

Патологии иммунитета

Дуданова О.П. – зав.кафедрой
пропедевтики внутренних
болезней и гигиены д.м.н.
профессор
71-46-84

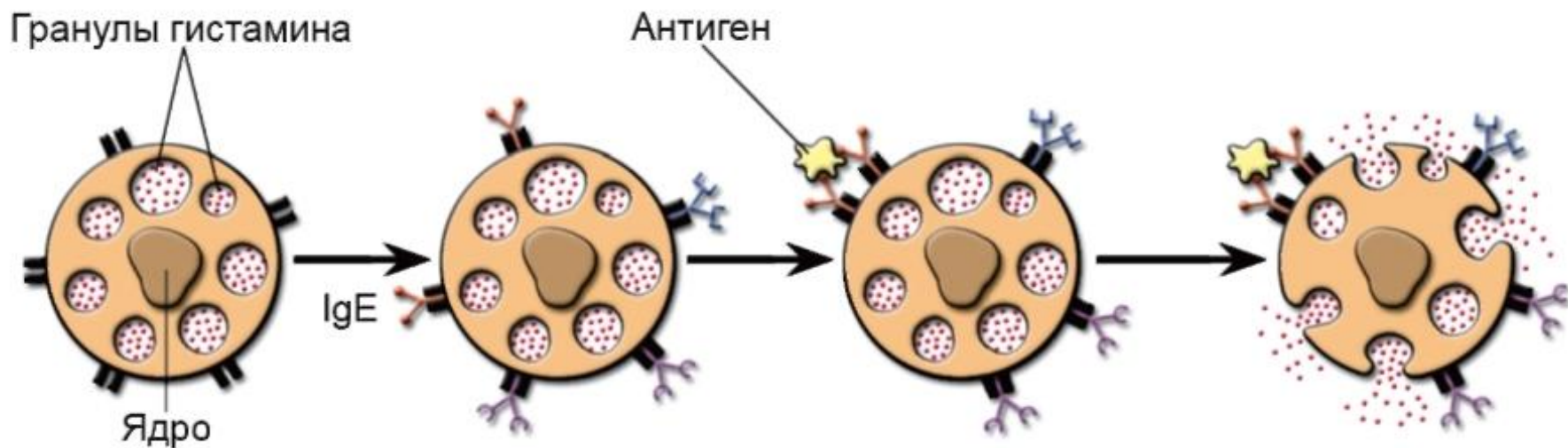
Классификация реакций гиперчувствительности (P. Gell и R. Coombs, 1969)

- I тип - гиперчувствительность немедленного типа
- II- цитотоксическая гиперчувствительность
- III- иммунореактивная
- IV- гиперчувствительность замедленного типа

