки, а собственная митогенная активность липополисахарида играет для В-клеток роль второго сигнала. Такие антигены получили название тимус-независимых антигенов типа I. Некоторые линейные антигены, медленно деградирующие в организме и имеющие часто повторяющуюся антигенную детерминанту (например, полисахариды пневмококков, Vi-антиген, поливинилпирролидон и некоторые другие), также способны стимулировать В-лимфоциты без участия Т-клеток. Эти антигены длительное время персистируют на мембране и в цитоплазме специализированных макрофагов краевого синуса лимфатического узла и маргинальной зоны селезенки. Эти антигены называются тимуснезависимыми антигенами типа II.

Клональная селекция. Как уже отмечалось, наличие на поверхности лимфоцита специфического антигенсвязывающего рецептора не зависит от того, встречался ли ранее организм с данным антигеном или нет. Клетки, имеющие рецепторы одинаковой специфичности, являются представителями одного клона лимфоцитов. Такие клоны имеются как среди предшественников Т-хелперов, так и среди В-лимфоцитов. При попадании в организм чужеродного антигена происходит отбор (селекция) клонов, имеющих рецепторы, комплементарные детерминантам данного антигена. Только представители этих клонов получают «право» на дальнейшую дифференцировку. Такая дифференцировка получила название антигензависимой.

2.2. ФОРМИРОВАНИЕ ЭФФЕКТОРНОГО ЗВЕНА ИММУННОГО ОТВЕТА

2.2.1. Антигензависимая дифференцировка клона В-лимфоцитов

Роль растворимых факторов в дифференцировке и пролиферации клона. Взаимодействие между клетками иммунной системы в процессе формирования ответа на антигенную стимуляцию осуществляется, в частности, за счет специальных растворимых медиаторов. В зависимости от того, какие клетки являются главными продуцентами этих медиаторов, они могут называться лимфокинами или монокинами. Те и другие объединяются общим термином — «цитокины».

Антигензависимая дифференцировка Т-лимфоцитов контролируется главным образом ИЛ-1 и ИЛ-2. Источником ИЛ-1 служат макрофаги, которые, помимо презентации процессированного антигена (для чего необходим непосредственный контакт между макрофагом и лимфоцитом), дополнительно стимулируют предшественники Т-хелперов с помощью растворимых факторов. Такая стимуляция побуждает Т-клетки экспрессиро-

вать высокоаффинный рецептор для ИЛ-2. Эти клетки пролиферируют в ответ либо на собственный ИЛ-2, либо на ИЛ-2, продуцируемый другой субпопуляцией Т-хелперов. Субпопуляция Т-хелперов, продуцирующих ИЛ-2, обозначается Th1, а субпопуляция, не продуцирующая ИЛ-2, — Th2. Экспрессия рецептора для ИЛ-2 отмечена у клеток обеих субпопуляций.

Важную роль в дифференцировке В-клеток играет ИЛ-6. Продуцентами этого растворимого фактора являются Т-лимфоциты, подвергшиеся мито генной стимуляции, и моноциты. На поверхности активированных В-клеток экспрессируется рецептор для ИЛ-6. Под воздействием ИЛ-6 происходит конечное созревание В-лимфоцитов в антителообразующие клетки.

Дифференцировка В-лимфоцита в плазматическую клетку. Длительное время гистологи считали малый лимфоцит дифференцированной клеткой с не вполне ясной функцией. В настоящее время понятно, что под этой морфологической однородностью «скрываются» разнообразные клеточные популяции, судьба которых в процессе формирования иммунного ответа может быть совершенно различной. Показано, что под действием митогенных стимулов лимфоцит трансформируется в способные к митотическому делению и дальнейшей дифференцировке бластные клетки. Для В-лимфоцитов конечным этапом дифференцировки является плазматическая клетка, синтезирующая огромное количество антител. Специфичность синтезируемых антител, как правило, соответствует специфичности иммуноглобулинового рецептора В-лимфоцита-предшественника.

Кинетика синтеза иммуноглобулинов разных классов при первичном и вторичном иммунном ответе различная (рис. 5). Так, после первого контакта организма с антигеном сначала удается обнаружить IgM-продуцируюшие клетки. Синтез IgG достигает своего максимума лишь спустя значительный промежуток времени. При вторичном иммунном ответе кинетика синтеза IgM не отличается от той, которая наблюдалась при первичном ответе, тогда как концентрация IgG в сыворотке крови быстро нарастает, достигая существенно более высоких значений.

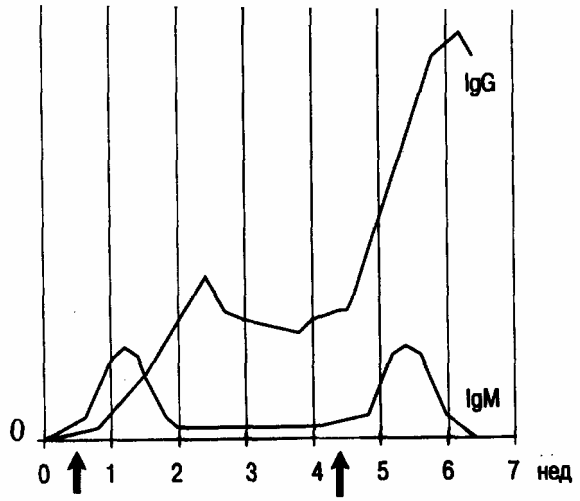


Рис. 5. Динамика синтеза IgM и IgG при первичном и вторичном иммунном ответе на антиген.

По абсциссе — время после первой иммунизации. Стрелки — моменты введения антигена.

Известно, что переключение синтеза иммуноглобулинов одного класса на синтез белков другого класса происходит в индивидуальных В-клетках. Это переключение осуществляется под контролем Т-клеток. При этом вариабельные последовательности VDJ, обусловливающие специфичность антитела, переносятся от генов μ к другому гену константного участка, например, к γ_1. Таким образом образуются антитела, имеющие другой изотип, но сохраняющие прежнюю специфичность.

2.2.2. Образование цитотоксических Т-лимфоцитов

Впервые образование цитотоксических Т-лимфоцитов наблюдали в эксперименте при отторжении чужеродных трансплантатов, однако основное «назначение» этих клеток — борьба с вирусной инфекцией. Как известно, вирусы являются внутриклеточными паразитами, в связи с чем антитела и другие сывороточные факторы не могут обеспечить достаточную защиту. Внедрившись в клетку, вирус перестраивает клеточный аппарат белкового синтеза для собствен ной репликации. Этот процесс соответствует скрытому периоду вирусной инфекции, во время которого о присутствии вируса внутри клетки свидетельствует лишь экспрессия вирусного антигена на клеточной поверхности. Уничтожение инфицированной клетки предотвращает репликацию вируса.

Как указывалось выше, распознавание чужеродного антигена возможно лишь в совокупности с собственными антигенами МНС. Однако если в Т-клеточном звене синтеза антител предшественники Т-хелперов распознают номинальный антиген на поверхности антигенпрезентирующей клетки в комплексе с антигеном МНС класса II, то при формировании противовирусного иммунитета предшественники Т-киллеров распознают комплекс вирусного антигена и антигена МНС класса I. Как и В-клетки, они нуждаются в помощи Т-хелперов, которые распознают антиген в комплексе с молекулой МНС класса II. Пролиферация и активация клеток-предшественников обеспечивается ИЛ-2.

2.3. ЭФФЕКТОРНОЕ ЗВЕНО ИММУННОГО ОТВЕТА

2.3.1. Защита от инфекции с помощью антител

Наиболее ярким примером защитного действия антител является иммунная реакция организма на бактериальную инфекцию. Циркулирующие в крови антитела связываются с антигенными детерминантами поверхностных антигенов бактерий. Комплекс микроорганизма с антителом запускает каскад химических реакций, получивших название «классический путь активации комплемента». Конечным продуктом такой активации является образование мембраноатакующего комплекса (МАК), который наносит клеточной стенке бактерии множественные повреждения.

Помимо непосредственного воздействия на бактериальную клетку, защитные свойства антител реализуются путем нейтрализации бактериальных токсинов. Молекула антитела присоединяется к молекуле токсина вблизи активного центра и стереохимически блокирует взаимодействие токсина с макромолекулярным субстратом. Потеря токсичности может также происходить за счет аллостерических конформационных изменений, когда антитело уже связалось с токсином на некотором расстоянии от активного центра молекулы токсина.

Связывание антител с инкапсулированными бактериями облегчает фагоцитоз последних полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами. Этот феномен называется опсонизацией. Известно, что неопсонизированным бактериям, имеющим капсулу, как правило, удается избежать фагоцитоза.

2.3.2. РОЛЬ ОСТРОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА ОТ ИНФЕКЦИИ

Классическая формула — rubor, tumor, calor, dolor et functio lesa symptomata inflammationis sunt — употребляется в медицине еще с античных времен. Однако только сегодня мы можем представить подробный «сценарий» этого симптомокомплекса, одно из центральных мест в котором занимает система комплемента.

Активация комплемента. Комплемент представляет собой сложный белковый комплекс, состоящий примерно из 20 белков, который, подобно белкам свертывания крови, активируется за счет каскадного процесса, когда продукт предыдущей реакции выполняет роль катализатора следующей. Известно два пути активации комплемента: классический и альтернативный.

Активация комплемента по классическому пути осуществляется, как правило, при агрегации молекул иммуноглобулина или при связывании иммуноглобулинов (антител) с соответствующим антигеном, причем последний может быть как растворимым, так и корпускулярным (бактерии, клетки). Важным моментом в процессе активации является конфигурация молекулы иммуноглобулина, которая может изменяться в ходе реакции антиген — антитело или неспецифической агрегации молекул иммуноглобулинов между собой. Непосредственно в активацию комплемента вовлечен домен CH2 Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина. Одним из условий для реализации этого процесса является расположение двух Н-цепей на определенном расстоянии одна от другой. В молекуле IgM это условие обеспечивается за счет собственной конфигурации молекулы, а в реакциях с IgG такое взаиморасположение Н-цепей возникает с частотой 1:800, в связи с чем способность IgG к связыванию комплемента существенно ниже, чем у IgM.

На раннем этапе активации комплемента по классическому пути происходит активация С1. В присутствии Ca^{2+} образуется тетрамер $C1r_2$—Ca^{2+}—$C1s_2$, который связывается с одной молекулой C1q (рис. 6). Комплекс С1 обладает протеазной активностью. Его естественными субстратами являются С2 и С4. В плазме присутствует также ингибитор этого фермента (С1—1nh). На следующем этапе образуется активный С3-комплекс (С3-конвертаза). С4 состоит из трех полипептидных цепей (α, β и γ), связанных между собой дисульфидными мостиками и нековалентными связям,,и. Под действием С1s из γ-цепи образуется С4а — фермент с молекулярной массой 6000. В то же время С1-эстераза превращает С4 в С4b-форму, способную связываться с поверхностью клетки. К связанному с клеткой С4b присоединяется С2а (продукт расщепления С2 под действием С1). Активированный комплекс С4b—С2а представляет собой С3-конвертазу, способную расщеплять С3 на С3а и С3b,. Мембраносвязанный С3b взаимодействует с С5 и становится субстратом для С3-конвертазы, которая расщепляет С5 на С5а и С5b, причем последний остается связанным с мембраной. С5b последовательно связы-

вает С6, С7 и С8, образуя комплекс, способствующий пространственной ориентации двух или более молекул С9. Проникая внутрь липидного слоя и полимеризуясь, они образуют кольцеобразный мембраноатакующий комплекс (МАК). Последний представляет собой трансмембранный канал, проницаемый для электронов и воды (рис. 7). За счет более высокого коллоидно-осмотического давления внутри клетки в нее начинают поступать Na^+ и вода, в результате чего клетка набухает и лизируется.

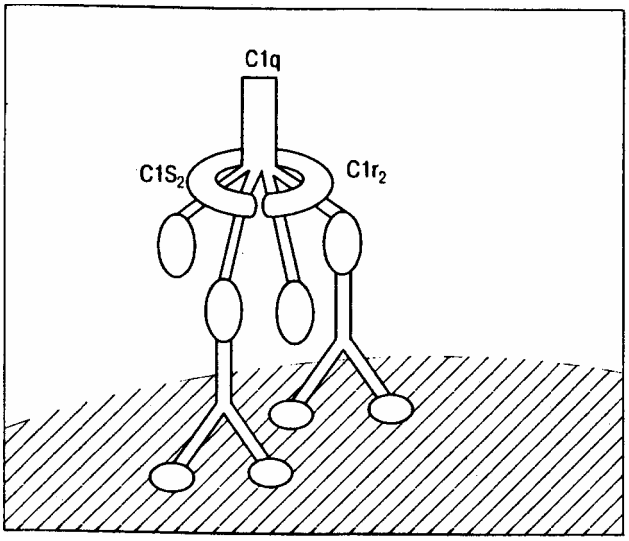


Рис. 6. Взаимодействие комплекса С1 (С1q, $C1r_2$, $C1s_2$) с двумя молекулами IgG, связавшими антиген.

Другие биологические функции системы комплемента. Помимо лизиса клеток, происходящего за счет встраивания в мембрану МАК, белки системы комплемента облегчают адгезию микроорганизмов на поверхности фагоцитирующей клетки. Это осуществляется с помощью рецепторов для С3b, которые имеются на поверхности фагоцитов. С3а и С5а, образующиеся в процессе активации комплемента, могут действовать непосредственно на нейтрофилы и макрофаги, вызывая активизацию клеточного дыхания. Кроме того, являясь анафилотоксинами, они способствуют выбросу медиаторов воспаления из тучных клеток и циркулирующих в крови базофилов.

Белки острой фазы. В ответ на инфекцию, повреждение тканей и стресс в крови резко повышается концентрация ряда белков, получивших общее название белков острой фазы. К ним относятся С-реактивный белок, сывороточный амилоидный А-белок, α_1-кислый гликопротеин (орозомукоид), α_1-антитрипсин, α_2-макроглобулин, фибриноген, церулоплазмин, С9-компонент комплемента и фактор В. Микробные эндотоксины стимулируют выработку интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей, являющихся эндогенными пирогенами. Интерлейкин-1 стимулирует клетки печени к продукции повышенного количества С-реактивного белка, концентрация которого в плазме может повышаться в 1000 раз и более. Этот белок представляет собой замкнутый пентамер, способный связываться с теми микроорганизмами, в состав мембраны- которых входит фосфорилхолин. Образовавшийся комплекс активирует систему комплемента по классическому пути, что приводит к связыванию С3b с поверхностью микроба, его опсонизации и фагоцитозу.

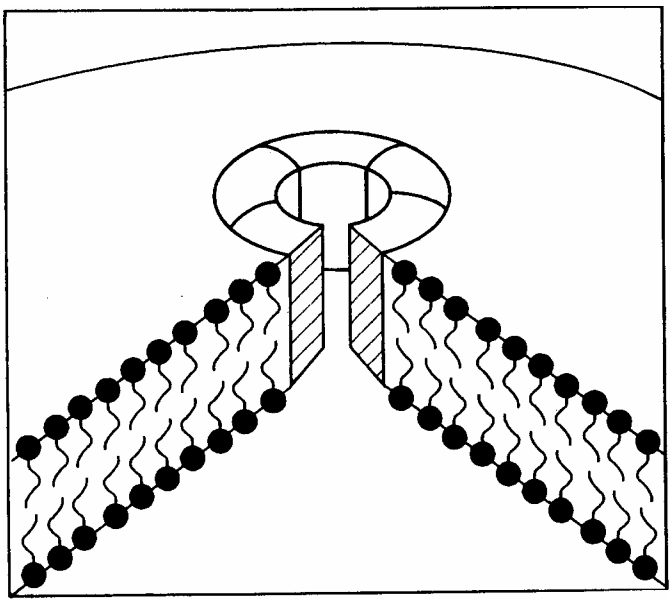


Рис. 7. Образование трансмембранного канала (мембраноатакующего комплекса) за счет полимеризации С9.

Молекула С9 содержит гидрофильный домен, который взаимодействует с комплексом С5b-8, и участок, обладающий выраженной гидрофобностью, за счет которого С9 взаимодействует с липидной мембраной. Под влиянием комплекса С5b-8 происходит полимеризация нескольких молекул С9, после чего циркулирующий комплекс поли-С9 встраивается в двухслойную липидную мембрану, формируя сквозной белковый канал.

Другие факторы неспецифической эффекторной системы защиты. Лизоцим (мурамилпептидаза) — фермент, расщепляющий мурамиловую кислоту в составе оболочки грамположительных микроорганизмов вплоть до лизиса микробной клетки. Лизоцим синтезиру ется гранулоцитами, моноцитами и макрофагами, и случае инфекции грамотрицательными микроорганизмами лизоцим действует совместно с системой комплемента. В норме лизоцим присутствует в достаточно высоких количествах в различных физиологических секретах и жидкостях организма. Определение его уровня в слюне, слезной жидкости и других секретах может дать важную информацию о состоянии антимикробной защиты. Необходимо отметить, что при миеломоноцитарном лейкозе возможно резкое повышение титров лизоцима.

Фибронектин (холодовой нерастворимый глобулин) содержится в плазме и тканевых жидкостях, синтезируется макрофагами и отличается крайне высокой чувствительностью к действию протеаз. Рецепторы к фибронектину имеются практически на всех клетках человека. Сама же молекула фибронектина имеет участки для связывания коллагена, фибрина, С1q и некоторых бактерий (стафилококки, стрептококки). Связывание этих лигандов с «плавающим» носителем рецепторов приводит к конформационным изменениям белка, который очень быстро ферментируется.

Определение фибронектина в сыворотке крови и биологических жидкостях может иметь принципиальное значение для прогноза течения инфекций. Так, развитие сепсиса сопровождается резким падением его содержания в плазме. При сепсисе заместительная терапия с помощью препаратов фибронектина дает хороший клинический результат.

Этапы развития острой воспалительной реакции. На поверхности микробной клетки происходит активация С3-конвертазы, которая расщепляет большие количества С3. При этом фрагменты С3b связываются поверхностью микроорганизма, а фрагмент С3а выделяется в свободном виде. Это активирует следующий этап, в результате чего образуются С3а и МАК. В результате образования МАК микробная клетка может лизироваться, однако многие бактерии обладают устойчивостью к действию МАК. Как отмечалось выше, С3а и С3а способствуют высвобождению из тучных клеток медиаторов воспаления. Это ведет к расширению капилляров, экссудации белков плазмы, а также к концентрации в очаге воспаления полиморфноядерных лейкоцитов за счет механизма хемотаксиса.

Таким образом, можно легко объяснить механизмы возникновения внешних симптомов острой реакции воспаления. Расширение капилляров приводит к гиперемии (rubor), экссудация белков плазмы и выход из кровеносного русла лейкоцитов проявляются в виде отека (tumor); все это совместно с выбросом эндогенных пирогенов приводит к местному, а часто и общему повышению температуры и болезненности (calor et dolor).

2.3.3. Взаимодействие цитотоксического лимфоцита с клеткой-мишенью

Цитотоксические лимфоциты-эффекторы могут быть индуцированы либо в аллогенной системе, либо клетками, презентирующими вирусный антиген на своей поверхности. В первом случае специфичность таких

клеток будет направлена против антигенов МНС класса I, а во втором — против комплекса вирусный антиген — антиген МНС класса I.

Отличительной особенностью цитолитической реакции цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) является ее автономность. ЦТЛ не нуждаются в помощи со стороны каких-либо других клеток или растворимых факторов. Для осуществления литической реакции необходим прямой контакт между ЦТЛ и мишенью. Первая фаза взаимодействия ЦТЛ и клетки-мишени (литический цикл) называется адгезией и осуществляется за счет связывания рецептора с антигеном. Далее происходит перестройка цитоплазмы клетки-эффектора, называемая программированием лизиса. На этой стадии в цитоплазме ЦТЛ накапливаются гранулы, содержащие растворимые медиаторы, такие как перфорин, цитолизин, гранзимы и др.

Следующей фазой литического цикла является летальный удар, в ходе которого происходит экзоцитоз растворимых медиаторов с последующим образованием трансмембранных пор. Результатом этих событий является коллоидно-осмотический лизис клетки-мишени. После гибели клетки-мишени клетка-эффектор способна к повторному осуществлению цитотоксической реакции (рис. 8). Есть основания полагать, что коллоидно-осмотический шок, вызванный гранулами экзоцитоза, не единственный механизм гибели клетки-мишени. Показано, что при взаимодействии комплекса Т-клеточный рецептор — CD3 с антигенами МНС на поверхности клетки-мишени включается механизм транскрипции гена Fas-лиганда, в результате чего этот белок начинает экспрессироваться на поверхности клетки-эффектора. На мембране клеток-мишеней в норме экспрессируется белок Fas, служащий рецептором для Fas-лиганда. Активация этого рецептора приводит к включению механизма программированной гибели клетки (апоптоз).

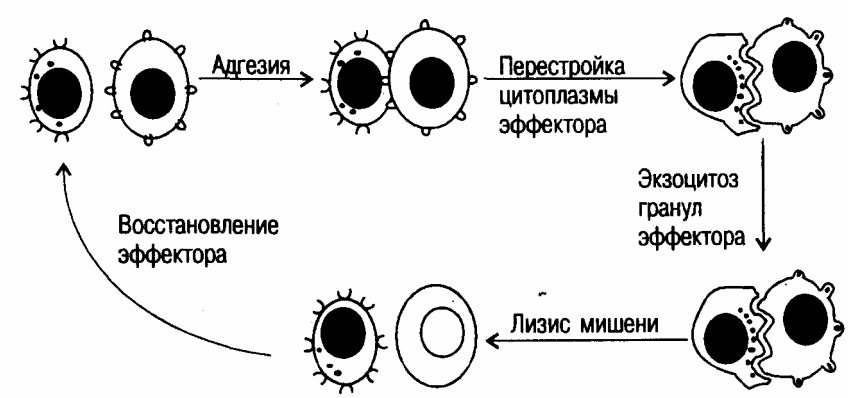


Рис. 8. Цитотоксическая реакция.

Следует обратить внимание на то, что ЦТЛ действуют автономно и не зависят от каких-либо других клеток, а также гуморальных факторов (например, антител или комплемента).

ГЛАВА 3
МОРФОЛОГИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

3.1. ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Несмотря на то что синтез антител может быть получен in vitro, когда анатомические связи между клетками иммунной системы нарушены, а нейроэндокринная регуляция отсутствует, для получения полноценного иммунного ответа необходим весь комплекс реакций, присущий целостному организму. Существует своеобразная иерархия органов иммунной системы, в которой можно выделить первичные и вторичные лимфоидные органы. К первым относятся тимус (вилочковая железа) и костный мозг (у птиц еще и фабрициева сумка), ко вторым — лимфатические узлы, селезенка, а также лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками. Указанные органы связаны между собой и с остальными тканями организма с помощью кровеносной системы и лимфатических путей. По ним передвигаются рециркулирующие лимфоциты, за счет которых и осуществляется эта связь.

Костный мозг. В собственном смысле слова костный мозг не является лимфоидным органом. Тем не менее его значение для функционирования иммунной системы огромно. Именно в костном мозге из плюрипотентной стволовой клетки возникают все форменные элементы крови, в том числе и предшественники различных популяций лимфоцитов, а также макрофагальные клетки. Кроме того, есть данные, указывающие на то, что костный мозг является одним из основных мест синтеза антител. Так, у взрослой мыши в костном мозге сосредоточено до 80% всех клеток, секретирующих иммуноглобулины. Внутривенное введение клеток костного моз-

га может полностью восстановить иммунную систему у смертельно облученных животных. У млекопитающих костный мозг является эквивалентом фабрициевой сумки птиц — здесь созревают В-лимфоциты.

Тимус. Тимус представляет собой окруженный капсулой лимфоидный орган, который располагается за грудиной в переднем средостении. Это первый лимфоидный орган, возникающий в процессе эмбриогенеза у млекопитающих и птиц. Каждая доля тимуса (у млекопитающих их две) состоит из долек, частично отделенных одна от другой с помощью выростов капсулы, называемых перегородками, или трабекулами. Периферическую часть дольки занимает кора, а центральную часть — мозговое вещество. Важную роль в функционировании тимуса играет строма, состоящая главным образом из эпителиальных клеток. Эпителиальные клетки тимуса синтезируют ряд пептидных гормонов, из которых четыре изучены достаточно хорошо. К ним относятся тимулин, α- и β-тимозин и тимопоэтин. Активным центром последнего является пентапептид ТР-5. Указанные пептидные гормоны участвуют в многоэтапной дифференцировке лимфоцитов в тимусе.

Протимоциты привлекаются в тимус за счет хемотаксических факторов. По мере созревания на поверхности тимоцитов начинают экспрессироваться различные дифференцировочные антигены. Это могут быть маркеры, специфичные для тимоцитов коркового слоя (CD1) и характерные только для незрелых Т-клеток, постоянные маркеры Т-лимфоцитов (CD3, CD5), а также маркеры, специфичные для популяций хелперов/индукторов (CD4) и цитотоксических/ супрессорных лимфоцитов (CD8). В тимусе Т-лимфоциты приобретают способность распознавать антигены в контексте собственных антигенов МНС. Репертуар клонов Т-клеток формируется за счет механизмов клеточной селекции.

Существует два типа клональной селекции: положительная и отрицательная. Положительная селекция основана на распознавании антигена, ассоциированного с молекулами, являющимися продуктами собственных МНС. Отрицательной селекции подвергаются клетки, несущие аутореактивные Т-клеточные рецепторы. Стимуляция таких рецепторов антигенами МНС включает в клетках механизм программированной клеточной гибели (апоптоз), в результате чего происходит элиминация клонов аутореактивных Т-лимфоцитов. Механизм апоптотической гибели клеток уже упоминался при рассмотрении взаимодействия цитотоксической клетки-эффектора с клеткой-мишенью. Этот механизм играет важную роль в реализации разнообразных иммунных реакций, а также лежит в основе патогенеза многих заболеваний, поэтому рассмотрим несколько подробнее проблему апоптоза.

Апоптоз (программированная клеточная гибель, клеточное самоубийство) в отличие от некроза представляет собой физиологический механизм гибели клетки. Некроз, являющийся патологической формой гибели клетки, характеризуется острым нарушением клеточных структур, сопровождающимся быстрым набуханием клетки и лизисом. В противоположность этому апоптоз — контролируемая форма самопереваривания клетки. Этот механизм делает минимальным риск попадания клеточного содержимого в межклеточное пространство, в результате чего гибель клеток не сопровождаеься признаками реакции воспаления. При апоптозе включается механизм активации эндогенных протеаз с последующим разрушением цитоскелета и сжатием клетки. За счет активации эндонуклеаз деградирует ядерная ДНК. Последняя разрезается на отдельные фрагменты, которые вместе с частью цитоплазмы окружаются участком клеточной мембраны, образуя так называемые апоптотические тельца. Утилизация апоптотических телец осуществляется за счет фагоцитоза. Иногда, например при взаимодействии цитотоксического лимфоцита-эффектора с клеткой-мишенью, для индукции апоптоза необходимо связывание поверхностного Fas-белка (CD95), называемого также Fas-рецептором, с другим белком клеточной поверхности — Fas-лигандом. Последний относится к тому же семейству белков, что и TNF. Взаимодействие Fas-лиганда и Fas-рецептора запускает программу клеточной гибели. Эта программа может быть также запущена и через другие рецепторы, например TNF-рецептор I типа, рецепторы для глюкокортикоидов, циклофилины.

Патогенез многих заболеваний связан с нарушением механизма апоптотической гибели клеток. Заболевания, относящиеся к этой группе, можно разделить на заболевания, связанные с подавлением апоптоза, и заболевания, при которых, наоборот, имеет место усиление апоптотической гибели клеток. К первой группе относят злокачественные новообразования (множественная лимфома, карцинома с мутацией в области p53, гормонзависимые опухоли — рак грудной железы, рак предстательной железы, рак яичника), аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка — СКВ и гломерулонефрит) и некоторые вирусные инфекции. Вторая группа включает СПИД, нейродегенеративные заболевания (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и др.), синдромы миелодисплазии (апластическая анемия), ишемические нарушения (инфаркт миокарда, инсульт, другие синдромы, связанные с временным нарушением кровоснабжения), а также токсические повреждения печени (алкогольный цирроз).

Лимфатические узлы. Лимфатические узлы являются вторым (после кожи и слизистых оболочек) барьером на пути инфекции. Ткани организма дренируются лимфатическими сосудами, по которым лимфа поступает в ворота лимфатического узла. По афферентным сосудам лимфа поступает в краевой синус, диффундирует сквозь лимфоциты коркового вещества к макрофагам и синусам мозгового вещества. Затем по эфферентным сосудам лимфа поступает в грудной проток, а оттуда в кровь. Т- и В-лимфоциты расположены в лимфатическим узле неравномерно.

Покоящиеся В-лимфоциты образуют скопления в кортикальной области. Эти области называются первичными фолликулами. После антигенной стимуляции В-лимфоциты образуют вторичные фолликулы, в которых покоящиеся В-лимфоциты окружают зародышевый центр, содержащий крупные интенсивно пролиферирующие В-лимфобласты, ретикулярные макрофаги и специализированные дендритные клетки. Остальная часть кортикальной области также состоит преимущественно из В-клеток, хотя содержит и диффузно расположенные Т-лимфоциты.

Основная масса Т-лимфоцитов располагается в паракортикальной, или тимусзависимой, области лимфатического узла. При формировании иммунного ответа Т-лимфоциты этой области также превращаются в лимфобласты и активно пролиферируют. Однако при ответе на тимуснезависимый антиген (например, на пневмококковый полисахарид SIII) лимфоциты паракортикальной области не активируются, тогда как в фолликулах кортикальной зоны наблюдается интенсивная клеточная пролиферация с образованием зародышевых центров.

Селезенка. Лимфоидная ткань селезенки образует белую пульпу, окруженную заполненной эритроцитами красной пульпой. Участки красной пульпы содержат макрофаги и пронизаны венозными синусами. В-клетки занимают в селезенке краевую зону, а Т-лимфоциты — центральную.

Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками. Для обозначения этого вида лимфоидной ткани используется сокращение MALT (mucosal- associated lymphoid tissue). MALT представляет собой субэпителиальные скопления лимфоидной ткани, не ограниченной соединительнотканной капсулой. Лимфоидная ткань может располагаться диффузно, представляя собой скопления лимфоцитов, фагоцитов и плазматических клеток в легких или lamina propria стенки кишечника, или быть достаточно хорошо организованной с выраженными фолликулами. У человека это кольцо Вальдейера — Пирогова, состоящее из язычной, небной и глоточных миндалин, групповые лимфатические фолликулы (пейеровы бляшки) кишечника, а также аппендикс. MALT образует особую систему, в которой циркулируют клетки, синтезирующие IgA и IgE.

3.2. КЛЕТКИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

Макрофаги. Из всех клеток, участвующих в реализации иммунного ответа, макрофаг отличается наиболее выраженной полифункциональностью. К важнейшим функциям макрофагов следует отнести фагоцитоз, процессинг антигенов и представление процессированного антигена лимфоцитам, синтез цитокинов и компонентов системы комплемента, а также синтез многих лизосомных ферментов. Макрофаги образуются в костном мозге из промоноцитов и в форме моноцитов циркулируют в периферической крови. Попадая в различные ткани, они могут терять подвижность (становятся резидентными клетками), а их морфология может меняться (рис. 9). Тем не менее генетическая программа, ответственная за реализацию их функций, не претерпевает существенных изменений. Так, звездчатые ретикулоэндотелиоциты (купферовские клетки) печени, помещенные в искусственные условия, могут осуществлять презентацию антигенов Т-клеткам.

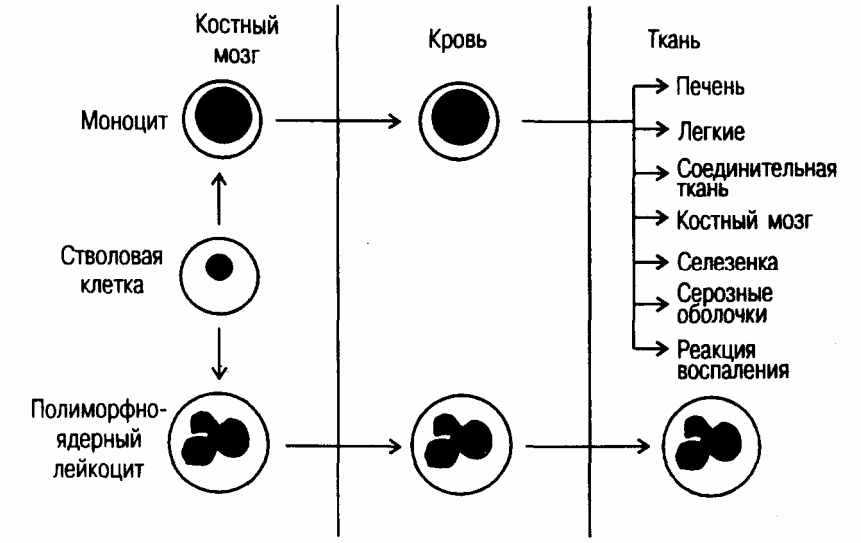


Рис. 9. Происхождение различных фагоцитирующих клеток.

Макрофаги обладают примитивным механизмом узнавания, основанным на взаимодействии углеводных остатков. С помощью этого механизма обеспечивается адгезия микроба на поверхности фагоцитирующей клетки. Частица, прикрепившаяся к поверхности макрофага, активирует актинмиозиновую сократительную

систему, в результате чего образуются псевдоподии, с помощью которых плазматическая мембрана постепенно надвигается на объект фагоцитоза. В конечном итоге частица оказывается заключенной в вакуоль (в фагосому). Сразу же с фагосомой сливаются цитоплазматические гранулы, и их содержимое оказывается внутри фагосомы. В процессе фагоцитоза в макрофаге быстро активируется метаболизм глюкозы по гексозомонофосфатному пути и образуются свободные радикалы. Это вызывает резкое нарастание потребления кислорода («дыхательный взрыв»). События развиваются в следующей последовательности. Из моновалентного молекулярного кислорода образуется надперекисный анион (O_2^-), который спонтанно или под действием супероксиддисмутазы превращается в перекись водорода (H_2O_2). В конечном итоге происходит вторичное образование гидроксильных радикалов (OH~) и синглетного (активного) кислорода ('O_2).

Эта система зависимых от кислорода бактерицидных агентов дополняется кислороднезависимыми механизмами, которые включают катионные белки, повреждающие мембраны микроорганизмов, лизоцим, способный расщеплять мукопептиды клеточной стенки бактерий, лактоферрин, с помощью которого пролиферирующие бактерии лишаются железа, и набор протеолитических и гидролитических ферментов, перевариваю-щих убитые микроорганизмы.

Лимфоциты. Долгое время считалось, что малый лимфоцит является высокодифференцированной клеткой, деление которой невозможно. Такое мнение сложилось среди гистологов и гематологов в связи с тем, что в лимфоцитах никогда не удавалось наблюдать фигуры митозов. Однако в конце 50-х — начале 60-х годов D. A. Hungerfbrd и P. C. Novell показали, что при культивировании в присутствии экстракта из зерен красной фасоли Phaseolus vulgaris лимфоцитов периферической крови последние трансформируются в крупные бластные клетки, которые на 3-й и 4-й день культивирования можно видеть в состоянии митоза.

Примерно в это же время (60-е годы) пионерскими работами нескольких групп исследователей (R. A. Good, J. B. Miller, J. H. Humphrey и N. A. Mitchison) было установлено, что лимфоциты, несмотря на свое морфологическое единообразие, на самом деле состоят из двух разных клеточных популяций, имеющих совершенно различный онтогенез. Было показано, что продукция антител возможна только в результате кооперации двух популяций лимфоцитов — Т и В. Те и другие клетки образуются в костном мозге из стволовой кроветворной клетки, после чего предшественники Т-лимфоцитов попадают в тимус, где дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты, а предшественники В-лимфоцитов созревают в других лимфоидных органах. Как отмечалось, у птиц таким органом является фабрициева сумка, у млекопитающих эквивалентом этого лимфоидного органа является костный мозг.

Сравнительная характеристика популяций Т- и В-лимфоцитов представлена в табл. 4.

Лимфоциты различаются между собой и по продолжительности жизни. Различают короткоживущие (5—6 дней) и долгоживущие (от нескольких месяцев до нескольких лет) лимфоциты. Клетки обеих этих категорий встречаются среди как Т-, так и В-лимфоцитов.

Популяция Т-лимфоцитов. Больше 50% лимфоцитов периферической крови и около 90% лимфоцитов грудного протока составляют Т-лимфоциты (среди последних более 70% — это долгоживущие лимфоциты). На мембране Т-лимфоцитов имеются характерные антигенные маркеры, отличающие эту популяцию от других лимфоидных клеток. Кроме того, Т-лимфоциты несут рецептор для эритроцитов барана (этот рецептор характерен только для Т-клеток человека). Благодаря данному рецептору Т-лимфоциты в смеси с эритроцитами барана образуют характерные фигуры розеток. Это свойство человеческих Т-лимфоцитов используется в лабораторной практике для их идентификации и подсчета (см. часть II, раздел 7.4). Важным свойством Т-лимфоцитов является их способность трансформироваться и пролиферировать в культуре под воздействием некоторых лектинов растительного происхождения. К ним относятся фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон А).

Таблица 4. Сравнение свойств В- и Т-лимфоцигов

Свойство	В-лимфоциты	Т-лимфоциты
Морфология	Без особенностей	Без особенностей
Дифференцировка	Под влиянием фабрициевой сумки (у птиц); у млекопитающих — в костном мозге	Под влиянием тимуса
Поверхностные антигены		
CD2 (рецептор для эритроцитов барана)	—	+
CD3	—	+
CD4	—	+
CD5	—	+
CD8	—	+

CD19	+	—
CD20	+	—
CD21	+	—
CD22	+	—
HLA		
I класс (A, B, C)	+	+
II класс (DR. DQ, DP)	+	+ (на активированных Т-клетках)
Рецепторы		
для антигена	+ (иммуноглобулиновый рецептор)	+ (неиммуноглобулиновый рецептор)
для комплемента	+	—
Fc-рецептор	++	+
Пролиферативный ответ		
ФГА	—	+
Кон А	—	+
СКЛ	—	+
МЛ (PWM)	+	+
ЛПС	+	—
Nocardia	+	—
Содержание в разных органах, %		
Кровь	15—20	50—80
Лимфатические узлы	15	85
грудной проток	10	90
Костный мозг	10—15	<3
Тимус	<3	>97
Циркуляция	Слабая рециркуляция. Локализация в фолликулах вокруг зародышевых центров	Рециркуляция многих клеток. Локализация в тимусзависимых зонах
Продолжительность жизни	В большинстве — короткоживущие, но есть и долгоживущие	Сосуществование коротко- и долгоживущих
Функция		
Продукция антител	Секреция	Регуляция
ГЗТ	Не участвуют	Клетки-эффекторы и регуляторы
Отторжение трансплантата и опухоли	Продукция цитотоксических и блокирующих антител	Цитотоксические клетки-эффекторы
Толерантность	Поздняя и транзисторная	Ранняя и стойкая

Популяция Т-лимфоцитов неоднородна, а состоит из нескольких субпопуляций, различающихся как по поверхностным антигенам, так и по функции. Это прежде всего Т-хелперы (индукторы), Т-супрессоры и ЦТЛ. Для первых характерен поверхностный маркер CD4, а для двух других — CD8.

Показано, что клетки с фенотипом CD4* также подразделяются на два функционально различных подтипа — Th1 и Th2. Th1-клетки участвуют в реализации реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и способны, синтезировать ИЛ-2, ИФНγ и лимфотоксин, а Th2-клетки продуцируют ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6 и ИЛ-10.

Популяция В-лимфоцитов. В-лимфоциты в отличие от Т-клеток обладают слабой способностью к рециркуляции. В связи с этим В-клетки практически отсутствуют в лимфе грудного протока, а в крови их количество составляет не более 30%. Среди В-лимфоцитов явно преобладают короткоживущие, хотя встречаются и долгоживущие клетки. Характерной особенностью В-лимфоцита является наличие на его поверхности иммуноглобулинового рецептора, а также рецептора к С'3. Эти свойства помогают в идентификации и подсчете ко-

личества В-лимфоцитов (см. часть II, раздел 7.4). Кроме того, на поверхности В-лимфоцитов имеются характерные антигенные маркеры, к которым получены моноклональные антитела (CD 19, CD20, CD22, а также CD21 — зрелые В-клетки и CD23 — плазматические клетки), используемые для идентификации В-лимфоцитов.

ГЛАВА 4
РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

4.1. МЕХАНИЗМЫ ОГРАНИЧЕНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА

Система регуляции деятельности иммунной системы должна быть достаточно надежной, так как в противном случае высока вероятность развития неконтролируемой иммунной реакции, которая может привести к фатальным последствиям. О важности такого контроля косвенно свидетельствует тот факт, что в организме существует множество механизмов, ограничивающих иммунный ответ.

Контроль со стороны антител по типу обратной связи. Одним из наиболее эффективных механизмов, ограничивающих синтез антител, является механизм отрицательной обратной связи, в котором продукт иммунной реакции (антитела) одновременно выступает в роли ее ингибитора. При этом речь идет не о простом снижении содержания антигена за счет его связывания антителами, поскольку целые молекулы иммуноглобулинов тормозят иммунный ответ более эффективно, чем $F(ab')_2$-фрагменты. Полагают, что механизм такого торможения связан с образованием перекрестных связей между антигеном, молекулой IgG и Fc-рецептором В-лимфоцита. Следует отметить, что тормозящим действием обладают лишь IgG, тогда как IgM усиливают иммунный ответ.

Т-супрессоры. С помощью Т-супрессоров осуществляется регуляция различных форм гуморального и клеточного иммунитета, в том числе ГЗТ, а также пролиферация ЦТЛ, Т-хелперов и В-клеток. Клетки-супрессоры могут обладать антигенной специфичностью, т. е. подавлять иммунный ответ только на определенный антиген, а могут быть и антигеннеспецифическими. Активация антигенспецифических Т-супрессоров осуществляется с помощью так называемых индукторов Т-супрессоров, имеющих такой же фенотип, как и Т-хелперы, — $CD4^+$. Индукторы Т-супрессоров активируются при контакте с антигеном на поверхности антигенпрезентирующих клеток. Собственно механизм супрессии осуществляется с помощью растворимых факторов, способных подавлять активность как Т-хелперов, так и В-клеток или ЦТЛ. Т-супрессоры человека относятся к субпопуляции $CD8^+$. Антигенспецифические супрессоры способны активировать антигеннеспецифические супрессоры.

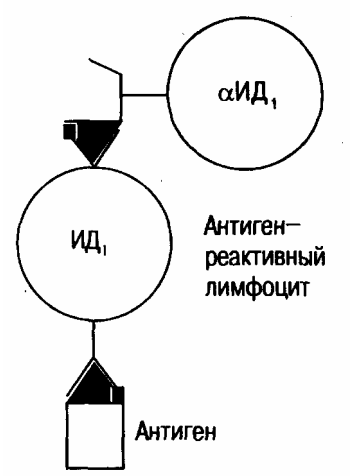


Рис. 10. Один из элементов идиотипической сети.

Антигенные рецепторы одного лимфоцита распознают идиотип (ИД) рецептора другого лимфоцита. Антиидиотипические рецепторы (антитела) могут содержать «внутренний образ» антигена. Такие антиидиотипические антитела при определенных условиях могут замещать антиген.

Несмотря на достаточно многочисленные исследования, показавшие, что клетки с фенотипом $CD8^+$ могут подавлять продукцию антител посредством секреции антигенспецифического секреторного фактора, все попытки выделить устойчивую линию Т-супрессоров, а также получить биохимические и молекулярно-биологические характеристики супрессорного фактора оказались безуспешными. В связи с этим существование специальной субпопуляции Т-супрессоров сомнительно.

Идиотипические сетевые взаимодействия. Гипервариабельные районы H- и L-цепей молекулы иммуноглобулина включают участки, которые сами могут играть роль антигенных детерминант. Эти индивидуальные, характерные для антител определенной специфичности конфигурации, которые могут распознаваться соответствующими рецепторами Т- и В-лимфоцитов или антителами, получили название идиотипических детерминант. Автор гипотезы сетевого взаимодействия лауреат Нобелевской премии 1984 г. N. Jerne предположил, что лимфоциты, способные распознавать огромное число разнообразных чужеродных антигенных детерминант, должны распознавать и идиотипические детерминанты самих лимфоцитарных рецепторов. В соответствии с этим постулируется существование сетевого взаимодействия между лимфоцитами типа идиотип — антиидиотип (рис. 10). Попадание в организм чужеродного антигена неизбежно должно нарушить равновесие сетевых идиотипических взаимодействий, а стремление системы восстановить утраченное равновесие будет естественно ограничивать иммунный ответ.

Антиидиотипические антитела содержат внутренний образ того антигена, к которому специфичны первые антитела. Это можно пояснить на следующем примере. Моноклональные антитела, полученные против антагониста ацетилхолина BISQ, способны стимулировать ацетилхолиновые рецепторы, выполняя в этом взаимодействии функцию ацетилхолина. Эти свойства антиидиотипических антител могут быть использованы при создании вакцинных препаратов нового поколения.

4.2. МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЗА СЧЕТ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ

Классификация и общие свойства цитокинов. Цитокинами принято называть обширное семейство биологически активных пептидов, обладающих гормоноподобным действием, обеспечивающих взаимодействие клеток иммунной, кроветворной, нервной и эндокринной систем. Все цитокины объединяются следующими общими свойствами:

— синтезируются в процессе реализации механизмов естественного или специфического иммунитета;

— проявляют свою активность при очень низких концентрациях (порядка 10^{-11} моль/л);

— служат медиаторами иммунной и воспалительной реакций и обладают аутокринной, паракринной и эндокринной активностью;

— действуют как факторы роста и факторы дифференцировки клеток (при этом вызывают преимущественно медленные клеточные реакции, требующие синтеза новых белков);

— образуют регуляторную сеть, в которой отдельные элементы обладают синергическим или антагонистическим действием;

— обладают плейотропной (полифункциональной) активностью и перекрывающимися функциями.

В зависимости от того, какие клетки преимущественно синтезируют данный цитокин, различают интерлейкины, монокины и лимфокины. Все 4 обозначения могут быть синонимами, причем термин «цитокин» играет роль объединяющего. В настоящее время 16 интерлейкинов имеют цифровые обозначения (ИЛ-1 — ИЛ-16), остальные цитокины буквенные: CSF (колониестимулирующие факторы), OSM (онкостатин М), LTF (фактор, ингибирующий лейкозные клетки), NGF (фактор роста нервов), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), TNF (фактор некроза опухолей). Свойствами цитокинов обладают также интерфероны.

Действие цитокинов тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями организма. При этом происходит модуляция как локальных, так и системных механизмов защиты. Одной из важнейших функций системы цитокинов является обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной системы в ответ на стресс.

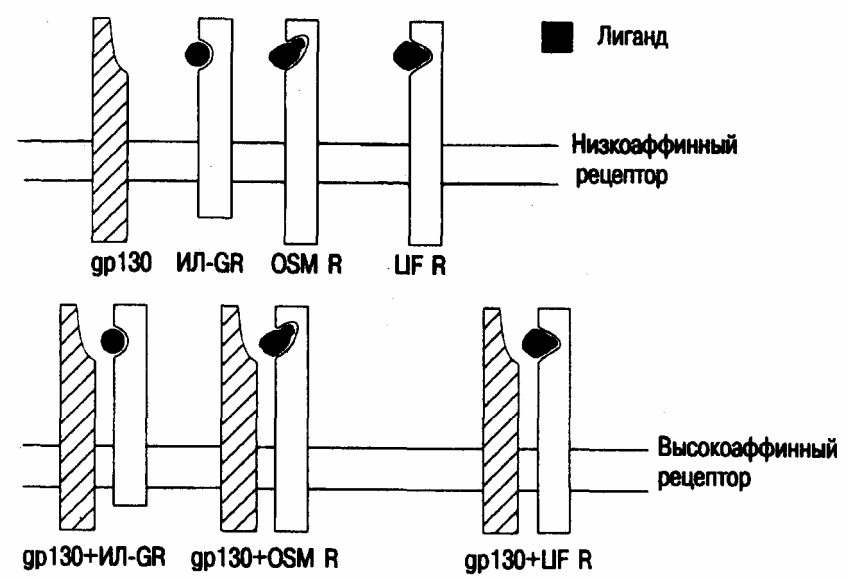


Рис. 11. Участие белка gp130 в формировании высокоаффинных рецепторов для цитокинов.

Механизмы действия цитокинов. Влияние цитокина осуществляется путем его взаимодействия со специфическим мембранным рецептором клетки-мишени. В предыдущем разделе отмечалось плейотропное действие цитокинов, которое объясняется наличием специфических рецепторов на поверхности клеток различного гистогенеза. В большинстве случаев рецепторы для цитокинов представлены одной, двумя или тремя пептидными или гликопротеидными цепями, встроенными в клеточную мембрану. При этом цитокин взаимодействует с внешней, экстрацеллюлярной, частью рецептора. Сигнал о такого рода взаимодействии передается внутрь клетки интрацеллюлярной частью рецептора, которая обладает ферментативной активностью. Эффективность действия рецептора зависит от его аффинности, т. е. от того, какое минимальное келичество лиганда необходимо для образования прочного комплекса и как следствие для передачи специфического сигнала внутрь клетки. Как правило, аффинность зависит от числа белковых цепей, входящих в состав рецептора. При этом вторая цепь может быть общей у ряда рецепторов с разной специфичностью. Так, белок gp130 присутствует в качестве дополнительной цепи в рецепторах для ИЛ-6, OSM и LIF (рис. 11). В рецепторах для ИЛ-3, ИЛ-5 и GM-CSF роль дополнительной цепи выполняет белок КН-97. С этой особенностью строения большинства цитокиновых рецепторов связана, по-видимому, так называемая избыточность действия, когда разные цитокины влияют сходным образом на одну и ту же клеточную мишень (табл. 5).

Таблица 5. Сравнение некоторых биологических функций цитокинов, использующих белок gpl30 для передачи сигнала внутрь клетки

Тип реакции	Функция	Цитокин			
		ИЛ-6	LIF	OSM	CNTF
Иммунная реакция	Продукция иммуноглобулинов	+	—	—	—
	Пролиферация Т-клеток	+	—	—	—
	Дифференцировка ЦТЛ	+	—	—	—
	Дифференцировка макрофагов из М1-клеток	+	+	+	
	Стимуляция костномозговых клеток-предшественников	+	+		
Кроветворение	Образование тромбоцитов (созревание мегакариоцитов)	+	+		
	Пролиферация миеломных клеток и клеток плазмоцитомы	+			
Реакция воспаления	Синтез белков острой фазы	+	+	+	—

	Выживание в культуре чувствительных нейронов		+		+
	моторных нейронов цилиарных нейронов	—	+	—	+ +
Развитие нервной ткани	Секреция гормонов гипофиза	+	—	—	
	Переключение с адренергического на холинергический фенотип		+		+
	Дифференцировка астроцитов II типа				+

Основные свойства некоторых цитокинов.

ИЛ-1. Этот интерлейкин могут синтезировать различные клетки соединительной ткани, как связанные с системой кроветворения, так и не имеющие к ней никакого отношения. ИЛ-1 существует в виде двух полипептидов ИЛ-lα и ИЛ-1β, синтез которых кодируется различными генами. Обе эти формы образуются из соответствующих молекул-предшественников, имеющих одинаковую молекулярную массу (31 000). Предшественник ИЛ-lα (про-ИЛ-lα) биологически активен и способен соединяться с рецептором в форме димера. ИЛ-1β приобретает способность связываться с рецептором для ИЛ-1 только после ферментативного расщепления, в результате которого образуется конечный продукт с молекулярной массой 17 500. Этот процесс катализируется определенным ферментом — ИЛ-1β-конвертирующим энзимом (ICE).

Преобладающей формой ИЛ-1 является ИЛ-1β (количество соответствующей мРНК, обнаруживаемое в активированных клетках, в 10—50 раз превышает количество мРНК для ИЛ-lα). Описано два вида рецептора для ИЛ-1 (ИЛ-1Р). ИЛ-1Р с молекулярной массой 80000 (рецептор I типа) выявляется на Т-лимфоцитах и фибробластах. ИЛ-1Р с молекулярной массой 68 000 (рецептор II типа) характерен для нейтрофилов, моноцитов, клеток костного мозга и В-лимфоцитов (интактных и трансформированных вирусом Эпштейна — Барр). Оба рецептора, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов, хотя и кодируются различными генами, имеют идентичную ИЛ-1-связывающую область.

Биологические свойства ИЛ-1 ярко демонстрируют его полифункциональность. ИЛ-1 играет одну из центральных ролей в воспалительной реакции, в ответе на бактериальную инфекцию и тканевые повреждения, вызванные ультрафиолетовым излучением. ИЛ-1 проявляет свойства нейроэндокринного гормона, стимулируя продукцию АКТГ, простагландинов и являясь митогеном для астроцитов. ИЛ-1 стимулирует продукцию ИЛ-2 Т-лимфоцитами, а также повышает экспрессию рецептора для ИЛ-2. ИЛ-1 усиливает пролиферацию В-лимфоцитов, секрецию антител и экспрессию мембранного иммуноглобулинового рецептора. Есть данные, указывающие на участие ИЛ-1 в регенерации печени. Кроме того, ИЛ-1 стимулирует секрецию гепатоцитами сывороточных амилоидов А и Р, С-реактивного белка, гаптоглобина, а, -антитрипсина и церулоплазмина. ИЛ-1 участвует в регуляции температуры тела, а повышенная его продукция приводит к развитию лихорадки.

Известны факторы, снижающие биологическую активность ИЛ-1. К ним прежде всего относятся глюкокортикоиды и простагландины. Из экзогенных факторов следует указать на циклоспорин А. В сыворотке крови лиц, которым был введен эндотоксин, в моче лихорадящих больных, а также в культуральной жидкости моноцитов, активированных in vitro, может быть обнаружен полипептид, специфически снижающий активность ИЛ-1. Из мочи больных моноцитарным лейкозом выделен фактор с молекулярной массой 23 000, идентифицированный как антагонист ИЛ-1Р. ИЛ-1Р II типа могут обнаруживаться в растворимой форме в виде мономера. Такой растворимый ИЛ-IР может связывать ИЛ-1, нейтрализуя его биологическую активность.

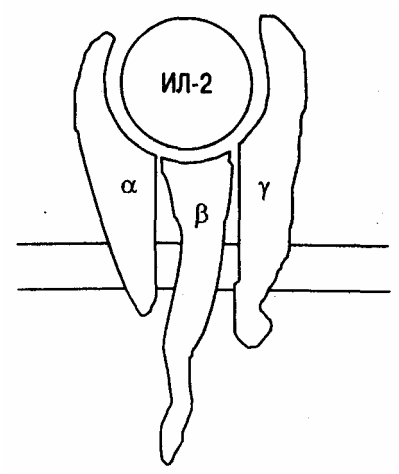


Рис. 12. Строение высокоаффинного рецептора для ИЛ-2.

Для проведения сигнала требуется гетеродимеризация цитоплазматических доменов β- и γ-цепей.

ИЛ-2. Этот цитокин с молекулярной массой 15 000 (25 000 у мышей) также играет исключительно важную роль в реализации механизмов иммунного ответа. Как уже отмечалось, продуцентами ИЛ-2 являются Th1 -клетки. Помимо участия ИЛ-2 в дифференцировке и пролиферации Т-лимфоцитов, этот лимфокин принимает непосредственное участие в реализации механизмов противоопухолевой защиты. Так, ИЛ-2 повышает литическую активность NK-клеток, а также индуцирует клетки системы ЛАК (лимфокинактивированные киллеры). Кроме того, ИЛ-2 индуцирует пролиферацию ЦТЛ. Под действием ИЛ-2 усиливается секреция ИНФγ Т-лимфоцитами.

Рецептор для ИЛ-2 (ИЛ-2Р) состоит из трех полипептидных цепей, которые могут быть экспрессированы как вместе, так и по отдельности (рис. 12). В зависимости от того, из скольких цепей будет составлен рецептор, изменяется его аффинность. Так, при экспрессии только одной α-цепи (молекулярная масса 55 000) рецептор обладает наиболее низкой аффинностью с константой диссоциации (K_d) около 10 нМ. Такой рецептор, обозначаемый иногда как ТАС-антиген, имеет очень небольшую цитоплазматическую часть и после связывания ИЛ-2 не способен проводить сигнал внутрь клетки. При изолированной экспрессии β-цепи (молекулярная масса 75 000) формируется рецептор средней аффинности (K_d около 1 нМ). Такой рецептор при наличии достаточно высоких концентраций ИЛ-2 способен проводить сигнал. Есть основания полагать, что р-цепь экспрессируется вместе с γ-цепью (молекулярная масса 64 000), так как для проведения сигнала требуется гетеродимеризация цитоплазматических доменов β- и γ-цепей. При совместной экспрессии всех трех цепей формируется рецептор высокой аффинности (K_d около 10 пкМ).

Функция ИЛ-2Р может быть заблокирована с помощью фармакологических препаратов. Так, показано, что циклоспорин А подавляет синтез мРНК для а-цепи ИЛ-2Р. Есть данные, указывающие на то, что нецитотоксические дозы алкилирующих препаратов способны избирательно блокировать р-цепь ИЛ-2Р.

ИЛ-3. Этот белок относится к семейству гемопоэтических ростовых факторов (молекулярная масса 15 000 — 28 000), является колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов. ИЛ-3 вместе с эритропоэтином поддерживает рост и дифференцировку клеток эритроидного ростка. В то же время ИЛ-3 способен регулировать раннюю стадию дифференцировки В-лимфоцитов, поддерживает рост пре-В-клеток, а также усиливает секрецию IgG.

ИЛ-4. Этот лимфокин (молекулярная масса 15000—20000) продуцируется Т-клетками (Th2) и является фактором дифференцировки для Т- и В-лимфоцитов. Кроме того, ИЛ-4 служит кофактором пролиферации покоящихся В-лимфоцитов, а также индуцирует в этих клетках синтез IgE и IgG.,. Известна способность ИЛ-4 генерировать активность ЛАК и усиливать противоопухолевую активность макрофагов.

ИЛ-5. Этот димерный белок с молекулярной массой 50 000—60 000 продуцируется Т-клетками (Th2). ИЛ-5 усиливает пролиферацию активированных В-лимфоцитов, а также экспрессию на них рецептора для ИЛ-2 и синтез IgA. В нестимулированных В-клетках ИЛ-5 индуцирует секрецию IgM и IgG. ИЛ-5 является фактором дифференцировки эозинофилов, усиливает их хемотаксис.

ИЛ-6. Этот мономер с молекулярной массой 19 000— 34 000 является фактором дифференцировки В-клеток, способствуя созреванию В-лимфоцитов в антителопродуцирующие клетки. ИЛ-6 индуцирует синтез белков острой фазы, в связи с чем, как и ИЛ-1, и TNF, может быть отнесен к цитокинам воспаления.

Фактор некроза опухолей (TNF). Этот фактор был впервые получен в результате введения мышам бактериальных эндотоксинов. В сыворотке крови было обнаружено вещество, обладающее цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам. TNF представляет собой полипептид с молекулярной массой около 17 000. TNF продуцируют клетки моноцитарно-макрофагальной системы, которые под воздействием бактериальных эндотоксинов активируются и начинают синтезировать TNF, ИЛ-1, ИЛ-6 и вещества прокоагулянтного действия. TNF является мощным модификатором воспалительной и иммунной реакции. Он способен тормозить клеточную пролиферацию, дифференцировку и функции клеток почти всех типов, служит медиатором цитотоксичности. В результате высвобождения TNF повышается проницаемость капилляров, повреждается эндотелий сосудов, возникает внутрисосудистый тромбоз. В настоящее время признано, что TNF играет ведущую роль в патогенезе септического шока.

Интерфероны. Эти белки обладают противовирусной и иммуномодулирующей активностью. В зависимости от происхождения и соответственно строения молекулы интерферона (ИФН) человека делятся на 3 типа: ИФНα, продуцентами которого преимущественно являются макрофаги и В-клетки, ИФНβ, продуцируемый фибробластами, и ИФНγ, который синтезируют главным образом активированные Т-хелперы, относящиеся к субпопуляции Th1. Продукция ИФНγ Т-клетками происходит в результате стимуляции последних Т-клеточными митогенами, антителами против CD3, специфическими вирусными антигенами, а также аллоантигенами МНС.

ИФНγ «придает» клеткам непермиссивность для репликации вируса, проникшего в них путем непосредственного межклеточного транспорта. Кроме того, ИФНγ оказывает необратимое цитотоксическое действие на трансформированные клетки, тогда как его цитостатическое влияние на нормальные клетки обратимо. ИФНγ усиливает цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами, К- и NK-клетками. Одновременно ИФНγ селективно повышает резистентность нормальных клеток к цитопатическим эффектам NK-клеток. За счет ИФНγ возможна индукция цитотоксичности у нормальных макрофагов. Активность ИФНγ в 10—300 раз выше, чем активность ИФНα и ИФНβ.

ИЛ-10. Этот лимфокин (молекулярная масса 17000—21000), продуцируемый Т-клетками (Th2), может рассматриваться как антагонист ряда цитокинов. Так, ИЛ-10 подавляет продукцию ИФНγ Th1-клетками. Кроме того, он тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на антигены и митогены, а также подавляет секрецию активированными моноцитами ИЛ-1р, TNF и ИЛ-6. В то же время ИЛ-10 стимулирует секрецию иммуноглобулинов В-клетками. ИЛ-10 предотвращает апоптоз ИЛ-2 зависимых ЦТЛ, лишенных ИЛ-2.

ИЛ-12 человека состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 40 000 и 35 000, удерживаемых дисульфидной связью. Субъединица р40 гомологична рецептору для ИЛ-6, а субъединица р35 отдаленно напоминает ИЛ-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. ИЛ-12 повышает литическую активность клеток системы ЛАК, а также специфическую цитотоксичность ЦТЛ. ИЛ-12 действует как ростовой фактор при активации Т- и NK-клеток. При этом он действует в качестве индуктора секреции ИФНγ и ингибитора синтеза IgE индуцированного ИЛ-4.

4.3. РЕГУЛЯТОРНЫЕ ИММУНОНЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ СЕТИ

Способность клеток лимфоидных органов продуцировать антитела при отсутствии каких-либо нейроэндокринных регуляторных сигналов (см. главу 1) вовсе не свидетельствует о том, что иммунная система функционирует вне интеграции с другими физиологическими системами. В настоящее время накоплена масса доказательств взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем. На клетках иммунной системы существуют рецепторы к таким гормонам и биологически активным веществам, как кортикостероиды, инсулин, гормон роста, тестостерон, эстрадиол, β-адренергические агенты, ацетилхолин, эндорфины, энкефалины и др. Известно, что интерлейкины в центральной нервной системе могут выполнять функцию нейромедиаторов. Это хорошо показано в отношении ИЛ-1 и, по-видимому, справедливо и в отношении ИЛ-2, ИЛ-3 и ИЛ-6. Так, ИЛ-2 не только продуцируется клетками нервной ткани, но и влияет на пролиферацию и созревание элементов олигодендроглии.

Принято считать, что глюкокортикоиды, андрогены, эстрогены и прогестерон подавляют иммунные реакции, а гормон роста, тироксин и инсулин их стимулируют. В то же время работами последних лет было показано, что направленность действия на иммунные реакции глюкокортикоидных гормонов может зависеть от концентрации последних: высокие концентрации оказывают иммунодепрессивное действие, а низкие — иммуностимулирующее.

Усиление иммунного ответа может быть получено и в результате денервации селезенки, которая, так же как и другие органы иммунной системы, имеет автономную иннервацию и содержит чувствительные нейроны. Хорошо изучено влияние на состояние иммунной системы стресса и циркадных ритмов. Так, сильный стресс может индуцировать состояние транзиторного иммунодефицита. Такое состояние наблюдается у спортсменов-профессионалов на «пике» спортивной формы. При этом показаны снижение активности NK-клеток,

уменьшение показателя CD4/CD8 и содержания IgA в слюне, снижение интенсивности пролиферативного ответа лимфоцитов на антигены и митогены и угнетение функций неспецифического иммунитета.

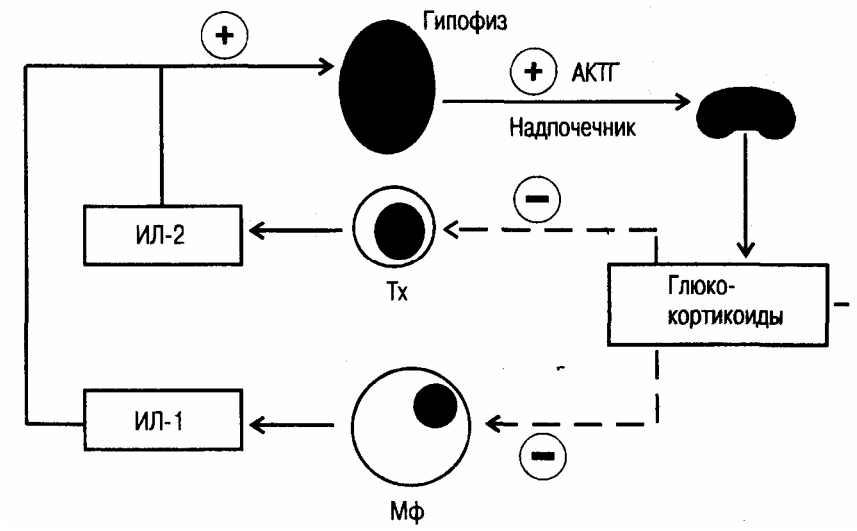


Рис. 13. Пример цепи сетевых взаимодействий между иммунной и нейроэндокринной системами.
МФ — макрофаги, Тх — Т-хелперы.

Аналогичные изменения можно наблюдать у животных в эксперименте при выраженных стрессовых нагрузках. В то же время стрессовые сигналы средней интенсивности (умеренные спортивные нагрузки) повышают резистентность организма к инфекции.

Некоторые цепи сетевых взаимодействий между иммунной и нейроэндокринной системами уже достаточно хорошо изучены. Известно, например, что многие иммунные реакции находятся под контролем гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. При этом показано увеличение синтеза глюкокортикоидов под действием ИЛ-1. В то же время глюкокортикоиды тормозят иммунный ответ, воздействуя, в частности, на продукцию ИЛ-1 и ИЛ-2 (рис. 13).

ГЛАВА 5

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

5.1. ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

Главный комплекс гистосовместимости (МНС) своим названием «обязан» тому обстоятельству, что именно в этом кластере генов содержится информация о белках, ответственных за реакцию отторжения чужеродного трансплантата. Сегодня кажется само собой разумеющимся, что отторжение аллотрансплантата является одной из функций иммунной системы. Однако это не в большей степени очевидно, чем представление о том, что Земля вращается вокруг Солнца, а не наоборот. Было потрачено немало усилий на то, чтобы доказать иммунологическую природу реакции отторжения. Пионерские работы в этом направлении были выполнены П. Медаваром (P. Medawar) в годы второй мировой войны. В этих исследованиях было убедительно показано, что отторжение чужеродного трансплантата кожи подчиняется правилам иммунологической специфичности. Впоследствии аналогичные результаты были получены при трансплантации других тканей, а также опухолей. В отношении последних была показана зависимость реакции отторжения от генетических факторов, что привело генетика Дж. Снелла (G. Snell) к идее создания конгенных линий мышей, т. е. линий, генетически идентичны» по всем, кроме одного, локусам. На коллекции конгенных лини» мышей были разработаны методы, с помощью которых удалось идентифицировать локус, ответственный за отторжение чужеродных тканей. В дальнейшем было показано, что этот локус представляет собой комплекс многих тесно сцепленных между собой генов, каждый из которых имеет множество аллельных вариантов.

Главный комплекс гистосовместимости расположен в хромосоме 17 мыши и в хромосоме 6 человека. Генетическая карта этого комплекса представлена на рис. 14.

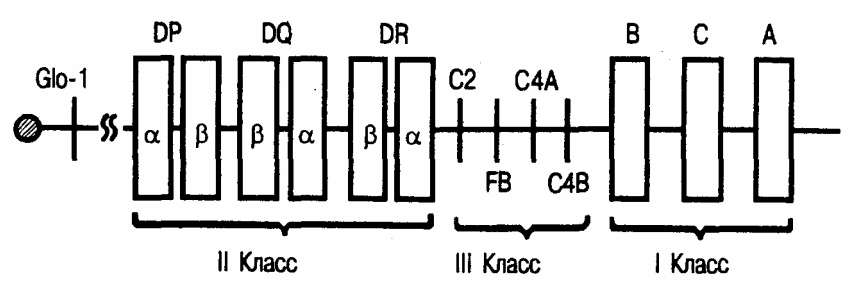


Рис. 14. Генетическая карта главного комплекса гистосовместимости человека.

Молекулы МНС I класса. Эти молекулы представляют собой мембранные гликопротеины, состоящие из одной полипептидной α-цепи с молекулярной массой 45 000. Роль β-субъединицы выполняет нековалентно связанная с а-цепью молекула β_2-микроглобулина с молекулярной массой 12000 (рис. 15). Структурный ген β_2-микроглобулина локализуется вне МНС, в другой хромосоме (у мыши в хромосоме 2). Структурные исследования молекул I класса показали, что а-цепь состоит из трех внеклеточных доменов, гидрофобного трансмембранного участка и короткой цитоплазматической части. Существует множество аллельных вариантов гена, кодирующего а-цепь молекулы I класса, тогда как аллельный полиморфизм у β_2-микроглобулина проявляется лишь в очень слабой степени. В результате различия между отдельными индивидуумами одного и того же биологического вида, обнаруживаемые при изучении антигенов МНС I класса, почти исключительно зависят от полиморфизма α-цепи. У мышей и человека выявлено три локуса, кодирующих высокополиморфные а-цепи молекул МНС I класса. У человека они получили название HLA-A, HLA-B и HLA-C.

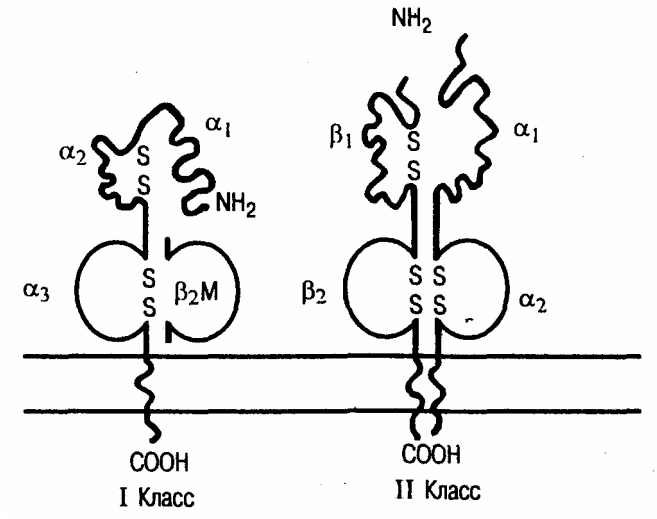


Рис. 15. Строение молекул антигенов главного комплекса гистосовмсстимости I и II классов.

Молекулы МНС II класса. Эти молекулы также являются мембранными гликопротеинами и состоят из двух гомологичных полипептидных цепей с молекулярной массой соответственно 33 000— 35 000 (тяжелая α-цепь) и 27 000—29 000 (легкая β-цепь). Каждая цепь включает два внеклеточных домена, имеющих ограниченную гомологию с соответствующими доменами α-цепи молекул I класса, молекул иммуноглобулинов и β_2-микроглобулинов (см. рис. 15). У человека выявлено три локуса, кодирующих антигены II класса: HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR.

Так же как и у молекул МНС I класса, для антигенов II класса существует множество аллельных вариантов.

Другие продукты генов МНС. Эти молекулы принято также называть белками МНС III класса. Среди них важно отметить три компонента системы комплемента: белки С2 и С4, фактор В.

5.2. ПОЛИМОРФИЗМ АНТИГЕНОВ МНС

По степени генетического полиморфизма антигены МНС превосходят все известные белки. Некоторые локусы МНС представлены в виде многих десятков аллелей. Такая исключительно высокая степень вариабель-

ности напрямую связана с механизмами распознавания «своего» и «чужого». При этом существуют механизмы, поддерживающие аллельное разнообразие антигенов МНС. О наличии таких механизмов свидетельствует факт выраженной гомологии между отдельными крупными генетическими сегментами в пределах МНС. Можно думать, что происходило расширение или сокращение отдельных частей генома за счет дупликаций или делений. Различия в аминокислотных последовательностях между двумя аллелями одного и того же локуса связаны с наличием множественных аминокислотных замен, которые сконцентрированы, однако, в нескольких вариабельных зонах, что несовместимо с представлениями о простых точечных мутациях.

5.3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРИРОДА РАЗНООБРАЗИЯ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ И АНТИТЕЛ

Клетки иммунной системы, экспрессирующие на своей мембране антигенраспознающие рецепторы, способны распознавать практические любые белковые, полисахаридные или гликопротеидные структуры, в том числе и те, которые в живой природе не встречаются, но могут быть получены искусственно. Количество генов, необходимое для обеспечения такого огромного разнообразия антител и рецепторов, соизмеримо с общим числом всех генов организма. Для решения этой, на первый взгляд, неразрешимой проблемы в процессе эволюции возникли специальные молекулярные механизмы, с помощью которых всего около 200 эмбриональных генов Т-рецепторов и 700 генов иммуноглобулинов могут обеспечить возникновение соответственно 8 и 25 млн комбинаций, покрывающих антигенные структуры фактически любого патогенного агента. Однако прежде чем рассмотреть эти механизмы, необходимо вспомнить об общих закономерностях строения гена эукариот.

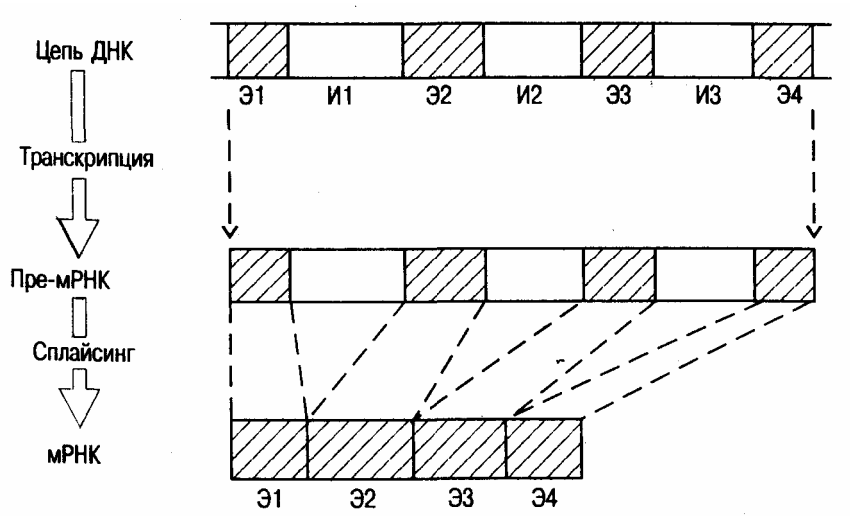


Рис. 16. Передача генетической информации с ДНК, где ген имеет прерывистую (мозаичную) структуру на мРНК. В мРНК генетическая информация записана непрерывно. И — интрон, Э — экзон.

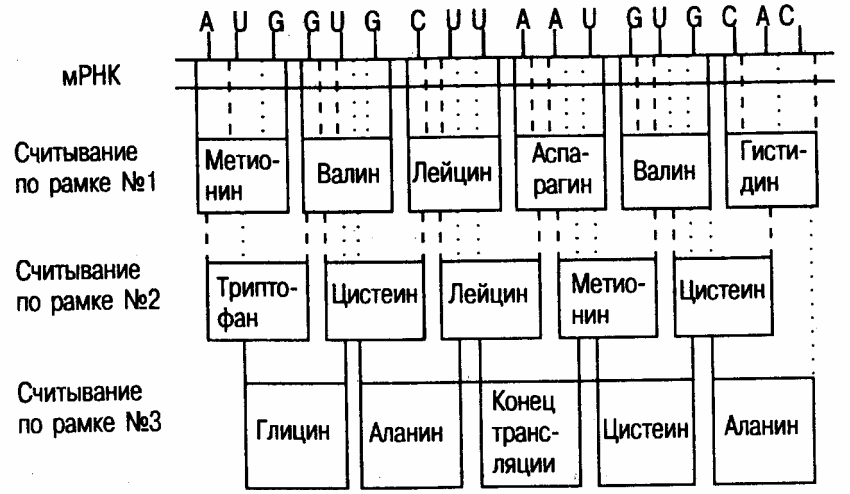


Рис. 17. Возможные последствия сдвига рамки считывания. Интересно, что при варианте №3 считывания появляется терминирующий кодон, сигнализирующий об окончании синтеза белковой цепи.

Сведения из молекулярной генетики. Гены высших организмов (эукариот) в отличие от генов бактерий имеют прерывистую структуру и состоят из копирующихся в мРНК нуклеотидных последовательностей, отделенных одна от другой некодирующими участками. Кодирующие участки называются экзонами, некодирующие — интронами. Синтез белка, кодируемый таким прерывистым геном, включает дополнительный этап — удаление участков, не несущих информации о строении белка. Сначала ген полностью копируется (транскрибируется) в молекулу пре-мРНК с той лишь особенностью, что происходит замена тимина на урацил. Следующий этап, названный сплайсингом, состоит в вырезании интронов и соединении экзонов. Получившаяся в результате молекула мРНК включает только те нуклеотидные последовательности, которые участвуют в кодировании белка, плюс так называемые сигнальные последовательности. Эта молекула, содержащая непрерывную генетическую информацию, в свою очередь транслируется в последовательность аминокислот (рис. 16). Специфическое распознавание границ интронов осуществляется с помощью особых ферментов. Возможны случаи, когда в результате нарушения такого распознавания сплайсинг пре-мРНК происходит не по границам интронов и экзонов, а с некоторым сдвигом. Такую ситуацию называют сдвигом рамки считывания, в результате чего один и тот же участок нуклеиновой кислоты будет кодировать совершенно другой белок (рис. 17).

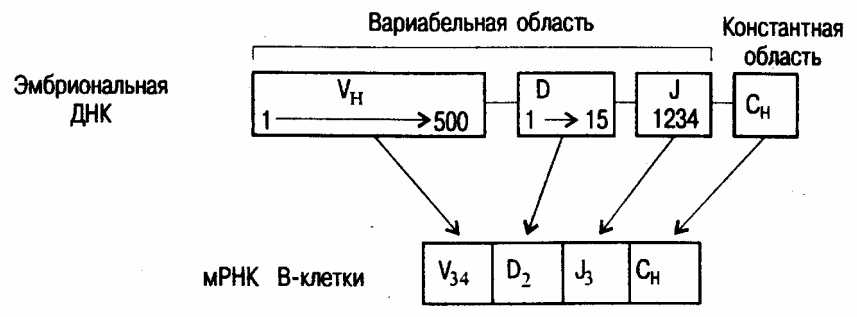


Рис. 18. Перестройка ДНК с образованием гена, кодирующего тяжелую цепь молекулы IgG.

Возникновение разнообразия антигенраспознающих рецепторов.

Долгое время оставался совершенно непонятным процесс синтеза И- и L-цепей иммуноглобулинов, а также α- и β-цепей Т-клеточного рецептора. Было неясно, почему разные молекулы содержат идентичные С- и разные V-районы. Предполагалось, что С- и V-участки кодируются разными генами, однако вопрос о механизмах объединения этих участков в единую полипептидную цепь служил почвой для создания многочисленных гипотез. В 1976 г. группа исследователей под руководством С. Тонегавы показала, что V- и С-гены, кодирующие легкую к-цепь иммуноглобулинов мышиной миеломы, в ДНК миеломных клеток примыкают друг к другу, а в ДНК эмбриональных клеток или сперматозоидов находятся на значительном расстоянии. В дальнейшем было установлено, что на определенном этапе развития между клетками зародышевой линии и зрелым лимфоцитом происходит специфическая перестройка ДНК, в результате которой участки, кодирующие вариабельные и константные области, оказываются расположенными в непосредственной близости друг к другу. Комбинация генов, возникшая после их перегруппировки, устойчиво наследуется всеми дочерними клетками. Такая перестройка на примере синтеза тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина схематически представлена на рис. 18. Следует иметь в виду, что, хотя каждый ген содержит примыкающую к структурной области промоторную последовательность, он не транскрибируется до тех пор, пока не завершилась продуктивная перестройка ДНК. В ходе такой перестройки происходит делеция участка хромосомы, расположенной между объединяемыми V- и J-генами (или V, D и J в случае синтеза тяжелых цепей).

Потери генетического материала в процессе конструирования гена тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина или α- и β-цепей антигенсвязывающего рецептора Т-клетки имеют абсолютно случайный характер. Эти потери происходят в ходе соматической рекомбинации в процессе созревания лимфоцитов, при транскрипции генов в пре-мРНК, а также при сплайсинге. В последнем случае молекула РНК вместе с интронами теряет большую часть «лишних» J-генов (рис.19).

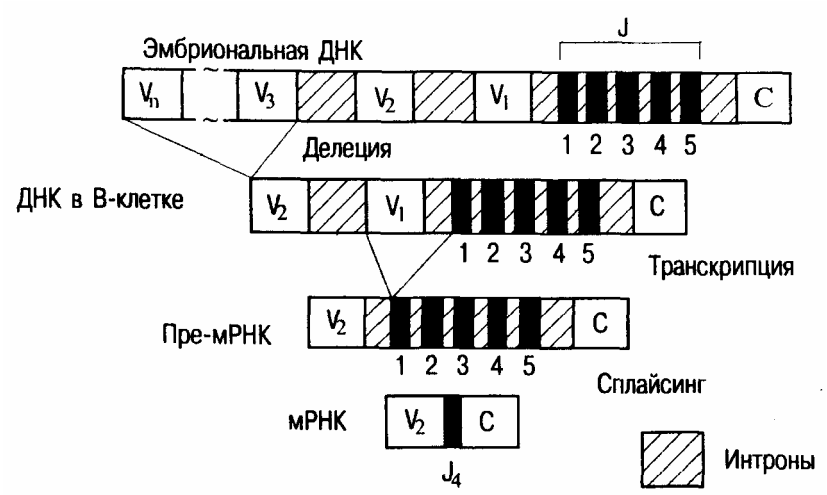


Рис. 19. Упрощенная схема генетического контроля образования к-цепи иммуноглобулина мыщи,

Таким образом, огромное разнообразие антител (Т-клеточных рецепторов) при ограниченном числе генов достигается за счет следующих механизмов.

1. Комбинаторика. Соединение участков V и J, V и D, D и J происходит случайно. При этом число возможных комбинаций может колебаться от 1620—5000 (для α- и β-цепей Т-клеточного рецептора) до $3 \cdot 10^4$ (для тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина).
2. Межцепочечные изменения. При комбинации различных типов цепей (тяжелых и легких, α и β может быть достигнута более высокая степень вариабельности. Например, при соединении одной и той же тяжелой цепи с различными легкими цепями образуются антитела, обладающие неодинаковой специфичностью.
3. Комбинации V×D×J. Происходит встраивание нуклеотидов с 5'-конца D- и J-сегментов, что существенно увеличивает репертуар γ-генов Т-рецепторов.
4. Замена 5'V_H-гена на другой после завершения V_HDJ_H-перестройки. Кроме того, из-за ошибки встраивания в месте присоединения «нового» 5`V_H-гена к соответствующему концевому участку сегмента D может происходить потеря или прибавление оснований. Необходимость такого обмена V_H-генами связана, вероятно, с тем, что на ранней стадии дифференцировки В-клеток в V_HDJ_H-перестройку вовлекаются наиболее близко расположенные V_H- и D-сегменты.
5. Сдвиг рамки считывания. При трансляции мРНК один и тот же D-сегмент может считываться тремя различными способами за счет смещения рамки считывания.
6. Соматические гипермутации. Этот механизм касается только гипервариабельных участков молекул иммуноглобулинов и имеет характер точечных (замена одного нуклеотида) мутаций. Средняя частота мутаций в эукариотических клетках не превышает 0,0001%, а при дифференцировке В-клеток в плазматические клетки или клетки памяти частота достигает 2—4%. Возможно, именно благодаря мутационному механизму вторичный ответ сопровождается продукцией антител более высокой аффинности. Поскольку гены Т-клеточных рецепторов не подвержены соматическим мутациям, можно думать, что указанный механизм имеет «своей целью» тонкую настройку иммунной системы, осуществляемую в процессе антигензависимой дифференцировки В-лимфоцитов.

5.4. ЭВОЛЮЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ЭВОЛЮЦИИ МОЛЕКУЛ СУПЕРСЕМЕЙСТВА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Полагают, что все гены, кодирующие молекулы, которые относятся к суперсемейству иммуноглобулинов, происходят от одного общего предка. Продуктами этих генов-предшественников была древняя система молекул клеточной адгезии, эволюция которой привела к образованию гена, кодирующего домен типа β_2-микроглобулина. Все продукты генов, относящихся к суперсемейству иммуноглобулинов, построены из одного или большего числа таких доменов. Все эти домены имеют высокую степень гомологии, образованы примерно 110 аминокислотными остатками, содержат чередующиеся гидрофобные и гидрофильные участки, образующие антипараллельные β-складчатые участки со вставками разной длины (так называемый иммуноглобулиновый тип укладки). В результате дупликации гена, кодирующего домен такого рода, возник ген мультидоменного белка — древний N-CAM (cell-adhesion molecules).

Дальнейшая эволюция привела к образованию генов, кодирующих рецепторы гормонов, антигены МНС, дифференцировочные антигены, миелиновые белки, антигенсвязывающие рецепторы Т-клеток и иммуноглобулины (рис. 20). В результате перекомбинации экзонов произошло объединение доменов типа фибронектина с доменами типа N-CAM, что привело к возникновению современного семейства молекул клеточной адгезии (N-CAM, I-CAM, Ng-CAM, MAG, контактин). Важной особенностью структуры доменов является их взаимная комплементарность. Иногда вследствие дупликации и дивергенции генов возникали взаимодействующие друг с другом семейства молекул, например Т-клеточные рецепторы и антигены МНС, IgA и поли-IgA-рецептор

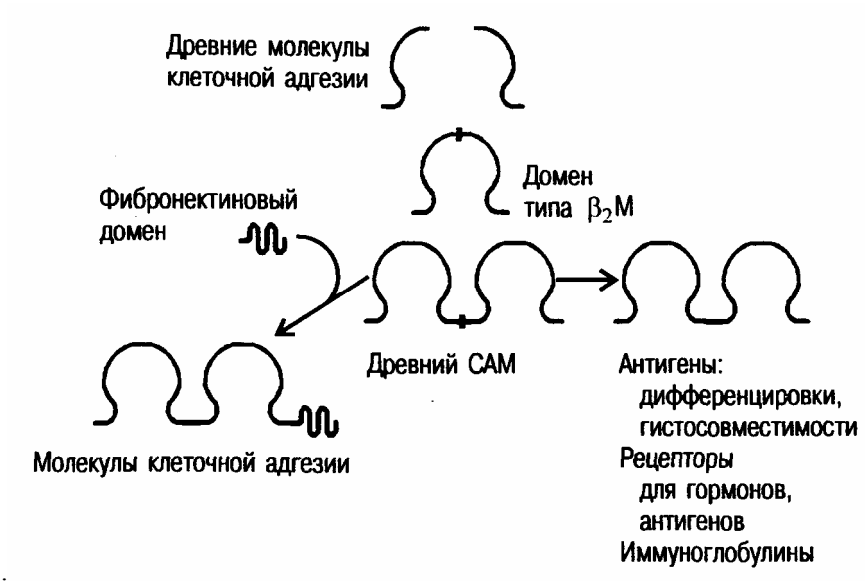


Рис. 20. Эволюция молекул суперсемейства иммуноглобулинов.

Известно, что древняя система молекул клеточной адгезии связана с примитивным узнаванием «своего». Так, у губок сращивание отдельных ветвей возможно только внутри одной колонии, а при сращивании с ветвями другой колонии через 7—9 дней происходит отторжение. В ходе эволюции молекулы этой системы постоянно усложнялись и специализировались, в результате чего процесс распознавания «своего» и «чужого» резко сократился во времени и достиг исключительно высокой степени специфичности.

Исследования, проведенные в области сравнительной иммунологии, позволяют выделить четыре филогенетических уровня развития иммунной системы. К первому относятся одноклеточные эукариоты и примитивные многоклеточные. На этом уровне функционирует древняя система молекул клеточной адгезии, обеспечивающих взаимодействие клеток между собой. Ко второму уровню относятся практически все беспозвоночные, как первично-, так и вторичноротые. Именно на этом уровне формируются домены, входящие в антиген-распознающие структуры. Третий уровень охватывает хордовых, но не включает в себя млекопитающих. Этот уровень характеризуется появлением иммуноглобулинов. Причем у круглоротых, относящихся к подклассу миксин, иммуноглобулины имеют наиболее простую форму, тогда как у миног, составляющих другой подкласс, происходит дивергенция С-домена на C_H- и C_L-домены, в результате чего появляются тяжелые и легкие цепи молекулы иммуноглобулина. У костистых рыб С-домены L-цепи дивергируют на κ- и λ-типы. Различные изотипы Н-цепей обнаруживаются, начиная с двоякодышащих рыб и земноводных. Четвертый филогенетический уровень включает млекопитающих и характеризуется дальнейшей дивергенцией доменов, в результате которой возникают классы и подклассы иммуноглобулинов.

ЧАСТЬ II
КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Клиническая иммунология представляет собой раздел медицины, изучающий патологию человека в контексте нарушения функций иммунной системы. С этих позиций рассматриваются этиология и патогенез заболеваний, а также методы диагностики и лечения. Кроме того, к аспектам данной дисциплины, несомненно,

относятся и нарушения взаимодействий иммунной, нервной и эндокринной систем, причем в эти рамки укладывается патогенез большинства патологических состояний человека.

ГЛАВА 7 ОСНОВЫ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Основными задачами клинической иммунологии являются:

— диагностика врожденной недостаточности иммунной системы, в том числе наследственных дефектов системы комплемента и фагоцитарной функции (первичные иммунодефицита);

— своевременное выявление приобретенных иммунологических дефектов (вторичные иммунодефицита);

— диагностика иммунопатологических проявлений соматической патологии;

— специфическая диагностика аллергии;

— диагностика аутоиммунной патологии;

— диагностика лимфопролиферативных заболеваний;

— подбор пары донор—реципиент при пересадке органов и тканей;

— диагностика дефектов иммунной системы при опухолях и их лечение;

— выявление конкретного иммунологического дефекта и подбор (в том числе в тестах in vitro) способа иммунокоррекции;

— объективизация эффективности иммунокорригирующей терапии и прогноза течения заболевания;

— диагностика и лечение иммунопатологии репродуктивной функции (в том числе «иммунные» формы бесплодия, беременность, лактация), а также нарушений, связанных с климаксом.

Для постановки диагноза иммунопатологического состояния используют следующие приемы:

— сбор иммунологического анамнеза;

— постановка диагностических тестов непосредственно у больного (тесты in vivo);

— постановка иммунологических тестов in vitro.

7.1. СБОР ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ

Сбор иммунологического анамнеза проводят в соответствии с картой иммунологического опроса. В результате опроса следует сразу определить тип наиболее вероятного иммунопатологического синдрома. Как правило, речь идет об одном из следующих 6 синдромов:

— инфекционный синдром;

— аллергический синдром;

— аутоиммунный синдром;

— первичный иммунодефицит (у детей);

— вторичный иммунодефицит;

— иммунопролиферативный синдром.

Инфекционный синдром:

- длительный субфебрилитет, лихорадка неясной этиологии;
- хронические инфекции ЛОР-органов (синуситы, отиты), лимфадениты;
- часто повторяющиеся и хронические бронхиты и пневмонии (в том числе в сочетании с инфекцией ЛОР-органов);
- высокая частота ОРВИ (у взрослых более 4 раз и у детей более 6 раз в год);
- бактериальные инфекции кожи и подкожной клетчатки (пиодермии, фурункулезы, абсцессы, флегмоны, рецидивирующие парапроктиты у взрослых);
- грибковые инфекции кожи, слизистых оболочек и ногтей;
- паразитарные инфекции;

- афтозные стоматиты, заболевания пародонта, кариес;
- рецидивирующие гнойные конъюнктивиты;
- рецидивирующий герпес различной локализации;
- повторные лимфадениты;
- хронические урогенитальные инфекции (хронический гнойный вульвит, уретрит, часто повторяющиеся циститы и пиелонефриты);
- дисбактериоз, хроническая гастроэнтеропатия с диареей неясной этиологии;
- генерализованные инфекции (сепсис).

Аллергический синдром:

- аллергопатология кожи (атонический и контактный дерматит, крапивница, отеки Квинке, феномен Артюса, экзема);
- аллергопатология ЛОР-органов;
- бронхиальная астма, поллиноз, хронический астматический бронхит, гиперчувствительные пневмониты;
- непереносимость пищевых продуктов, лекарств, химических соединений и др.

Аутоиммунный синдром:

- воспалительные заболевания опорно-двигательного аппарата (ревматоидный артрит, синдром Шегрена, синдром Фелти и др.);
- СКВ, дерматомиозит, склеродермия;
- системные васкулиты (гранулематоз Вегенера, узелковый периартериит и др.);
- гломерулонефриты;
- патология щитовидной железы, инсулинзависимый сахарный диабет, болезнь Аддисона и другие гормональные нарушения;
- неврологические заболевания (рассеянный склероз, миастения гравис и др.);
- неспецифический язвенный колит;
- цитопенические болезни крови;
- аутоиммунные заболевания печени;
- аутоиммунные формы бесплодия, патологии беременности, тяжелые формы течения климактерического синдрома;
- некоторые виды психопатологии (шизофрения).

Первичные иммунодефициты (у детей):

- синдром Луи—Барр — атаксия в сочетании с телеангиэктазиями, пятнами гипер- и депигментации;
- синдром Вискотта—Олдрича — геморрагический симптомокомплекс в сочетании с экземой и тромбоцитопенией у мальчиков;
- синдром Ди-Джорджи — судорожный синдром с гипокальциемией, пороками развития лицевого скелета и сердечно-сосудистой системы, гипоплазией тимуса;
- наследственные ангионевротические отеки различной локализации (недостаточность С 1-ингибиторов).

Вторичные иммунодефициты:

- все виды инфекционного синдрома в случае длительного и торпидного к терапии течения, тенденции к генерализации процесса;
- алопеции, де- и гиперпигментации кожи;
- СПИД;
- другие случаи приобретенной иммунной недостаточности.

Лимфопролиферативный синдром:

- опухоли в иммунной системе (лимфолейкозы, лимфосаркомы, болезнь Ходжкина, лимфомы, саркома Капоши);
- Х-сцепленный рецессивный Лимфопролиферативный синдром у детей:

  а) гиперплазия всех групп лимфатических узлов с воспалительными процессами в них в сочетании с частыми бактериальными инфекциями другой локализации;

  б) спленомегалия;

  в) мононуклеоз в анамнезе.

7.2. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ПРОВОДИМЫЕ НЕПОСРЕДСТВЕННО У БОЛЬНОГО (ТЕСТЫ IN VIVO)

Тесты этой группы включают кожные тесты (капельные уколочные и др.), провокационные пробы (эндоназальные, полоскательный тест, ингаляционные тесты) и элиминационные пробы.

Наибольшее распространение получили кожные тесты. Следует помнить, что проведение тестов in vivo всегда имеет ряд противопоказаний, особенно у детей. К таким противопоказаниям прежде всего относятся: 1) обострение аллергического заболевания; 2) острые инфекции; 3) обострение или декомпенсация заболеваний эндокринного аппарата, сердечно-сосудистой системы, печени, почек; 4) злокачественные опухоли; 5) психические и неврологические заболевания; 6) длительная терапия глюкокортикостероидами или иммунодепрессантами; 7) анафилактический шок в анамнезе; 8) беременность.

Следует помнить и о вероятности ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Первые могут возникнуть при повышенной чувствительности к механическому раздражению и компонентам разводящей жидкости или при наличии перекрестных реакций. Получение ложноотрицательного результата может быть связано с нарушением техники постановки проб, отсутствием или истощением реагинов в коже, предшествующим приемом антимедиаторных препаратов, если есть аллергия другого типа.

Иногда применяют холодовую пробу (прикладывание кусочков льда), тепловую пробу (прикладывание грелки с температурой 40—42°С), а также кратковременную локальную инсоляцию (при подозрении на фотодерматиты).

7.3. ОСНОВНЫЕ ТЕСТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

Все существующие в настоящее время лабораторные иммунологические тесты, согласно классификации, предложенной кафедрой иммунологии Российского медицинского университета, могут быть разделены на тесты I и II уровня.

Тесты I уровня (ориентирующие) включают:

— подсчет общего числа лимфоцитов (абсолютное и относительное содержание в периферической крови);

— определение количества Т- и В-лимфоцитов;

— оценка фагоцитарной активности нейтрофилов;

— определение основных классов сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG);

— определение титра комплемента (не всегда).

После анализа результатов тестов I уровня определяют тактику дальнейшего исследования иммунного статуса. Тесты II уровня в отличие от тестов I уровня ставят избирательно в зависимости от того, какие цели преследует проводимое иммунологическое обследование.

Тесты II уровня могут включать:

— определение Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций ($CD4^+$, $CD8^+$);

— определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК);

— постановка реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ);

— определение специфических IgE;

— НСТ, а также любые другие исследования состояния иммунной системы.

Особое значение имеет клиническая интерпретация получаемых результатов. К. А. Лебедев и И. Д. Понякина разработали весьма полезные общие правила, которых целесообразно придерживаться при интерпретации иммунограмм:

1) комплексный анализ иммунограммы более информативен, чем оценка каждого показателя в отдельности;

2) полноценный клинический анализ иммунограммы можно проводить лишь в комплексе с оценкой клинической картины и данных анамнеза;

3) реальную информацию об изменении иммунограммы несут лишь сильные сдвиги показателей (±20—40% от нормы и более);

4) анализ иммунограмм в динамике (особенно в сопоставлении с клинической динамикой) более информативен с точки зрения как диагностики, так и прогноза течения заболевания;

5) для диагностической и прогностической оценки иммунограммы важнейшее значение имеют индивидуальные показатели нормы у данного больного (особенно с учетом возраста и наличия сопутствующих и хронических заболеваний);

6) первостепенную практическую значимость при оценке иммунограммы имеют соотношения показателей иммунограммы, а не их абсолютное значение;

7) при оценке показателей иммунограммы следует прежде всего исключить возможность их колебаний в связи с приемом пищи, физическими нагрузками, чувством страха, временем суток.

7.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

Как правило, исследование лимфоцитов в лаборатории включает этап выделения фракции мононуклеарных лейкоцитов из периферической крови. С этой целью используют метод градиентного центрифугирования. Кровь больного (кровь берут из вены в раствор гепарина) разводят в 2 раза забуференным изотоническим раствором натрия хлорида, не содержащим ионов Mg и Ca, и осторожно наслаивают на раствор фикола. В последний для увеличения его плотности добавляют рентгеноконтрастный препарат для внутривенного введения (например, верографин, гипак, триозил и др.). В результате между плазмой и раствором фикола образуется ступенчатый градиент плотности. После центрифугирования эритроциты и гранулоциты проходят сквозь фикол и оседают на дно, а мононуклеары (лимфоциты и моноциты) остаются в виде кольца в интерфазе. Клетки собирают пипеткой, отмывают, переносят в культуральную среду и исследуют с помощью различных методов.

Все методы исследования лимфоцитов можно разделить на изучение поверхностных маркеров и функциональные тесты. В 1983 г. Первое международное рабочее совещание по антигенам дифференцировки лейкоцитов ввело в практику клинической иммунологии термин «clusters of differentiation» (кластеры дифференцировки, сокращено CD), а в 1989 г. Четвертое совещание приняло рабочую номенклатуру (табл. 6).

Таблица 6. Дифференцировочные антигены лимфоцитов человека

CD-маркер	Определяемый тип клеток
CD1	1) тимоциты (кортикального слоя) 2) белые отростчатые эпидермоциты (клетки Лангерганса)
CD2	1)Е-РОК 2) Т-лимфоциты 3) NK-клетки
CD3	1) зрелые Т-лимфоциты 2) рецептор для антигена на Т-клетках
CD4	1) Т-хелперы/индукторы 2) моноциты
CD5	Т- и В-лимфоциты
CD6	Зрелые Т-лимфоциты
CD7	1) Т-лимфоциты 2) тимоциты 3) NK-клетки (часть)
CD8	1) Т-супрессоры/киллеры 2) NK-клетки (часть)
CD16	NK-клетки
CD19	Незрелые и зрелые В-лимфоциты

CD20	Зрелые В-клетки
CD22 CD23	1) В-клетки миндалин 2) 70% В-клеток крови
CDw40	В-клетки зародышевых центров
CD38	В-клетки, активированные В-клетки

7.4.1. Методы, основанные на изучении поверхностных маркеров

В настоящее время для идентификации поверхностных структур лимфоцитов и ряда других клеток в основном используют 3 группы методов: 1) розеткообразование; 2) методы иммунофлюоресценции; 3) иммуноферментные методы.

Наиболее дешевым и в то же время достаточно точным методом определения численности популяции Т-лимфоцитов является метод розеткообразования. Метод основан на наличии сродства между рецептором CD2 и гликопротеинами мембраны эритроцита барана. При смешивании лимфоцитов с эритроцитами барана образуются фигуры, получившие название розеток. Количество таких розеткообразующих клеток (Е-РОК) соответствует количеству Т-лимфоцитов, для которых характерна экспрессия на поверхности CD2-антигена.

Другая модификация метода розеткообразования (ЕАС-розетки) используется для идентификации В-клеток. Известно, что на поверхности В-лимфоцитов имеется рецептор для С3-компонента комплемента. Для выявления этого рецептора лимфоциты смешивают с эритроцитами быка, последовательно обработанными антиэритроцитарными антителами в субагглютинирующей концентрации и комплементом (свежезамороженной сывороткой крови мыши). Использование такого источника комплемента гарантирует защиту эритроцитов от комплементзависимого лизиса. После совместной инкубации В-клетки образуют фигуры розеток.

Более прогрессивным является использование метода иммунофлюоресценции, который позволяет с помощью наборов моноклональных антител к различным CD-антигенам идентифицировать практически любые поверхностные структуры лимфоцитов.

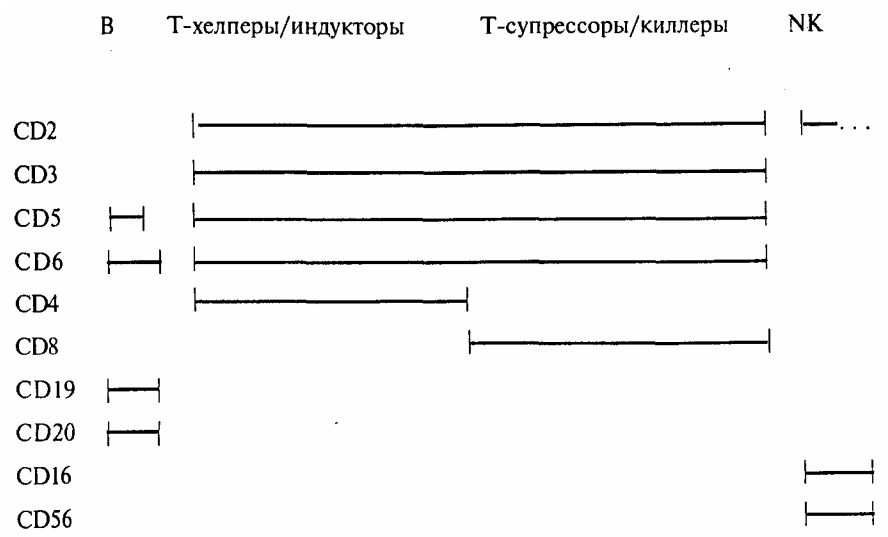
Различают метод прямой и непрямой иммунофлюоресценции. Первый состоит в использовании анти-CD-моноклональных антител, к которым присоединена флюоресцентная метка. Чаще применяют флюоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), дающий в ультрафиолетовых лучах зеленоватое свечение. При наблюдении в люминесцентном микроскопе клеток, обработанных мечеными антителами, можно видеть характерные светящиеся ободки, указывающие на то, что на поверхности данной клетки экспрессированы соответствующие дифференцировочные антигены. Метод непрямой иммунофлюоресценции предполагает использование немеченых моноклональных антител. Визуализация реакции осуществляется с помо щью вторых антител (например, козьи антитела против иммуноглобулина мыши, если моноклональные антитела были получены на основе мышиной гибридомы), несущих флюоресцентную метку.

Применение иммуноферментного метода, когда ко вторым проявляющимся антителам вместо ФИТЦ присоединяется пероксидазная метка, особенно удобно для небольших иммунологических лабораторий, так как не требует дорогих люминесцентных микроскопов. Цветную реакцию, возникающую при взаимодействии фермент-субстрат, можно наблюдать в обычный световой микроскоп.

Универсальным методом исследования лейкоцитов является метод лазерной проточной цитофлюориметрии, который позволяет не только получить детальные характеристики клеточных субпопуляций, но производить их препаративное разделение. Прежде всего на основе анализа светорассеивания (без применения антител) в исследуемом образце можно определить содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. Используя метод иммунофлюоресценции (прямой или непрямой), можно определить численность различных субпопуляций лимфоцитов. Помимо регистрации свечения, возможна оценка его интенсивности. Обработка полученных данных по специальной программе позволяет определить количество сайтов связывания, т. е. вычислить плотность данного рецептора на клеточной мембране. За ограниченный отрезок времени можно произвести большое число анализов.

На схеме 1 в наглядной форме представлена выявляемость различных дифференцировочных антигенов на поверхности лимфоидных клеток.

Схема 1. Дифференцировочные антигены человека, определяемые с помощью моноклональных антител в системе CD



В табл. 7 и 8 представлены возрастные показатели Т- и В-клеточного звеньев иммунитета. Помимо определения численности популяций и субпопуляций, важное значение придается вычислению показателя CD4/CD8 — так называемого хелперно-супрессорного отношения (норма для Москвы 2,44±0,22). Клиническое значение этого показателя отчасти становится ясным из данных, приведенных в табл.9.

Определение соотношения лимфоцитов с хелперной и супрессорной функциями допустимо производить в теофиллиновом тесте. Принцип метода заключается в том, что в присутствии теофиллина Т-лимфоциты с супрессорной функцией теряют способность к Е-розеткообразованию. Такие клетки получили название теофиллинчувствительных (ТЧ). Так называемые теофиллинрезистентные (ТР) клетки в значительном проценте случаев содержали субпопуляцию Т-лимфоцитов с хелперной активностью. Показатель ТР/ТЧ в норме составляет 2,5—3,5.

Иногда для оценки численности субпопуляций лимфоцитов используют определение Т-лимфоцитов с рецепторами для Fc-фрагмента IgM (Тμ) и с рецепторами для Fc-фрагмента IgG (Ту). А. А. Ярилин показал, что ТР-розеткообразующие клетки (РОК) на 86% представлены Тμ-лимфоцитами и обладают хелперной активностью, а ТЧ-РОК на 91% представлены Ту-лимфоцитами и обладают преимущественно супрессорной функцией. В то же время среди Тц-клеток 69% является $CD4^+$ и 97% — ТР-РОК. Среди Тμ-лимфоцитов 95% клеток составляют ТЧ-РОК и только 30% из них являются $CD8^+$

Таблица 9. Клинические примеры нарушения хелперно-супрессорного индекса (Тх/Тс)

Снижение индекса	Увеличение индекса
СКВ с поражением почек	Ревматоидный артрит
Острая цитомегаловирусная инфекция	Диабет I типа (инсулинзависимый)
СПИД	СКВ без поражения почек
Герпес	Первичный билиарный цирроз
Инфекция вирусом Эпштейна—Барр (инфекционный мононуклеоз)	Атопический дерматит Псориаз
Инсоляция или длительная экспозиция ультрафиолетовыми лучами	Хронический аутоиммунный гепатит
Новорожденность	
Состояние после пересадки костного мозга	

Таким образом, не существует единого совершенного способа оценки числа лимфоцитов с супрессорной или хелперной активностью, поскольку часть CD8+-клеток является киллерами, а часть $CD4^+$ — эффекторами. Вот почему оценку численности субпопуляций лимфоцитов желательно дополнять функциональными тестами.

7.4.2. Исследование функционального состояния лимфоцитов

Существует большое число методов, позволяющих исследовать in vitro различные функции лимфоидных клеток. В частности, в клинических иммунологических лабораториях исследуют интенсивность пролиферативного ответа лимфоцитов на Т- и В-клеточные митогены, продукцию антител, а также синтез мононуклеарами периферической крови ряда цитокинов.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Известны вещества, оказывающие на лимфоциты млекопитающих митогенное действие (табл. 10). Чаще для оценки функционального состояния Т-лимфоцитов в клинической лабораторной практике используют фитогемагглютинин (ФГА) — растительный лектин, получаемый из семян фасоли. Обычно мононуклеарные лейкоциты, выделенные из периферической крови методом градиентного центрифугирования, культивируют в присутствии ФГА в течение 72 ч. Результаты реакции можно учитывать либо морфологическим методом, либо по включению радиоактивной метки.

В первом случае из клеточной культуры готовят мазки, фиксируют их в метаноле и окрашивают по Романовскому—Гимзе так же, как мазки крови. В световом микроскопе с иммерсионной системой определяют процент бластов по отношению к общему количеству лимфоцитов. Результат может быть выражен также в виде индекса стимуляции (ИС), представляющего собой отношение процента трансформированных клеток в опыте (культура с ФГА) к проценту трансформированных клеток в контроле (культура без ФГА).

Т а б л и ц а 10. Некоторые неспецифические митогены лимфоцитов

Митоген	Происхождение	Мишень
ФГА	Phaseolus vulgaris	Т-лимфоциты
Кон А	Canavalia ensiformis	»
Митоген лаконоса МА(PWM)	Phytolacca americana	В-лимфоциты в присутствии Т-клеток
ЛПС грамположительных бактерии	E. coli, S. typhi, N. meningitidis и др.	В-лимфоциты

Учет результатов по включению радиоактивной метки более удобен. Этот метод позволяет уменьшить количество крови для исследования, а также сократить расход питательных сред и трудозатраты. Культивирование проводят не в пробирках или флаконах, а в 96-луночных планшетах с объемом лунки около 200 мкл. В каждую лунку достаточно внести 50000 клеток, что в пересчете на цельную кровь составляет 0,05 мл. За 4—6 ч до окончания культивирования в лунки вносят ^{3}Н-тимидин. Далее с помощью специального прибора (клеточного харвестера) клетки переносят на стеклянные фильтры, избыток метки смывают большим количеством воды, фильтры высушивают и помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью. Уровень включения метки оценивают на сцинтилляционном спектрофотометре. Результаты выражают в импульсах в минуту или в виде индекса стимуляции (отношение уровня включения метки в культуре с ФГА к уровню включения метки клетками, культивировавшимися без ФГА).

В зависимости от качества использованных реактивов, а также от условий культивирования интенсивность стимуляции лимфоцитов может быть различной. Так, при культивировании клеток в пробирках в среде 199 интенсивность включения метки, как правило, бывает ниже, чем при культивировании в пластиковых планшетах в среде RPMI-1640. Большое значение имеет качество сыворотки, используемой в качестве добавки к питательной среде. Обычно с этой целью используют эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), гетерологическую сыворотку крови человека (пул от нескольких доноров) или донорскую лошадиную сыворотку. Как правило, сыворотки обладают более или менее выраженной самостоятельной митогенной активностью. В результате интенсивность пролиферации клеток в контрольных лунках также может колебаться.

Наилучшими считают сывороточные препараты, обладающие минимальным митогенным действием, но вызывающим высокий уровень пролиферации при культивировании клеток в присутствии ФГА. Препараты с такими свойствами удается получить далеко не всем клиническим лабораториям. Вот почему врачу необходимо выяснить в лаборатории, в которой проводился анализ, какую интенсивность стимуляции в ответ на ФГА следует считать нормальной, а также в каких пределах может колебаться индекс стимуляции.

Клиническое значение РБТЛ. При оценке результатов РБТЛ следует обращать внимание как на интенсивность пролиферативного ответа стимулированной культуры, так и на высоту ответа в контрольных лунках. Снижение пролиферативного ответа на ФГА свидетельствует о наличии иммунодефицита, однако механизмы последнего могут быть различны.

Низкий ответ в РБТЛ может коррелировать с дефицитом Т-клеток в периферической крови или с изменением показателя CD4/CD8 в пользу клеток-супрессоров. В некоторых случаях (например, в период восстановления после облучения или интенсивной химиотерапии) низкий ответ на Т-клеточные митогены может быть связан с выбросом в периферическую кровь большого количества незрелых Т-клеток. Низкий ответ в РБТЛ может быть также обусловлен нарушением продукции таких лимфокинов, как ИЛ-1 и ИЛ-2. При активации Т-

клеток (в случае инфекции или наличия аутоиммунных реакций) возможно повышение спонтанной пролиферации (высоты пролиферативного ответа в контрольных лунках).

Оценка интенсивности продукции цитокинов. С помощью тестов этой группы можно получить представление о продукции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Следует иметь в виду, что одни цитокины продуцируются преимущественно лимфоцитами (ИЛ-2, ИЛ-6), а другие — моноцитами (ИЛ-1, TNFα); продукцию первых стимулируют Т-клеточные митогены (ФГА, Кон А), продукцию вторых — микробные липополисахариды (ЛПС).

Исследование проводят по следующей схеме. Мононуклеары периферической крови, выделенные методом градиентного центрифугирования, культивируют в 24-луночных культуральных планшетах (объем лунки около 2 мл) в течение 16—18 ч в присутствии Кон А, ФГА или ЛПС. Над осадочную жидкость собирают и определяют в ней содержание цитокина. Для определения содержания цитокинов используют либо иммуноферментный анализ, либо цитокинзависимые клеточные линии.

В продаже имеются иммуноферментные наборы для определения таких цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF, ИНФγ. К сожалению, такие наборы пока довольно дороги. Существует коллекция цитокинзависимых клеточных линий, на которых также возможно определение содержания цитокинов в биологических жидкостях и культуральной среде. В большинстве случаев принцип определения основан на том, что клеточная линия способна размножаться только в присутствии определенного цитокина, например ИЛ-2 (линия CTLL-2) или ИЛ-6 (D6C8). Интенсивность пролиферации клеток линии в присутствии разных разведении исследуемого образца сравнивают с интенсивностью пролиферации клеток той же линии в присутствии различных разведении рекомбинантного цитокина с известной активностью. Математическое сравнение полученных титровочных кривых позволяет вычислить содержание цитокина в исследуемом образце. В некоторых случаях (например, при определении содержания TNF) используют не цитокинзависимую, а цитокинчувствительную клеточную линию (L929). Клетки этой линии гибнут в присутствии TNF. Таким образом, титровочная кривая будет отражать процент погибших клеток, которых будет тем больше, чем выше концентрация TNF.

7.4.3. Оценка гиперчувствительности замедленного типа

Для оценки гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) используют реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), которая по своей сути является пробирочным аналогом клеточных иммунных реакций ГЗТ. В качестве веществ, модулирующих (тормозящих или активирующих) спонтанную миграционную активность лейкоцитов, применяют те же митогены, что и при РБТЛ. Кроме того, могут быть использованы тканевые и микробные антигены, стандартные аллергены. Последние применяют при диагностике саркоидоза, туберкулеза, альвеолитов и других заболеваний, протекающих с образованием эпителиоидно-клеточных гранулем (тканевое выражение ГЗТ).

Анализируемые клетки помещают в стеклянные капилляры, которые инкубируют в чашках Петри с культуральной средой с добавлением или без добавления (спонтанный уровень миграции) митогена либо антигена. Сравнение интенсивности миграции в опытной и контрольной чашках позволяет вычислить индекс миграции.

7.5. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФАГОЦИТОВ

Наиболее доступным объектом для оценки функционального состояния фагоцитов ^являются нейтрофилы крови. Одни тесты предполагают изучение этих клеток в цельной крови, тогда как другие (исследование рецепторов нейтрофилов, определение активных форм кислорода — АФК) требуют получения обогащенной взвеси нейтрофилов. Оценку активности Fc- и С3-рецепторов нейтрофилов можно проводить с помощью реакции розеткообразования с зимозаном, нагруженным соответственно анти-Рс-антителами или комплементом при 4°С. Этот прием позволяет определить долю нейтрофилов, способных к адгезии объекта фагоцитоза.

Саму фагоцитарную активность оценивают с помощью методов, позволяющих определить долю клеток, способных формировать фагосому (частицы латекса, эритроциты, тест-культуры стафилококка или E.coli). Известен прием постановки in vitro фагоцитарной реакции с нейтрофилами больного и выделенного у него. же штаммами микроорганизмов. Этот прием наиболее адекватен для реальной оценки антимикробной активности нейтрофилов данного больного.

«Переваривающую» способность нейтрофилов и их антибактериальную активность можно определить непосредственно методом фагоцитоза с перевариванием тестируемого микроорганизма. В последние годы большое распространение получили методы оценки АФК в НСТ-тесте или с помощью хемолюминесценции. НСТ-тест используют значительно чаще, так как существуют экспресс-методы, проводимые с применением цельной крови. Суть реакции состоит в том, что нитросиний тетразолий (НСТ) окрашивается в синий цвет в

присутствии АФК, а в отсутствие АФК остается бесцветным. Подсчет нейтрофилов с гранулами и включениями синего цвета позволяет определить долю нейтрофилов с АФК.

Миграционную активность фагоцитов оценивают в тестах РТМЛ и направленного хемотаксиса. Те же приемы можно использовать и при исследовании альвеолярных макрофагов, полученных из бронхиальных смывов.

7.6. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ И АНТИГЕНОВ

Методы определения антител и антигенов основаны на различных способах регистрации их взаимодействия. С некоторой степенью условности их можно разделить на 3 группы:

— методы, основанные на реакции преципитации;

— методы, основанные на реакции агглютинации;

— методы, основанные на использовании меченых антител или антигенов.

Методы, основанные на реакции преципитации. За счет мультивалентности антител и антигена при их смешивании образуется так называемая решетка, которая может содержать антиген и антитела в разных пропорциях. На основе реакции преципитации разработаны различные количественные методы.

Двойная диффузия в агаре по Оухтерлони. В лунки, вырезанные в агаровом или агарозном геле, помещают антиген и антисыворотку, которые диффундируют навстречу друг другу. В том участке геля, где их соотношения эквивалентны, образуется видимый преципитат. Если анализу подвергается смесь антигенов, то образуется несколько линий преципитации. Если соседние лунки содержат один и тот же антиген, то линии преципитации сливаются. Если антигены разные, то образуется либо так называемая шпора, что свидетельствует о частичном родстве антигенов, либо, в случае неродственных антигенов, линии преципитации будут пересекаться.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини. Этот метод отличается более высокой чувствительностью, чем предыдущий, так как антисыворотка входит в состав агара, в который из лунки диффундирует антиген. По мере удаления от лунки концентрация антигена постепенно падает, пока не становится эквивалентной концентрации антител в агаре. При этом образуется хорошо различимое кольцо преципитации. Чем выше концентрация внесенного антигена, тем больше диаметр кольца. Если в реакции используется несколько стандартов с известной концентрацией антигена, то путем сравнения или постройки калибровочной кривой можно проводить количественное определение антигена в образцах.

Метод широко используется для определения концентрации иммуноглобулинов, С3-комплемента компонента, С-реактивного белка, а-фетопротеина, трансферрина. В Москве фирмой «Реафарм» выпускаются стационарные иммунодиффузионные планшеты для определения содержания иммуноглобулинов различных классов в крови или других биологических жидкостях. В табл. 11—13 приведены нормы показателей для этого метода.

Таблица 11. Концентрация иммуноглобулинов (г/л) взрослого человека в сыворотке крови в норме («Реафарм»)

Иммуноглобулин	Диапазон колебаний концентрации
IgG	8—20
IgA	0,9—4,5
IgM	0,6—2,5

Таблица 12. Концентрация иммуноглобулинов (г/л) в различных биологических жидкостях в норме («Реафарм»)

Иммуноглобулин	Цереброспинальная жидкость	Моча	Спермальная жидкость
IgG	1,0-4,0	0,4—0,8	140—330
IgA	1,5-6	0,15—0,25	1—60
IgM	<1,0	0	0

Таблица 13. Концентрация иммуноглобулинов (г/л) в сыворотке крови детей в возрасте до 14 лет («Реафарм»)

Возраст	IgG	IgA	IgM
Новорожденные	7,5—15,0	<0,06	0,11—0,35
1—3 мес	2,7—7,8	0,06—0;58	0,12—0,87
4—6 мес	1,9—8,6	0,1—0,96	0,25—1,2
7—12 мес	3,5—11,8	0,36—1,65	0,36—1,04
1—2 года	5,2—10,8	0,36—1,65	0,72—1,6
3—6 лет	6,5—14,1	0,83—2,17	0,55—2,1
7—9 лет	7,6—13,3	1,08—2,0	0,55—1,6
9—13 лет	7,7—15,1	1,08—3,25	0,7—1,5

Иммуноэлектрофорез. Иммуноэлектрофорез представляет собой сочетание электрофореза с иммунопреципитацией. Существуют различные варианты иммуноэлектрофореза. Если электрофоретической разгонке подвергают антиген, то после снятия напряжения вдоль направления движения антигена в электрическом поле в геле вырезают канавку, в которую заливают антисыворотку. С помощью данного метода путем анализа образовавшейся дуги преципитации в клинической иммунологии полуколичественно определяют концентрацию иммуноглобулинов различных классов и идентифицируют миеломные белки.

Для определения антигенов, мигрирующих в сторону положительно заряженного электрода, может применяться встречный Иммуноэлектрофорез. Этот метод высокочувствителен и занимает относительно мало времени. Его используют для идентификации антигенов вирусного гепатита В, антител к ДНК при СКВ, антител к Aspergillus при бронхолегочном аспергиллезе, антител к N. Meningitidis.

Для количественного определения концентрации некоторых белков (альбумина, трансферрина, церулоплазмина) применяют ракетный Иммуноэлектрофорез. При этом препарат, содержащий антиген, вносят в различных разведениях в серию последовательных лунок в геле, содержащем антисыворотку. После электрофоретической разгонки образуются дуги преципитации, напоминающие по своей форме ракету. С уменьшением концентрации антигена будет соответственно уменьшаться и длина дуг.

Для разделения сложной смеси антигенов используют двухмерный (перекрестный) электрофорез. Метод включает два этапа. На первом этапе белки диффундируют под влиянием электрического поля в агарозном геле, содержащем антитела. На втором этапе пластину поворачивают на 90° и подвергают повторной разгонке в направлении, перпендикулярном первому. Таким образом удается количественно охарактеризовать каждый из антигенов смеси. Этот метод, в частности, применяют для оценки степени конверсии С3 в инактивированную форму С3с в сыворотке крови больных СКВ или синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом.

Методы, основанные на реакции агглютинации. Взаимодействие антител с клетками или другими крупными частицами приводит к склеиванию (агглютинации) в хорошо различимые агломераты. Прямая агглютинация чаще используется для определения серотипов бактерий или для определения групп крови. Применяется также метод непрямой (пассивной) агглютинации, когда на основе эритроцитов готовят диагностикум. С этой целью, как правило, используют эритроциты, нагруженные антигеном после модификации их поверхности танином или хлорным хромом. Существуют и другие методы связывания поверхности эритроцитов с антигеном.

Реакцию обычно проводят в пластиковых планшетах, требующих сравнительно небольших количеств реагентов. Реакцию гемагглютинации часто используют для определения в сыворотке крови титров противомикробных антител и различных аутоантител.

Методы, основанные на использовании меченых реагентов. В настоящее время разработано много методов, предусматривающих применение меченых антител и антигенов. Чаще с этой целью используют радиоактивную или ферментную метку.

Радиоиммунологические методы. В качестве метки чаще применяют радионуклиды йода (^{131}I или ^{125}I). Для определения антигенов обычно используют классический радиоиммунологический анализ (РИА). Метод основан на уменьшении связывания антителами радиоактивно меченного антигена за счет добавления немеченого антигена. Содержание последнего определяют по степени уменьшения такого связывания. Метод позволяет выявлять очень низкие концентрации антигена (до 10^{-12} г/мл).

Метод часто используют для определения антигенов вируса гепатита, а также таких низкомолекулярных белков, как, например, гормоны. Применяют также так называемые твердофазные методы. Для определения антител антиген сорбируют на пластике (обычно в пробирках или лунках микропанели), затем, после связывания с антителами, избыток последних удаляют и добавляют радиоактивно меченные антииммуноглобулины, полученные от животного другого вида. Этот метод весьма эффективен при диагностике аллергии. Аллерген, иммобилизованный на сорбенте, инкубируют с сывороткой крови больного, после чего добавляют радиоактивно меченные анти-IgE-антитела.

Метод иммунного окрашивания после переноса на нитроцеллюлозные мембраны (иммуноблоттинг по Вестерну). Этот метод применяется для количественного определения белков и гликопротеинов, которые после электрофоретического разделения в полиакриламидном геле переносят на микропористую нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифически связанные с мембраной антигены обрабатывают моноклональными антителами, связывание которых проявляют с помощью радиоактивно меченных анти-Ig-антител. Визуализацию реакции осуществляют с помощью радиоавтографических отпечатков.

Иммуноферментные методы. Иммуноферментные методы в силу своей безопасности и высокой чувствительности постепенно вытесняют радиоиммунологические методы. Кроме того, реагенты, к которым присоединен фермент, обычно весьма стабильны и допускают более длительное хранение (радиоактивную метку приходится возобновлять из-за распада радионуклида).

Чаще используют пероксидазу и фосфатазу, которые при добавлении к реагирующим компонентам соответствующего субстрата образуют окрашенные продукты. В случае определения антител антигены иммобилизуют на поверхности лунок пластиковых панелей. К ним добавляют исследуемую сыворотку. Связывание антител с антигеном определяют на втором этапе, инкубируя образовавшийся комплекс с меченными ферментом анти-Ig-антителами (так называ емые вторые антитела). Далее, после промывки, добавляют раствор субстрата, который, вступая в реакцию с ферментом, дает окрашивание. Интенсивность окрашивания будет зависеть от количества ферментной метки (чем больше свяжется меченых антител, тем ярче окрашивание). Результаты учитывают фотометрически,

В настоящее время выпускается большое количество разнообразных иммуноферментных диагностических наборов как для определения антител в сыворотке или других биологических жидкостях, так и для определения антигенов. В качестве последних могут выступать возбудители различных заболеваний (микробы, вирусы), а также различные белки, определение содержания которых в крови или секретах представляет диагностический интерес (аутоантитела, факторы неспецифической защиты, гормоны, цитокины, белки острой фазы и др.).

7.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТА

В клинической практике невозможно обходиться без определения содержания комплемента и его компонентов в сыворотке крови. Это касается как вариантов патологии со сниженной антивностью комплемента, так и случаев повышения его активности.

Таблица 14. Заболевания, для которых характерно изменение содержания комплемента

Снижение	Увеличение
СКВ с поражением почек	Обструктивная желтуха
Острый гломерулонефрит	Тиреоидит Хашимото
Сывороточная болезнь	Острая ревматическая лихорадка
Иммунокомплексные заболевания	Ревматоидный артрит
Цирроз печени	Узелковый периартериит
Комбинированные иммунодефициты	Дерматомиозит
Септический эндокардит с гломерулонефритом	Острый инфаркт миокарда Язвенный колит
Рецидивирующие ангионевротические отеки Пароксизмальная холодовая гемоглоби-нурия	Тифозная лихорадка Диабет I типа Синдром Рейтера
Миастения Гравис	Подагра
Вирусный гепатит с поражением суставов	
Смешанная криоглобулинемия	
Лимфома	

Таблица 15. Возможные причины изменения некоторых показателей иммунограммы по Б. М. Пухлику (1992)

Показатель	Направленность изменения (+ увеличение; — уменьшение)	Клинические причины
Фагоцитарная активность лейкоцитов (ФАЛ)	+	Острые бактериальные инфекции
НСТ-тест		Первичные иммунодефициты, хронические заболевания, аутоиммунные и аллергические заболевания, вирусные инфекции, СПИД
Число лейкоцитов, нейтрофилов и ФАЛ	+	Инфекции, хирургические вмешательства, отторжение трансплантата, кровопотери, роды, ожоги, острая лучевая болезнь
Лимфоциты		Сепсис, авитаминозы, голодание, аутоиммунные лейкопении, лейкопенический лейкоз
	+	Инволюция инфекции, паротит, коклюш, лимфобластоз, мононуклеоз инфекционный, хроническая лучевая болезнь
Бактерицидная активность сыворотки		Острая лучевая болезнь, СПИД, лейкопенический лимфолейкоз, хронические инфекции
Титр комплемента		Иммунодефициты, онкопатология, СКВ (особенно С 1,С4)
	+	Острые пневмонии, аутоиммунные расстройства, саркоидоз
IgA		Хронические заболевания (особенно респираторного и желудочно-кишечного тракта), нагноения, бронхиальная астма (особенно S-IgA); туберкулез, опухоли, болезнь тяжелых α-цепей, иммунодефициты
	+	Инфекции (острое воспаление), саркоидоз, аллергическая бронхиальная астма (при дефиците S-IgA), аутоиммунные заболевания с локализацией в легких и кишечнике, IgA-нефропатия
IgM		Иммунодефициты (первичные и вторичные)
	+	Бронхиальная астма, инфекции (острое или обострения), аутоиммунные заболевания, особенно ревматоидный артрит
IgG	—	Иммунодефициты (первичные и вторичные)
	+	Аллергии, аутоиммунные заболевания, иммунодефициты
Т-лимфоциты	+	Лимфопролиферативные заболевания, ГЗТ, реконвалесценция,туберкулез
		Бактериальные хронические инфекции, иммунодефициты, аллергозы, опухоли, туберкулез, стресс, травма, ожоги, кровоизлияния, инфаркт
Т($CD4^+$)	+	Инфекции, аллергия, аутоиммунные заболевания
		СПИД, цитомегаловирусная инфекция
	+	Саркоидоз, инфекции, ГЗТ
Т (CD8+)	—	Вирусные инфекции иммунной системы, аллергия, аутоиммунные заболевания, рев

		Матизм
В-лимфоциты	+	Инфекции, СПИД, аутоиммунные и аллергические заболевания, лимфолейкозы, миеломная болезнь
	—	Иммунодефициты, опухоли

Общую активность комплемента определяют в гемолитической системе, включающей эритроциты барана и специфические антиэритроцитарные антитела. Исследуемый образец сыворотки сравнивают с референс-препаратом, представляющим собой пул сывороток крови здоровых лиц с известной комплементарной активностью. Интенсивность лизиса оценивают спектрофотометрически через различные промежутки времени. На основании полученной кривой определяют время 50% гемолиза (CH_{50}).

Помимо определения общей гемолитической активности комплемента, с помощью радиальной иммунодиффузии по Манчини (см. выше) определяют концентрацию отдельных компонентов комплемента (чаще С3 и С4). В табл. 14 перечислены некоторые заболевания, для которых характерно изменение содержания комплемента в периферической крови.

В заключение целесообразно привести сводную таблицу вероятных причин нарушения некоторых показателей иммунограммы, составленную Б.М.Пухликом (табл. 15).

ГЛАВА 14
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

Существуют разнообразные способы модуляции иммунных реакций. Эти способы условно можно разделить на методы иммуностимуляции и иммунодепрессии, причем воздействие на иммунную систему может осуществляться на разных уровнях. Стратегия вмешательства в деятельность иммунной системы в первую очередь зависит от того иммунологического дефекта, который нуждается в коррекции. Так, в некоторых случаях иммунной недостаточности возможно проведение заместительной терапии, например, путем введения γ-глобулина или гормонов тимуса. Существуют и более радикальные способы лечения иммунной недостаточности, самым сложным из которых является пересадка костного мозга. Однако «в чистом виде» заместительная терапия применяется достаточно редко. Чаще усилия врача направлены -на то, чтобы усилить либо подавить те или иные иммунные реакции. С этой целью могут применяться как разнообразные лекарственные препараты, обладающие иммунотропной активностью, так и немедикаментозные методы воздействия.

Существует большая группа лекарственных препаратов, относящихся к группе иммуностимуляторов или иммунокорректоров. Другая группа лекарственных веществ традиционно относится к разряду иммунодепрессантов. Кроме того, принято выделять противовоспалительные препараты, экстракорпоральные методы иммунокоррекции.

Большинство иммунотропных препаратов подробно описано в фармацевтических справочниках, однако при их назначении больному целесообразно придерживаться некоторых общих правил.

1. Решение о назначении иммунокорррригирующей терапии должно основываться как на наличии клинических симптомов иммунодефицита, так и на результатах лабораторных исследований, свидетельствующих о существовании выраженной и/или длительно «персистирующей» иммунной недостаточности.

2. Проведение иммунокоррекции требует обязательного динамического наблюдения за состоянием иммунного статуса больного (не реже чем раз в 2 нед) даже при положительном клиническом эффекте.

3. Необходимо строгое соблюдение рекомендуемых схем и дозировок. Отступление от общепринятых схем должно быть четко аргументировано.

Следует иметь в виду, что многие иммунотропные препараты могут обладать разнонаправленным (амбивалентным) действием на иммунную систему. Направленность действия иммуномодулирующего агента (супрессия или стимуляция) может зависеть как от дозы препарата, так и исходного состояния иммунной системы больного.

14.1. ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ ПРЕПАРАТЫ

К препаратам, обладающим преимущественно иммуностимулирующей активностью, прежде всего относятся гормоны тимуса и их синтетические аналоги. При использовании препаратов этой группы, помимо лабораторных исследований иммунного статуса больного, необходимо проводить предварительный индивидуальный подбор препаратов в тестах in vitro с клетками крови больного. Кроме тимомиметиков, иммуностимулирующее действие показано для левамизола (декариса), цитокинов, препаратов адамантанового ряда, некоторых солей, а также ряда природных соединений, полиэлектролитов.

Возможные схемы применения иммунотропных препаратов представлены в табл. 38.

Таблица 38. Ориентировочные схемы применения иммунокорригирующих средств (по М. Д. Машковскому и Б. М. Пухлику)

Препарат	Способ введения	Схема для взрослых	Суточная доза для детей
Стимуляторы Т-лимфоцитов			
Тактивин	Подкожно после 16.00	1,0—0,1% (100 мкг)1 1 раз в сутки в течение 5 дней (или по дням 1—2—3—5—7)	50 мкг
Тималин	Внутримышечно после 16.00	По 5—20 мг 1 раз в сутки в течение 3—10 дней	До 1 года — 1 мг, 1—3 года — 1—2мг
Тимоген	1. Внутримышечно после 16.00	1,0—0,01% (100 мг) 1 раз в сутки в течение 3—10 дней	50 мг
	2. Местно (нос, глаза, горло)	До 1 мл в сутки	50 мг
Тимоптин	Подкожно после 16.00	По 100 мкг в день *4*—5 инъекций с 4-дневным интервалом	
Вилозен	Местно (в нос, ингаляции)	По 20 мг в день в течение 1*4*—20 дней	После 7 лет 10 мг в день
Декарис	Per os	По 150 мг 1—2 раза в неделю (или через день) до 1 мес	50мг
Диуцифон	Per os	По 100 мг (1 табл.) 3 раза в день в течение 3 дней, через 3—4 дня повторить (до 20 табл. на курс)	
Нуклеинат натрия	Per os	По 200 мг 2 раза в день, до 1 мес (обычно 2— 3 нед)	200—300 мг
Цинка ацетат	Per os	По 10 мг 2 раза в день, до 1 мес	5 мг
Спленин	Внутримышечно	По 2 мл ежедневно в течение 10 дней	—
Стимуляторы В-лимфоцитов			
Миелопид	Подкожно	По 3—6 мг ежедневно в течение 3—5 дней или 1 раз в день 3 раза в неделю (не более 5)	У детей не применяют. Противопоказан беременным
Продигиозан	Внутримышечно	1 раз каждые *4*—7 дней, начиная с 0,2 мл (0,005%.). При каждой инъекции доза увеличивается на 0,1 мл. Всего 3—6 инъекций	0,1—0,4мл
Пирогенал	Внутримышечно	0,5 мл (100 МПД) 1 раз в день через день или через 2—3 дня (3—10 инъекций на курс)	0,25 мл
Стимуляторы фагоцитоза			
Нуклеинат натрия	См. выше		—
Метилурацил (стимулирует также Т- и В-лимфоциты)	1. Per os	По 500 мг 3—4 раза в день (30—40 дней)	До 1 года — 50 мг, 1—3 года — 100 мг, 3—8 лет — 250 мг, старше 8 лет — 250—500 мг
	2. Местно	В виде мазей, клизм, примочек	
Стимуляторы эндогенного интерферона			
Дибазол	Per os	По 20 мг 3 раза в день или по 20 мг 1 раз в день для профилактики ОРВИ	До 1 года — 1 мг, 1—3 года — 2 мг, после 3 лет — 10—20мг
Арбинол	Peros	По 200 мг 3 раза в день 5—7 дней	1—3 года— 25 мг, 3—7

			лет— 50 мг, 7— 14 лет— 100мг

Применение стимуляторов различных звеньев иммунной системы требует не только серьезных оснований, но и индивидуального подбора препаратов in vitro, например, по способности влиять на Е-розеткообразование. В случае, когда это невозможно, следует ориентироваться на известный механизм действия препарата, но в любом случае при стабильных нарушениях иммунного статуса.

Кроме перечисленных в табл. 38 иммунокорректоров, следует отметить ряд новых лекарственных средств, таких как иммуноглобулины для внутривенного введения. Интраглобулин Ф, сандоглобулин и их отечественные аналоги представляют собой нормальный IgG для внутривенного введения. Они показаны для заместительной терапии при врожденных и приобретенных дефицитах синтеза антител, профилактики и лечения инфекций, при хроническом лимфолейкозе, синдроме Кавасаки. Для заместительной терапии и стимуляции фагоцитов используются пентаглобулин (препарат IgM) и его аналоги.

Следует помнить, что применение этих препаратов предусматривает соблюдение строгих показаний и противопоказаний, а также особую осторожность, поскольку возможны повышение температуры тела, боли в спине, появление зуда, аллергии и др.

Синтезированы препараты цитокинов — препараты интерферона (роферон), интерлейкинов (ИЛ-1 и ИЛ-2) и их комбинаций в виде лейкинферона, колониестимулирующего фактора (лейкомакс, или молграмостин). Эти препараты существенно влияют на нормализацию иммунного статуса, хотя их применение дает ряд нежелательных побочных эффектов, аналогичных таковым от препаратов иммуноглобулинов. Кроме того, для стимуляции противомикробного иммунитета используют препараты на основе микробных гликопротеинов (гликопин) и рибосом (рибомунил), которые повышают фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, активируют синтез ИНФα, ИЛ-1, ИЛ-6 и продукцию IgA, нормализуют соотношение Т- и В-лимфоцитов.

С теми же целями хорошего местного эффекта удается достичь при использовании препаратов на основе лизатов микроорганизмов: имудон — таблетки для местного применения в ротовой полости при парадонтозе, гингивитах, стоматитах и др.; IRS-19 — для ингаляций при инфекциях ЛОР-органов и др.

Кроме вышеперечисленных препаратов, применяемых в целях коррекции иммунной недостаточности, используют вещества, обладающие адъювантным действием. К ним относятся гидроокись алюминия, алюмокалиевые квасцы, компоненты бактериальной клетки (эндотоксины, липополисахариды, протеин А), поликатионы, полианионы, производные поливинилпирролидона. Указанные вещества в основном применяются в качестве компонентов вакцин для усиления иммунного ответа на слабые антигены за счет стимуляции фагоцитоза и поликлональной стимуляции Т- и В-лимфоцитов.

К корректорам иммунитета следует отнести иммунофан, созданный в Институте эпидемиологии РАМН. Он обладает иммунорегулирующим, гепатопротективным и детоксицирующим действием, нормализует свободнорадикальные реакции. Весьма перспективен синтетический препарат — полиоксидоний (Институт иммунологии МЗ РФ). Полиоксидоний обладает иммуномодулирующим, мембраностабилизирующим и детоксицирующим действием, механизм действия — стимуляция фагоцитоза и антителообразования. Препарат назначают взрослым подкожно или внутримышечно по 6—12 мг 1 раз в 3 дня курсом 5—10 инъекций, детям по 3 мг.

Безусловно, определенным иммуностимулирующим действием обладают так называемые биогенные стимуляторы (адаптогены), широко применяемые при гипотрофических и атрофйческих процессах, для лечения ожогов, переломов, язв и т. д. К этой группе препаратов относятся экстракт алоэ, биосед, ФиБС, взвесь плаценты, сок каланхоэ, румалон, стекловидное тело, а также препараты женьшеня, пантокрина, элеутерококка, радиолы розовой, чабреца, чаги.

Все перечисленные иммуностимулирующие препараты противопоказаны при аутоиммунных заболеваниях, аллергиях, глаукоме, беременности, иммунофан и полиоксидоний — только при беременности.