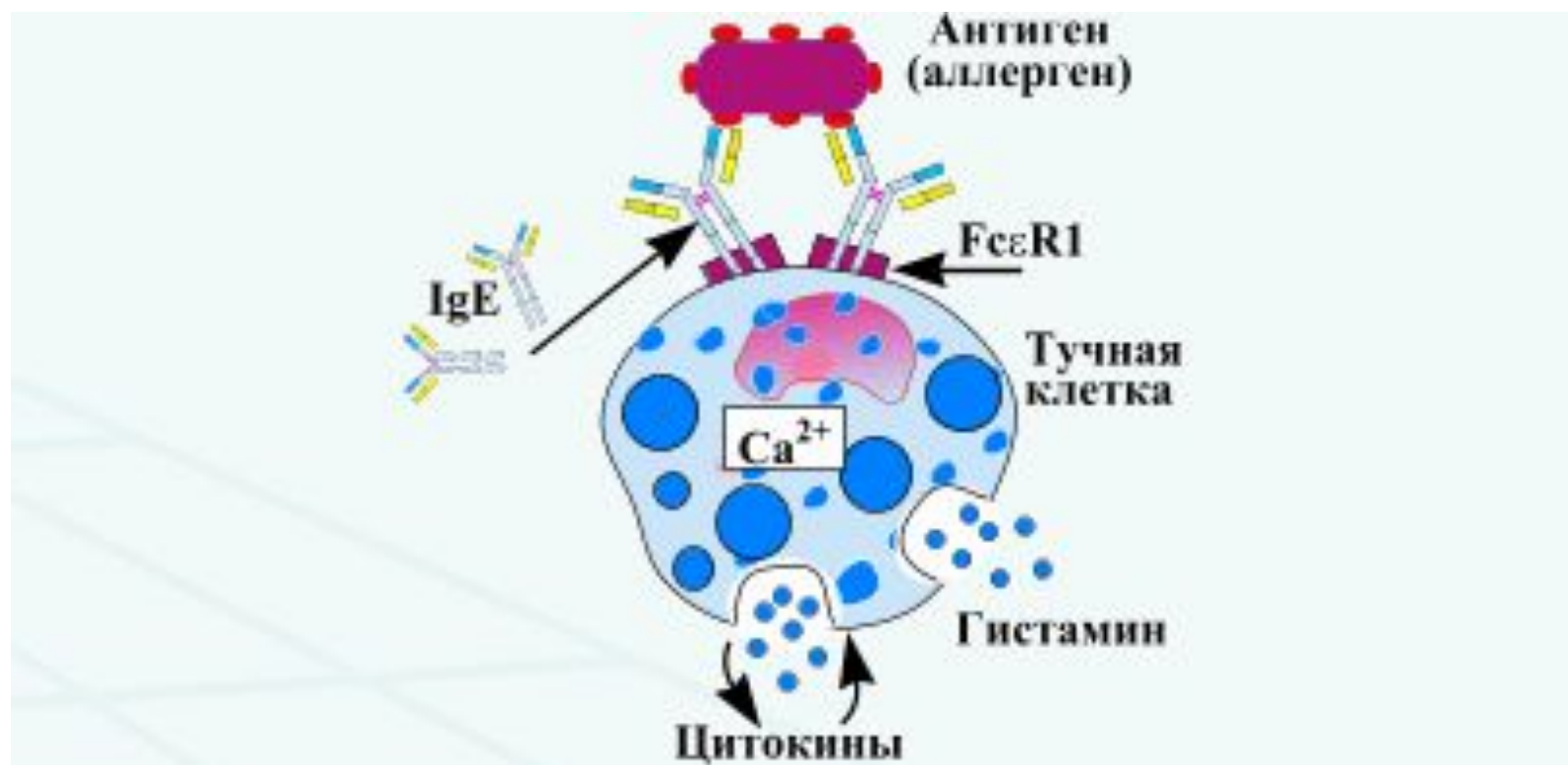
Гиперчувствительность немедленного типа (ГЧНТ)

- В ответ на аллерген синтезируются IgE (и IgG4)
- IgE фиксируются на FcR тучных клеток, базофилов
- При повторном поступлении аллерген связывается с IgE-антителами
- Происходит дегрануляция тучных клеток и базофилов и выброс биологически активных соединений (гепарин, гистамин, лейкотриены, хемокины..)
- Привлечение в очаг эозинофилов

Дегрануляция тучных клеток



ГЧНТ I типа



Причины развития ГЧНТ

- Генетические нарушения иммунорегуляции в сторону Th2- доминирования
 - наличие источников IL-4 (индуктора Th2-ответа)
 - особенности дендритных клеток
 - особенности переключения изотипов Ig на IgE
- Путь поступления антигена (через слизистые)

Патофизиологические эффекты

- сокращением гладкой мускулатуры кишечника, бронхов, мочевого пузыря
- активацией секреторных, эндотелиальных и некоторых других клеток
- бронхоспазм,
- вазодилатация, отек
- падение давления

Клинические проявления ГЧНТ

- Клинические проявления зависят от пути проникновения алларгена:
 - Ингаляционный – ринит, синусит, бронхиальная астма
 - Парентеральный – анафилактический шок
 - Энтеральный – энтеропатия (диарея)

Клинические проявления ГЧНТ

- Атопические заболевания:
 - Бронхиальная астма
 - Поллиноз
 - Атопический дерматит
- Анафилаксия
 - Анафилактический шок
 - Отек Квинке
 - крапивница

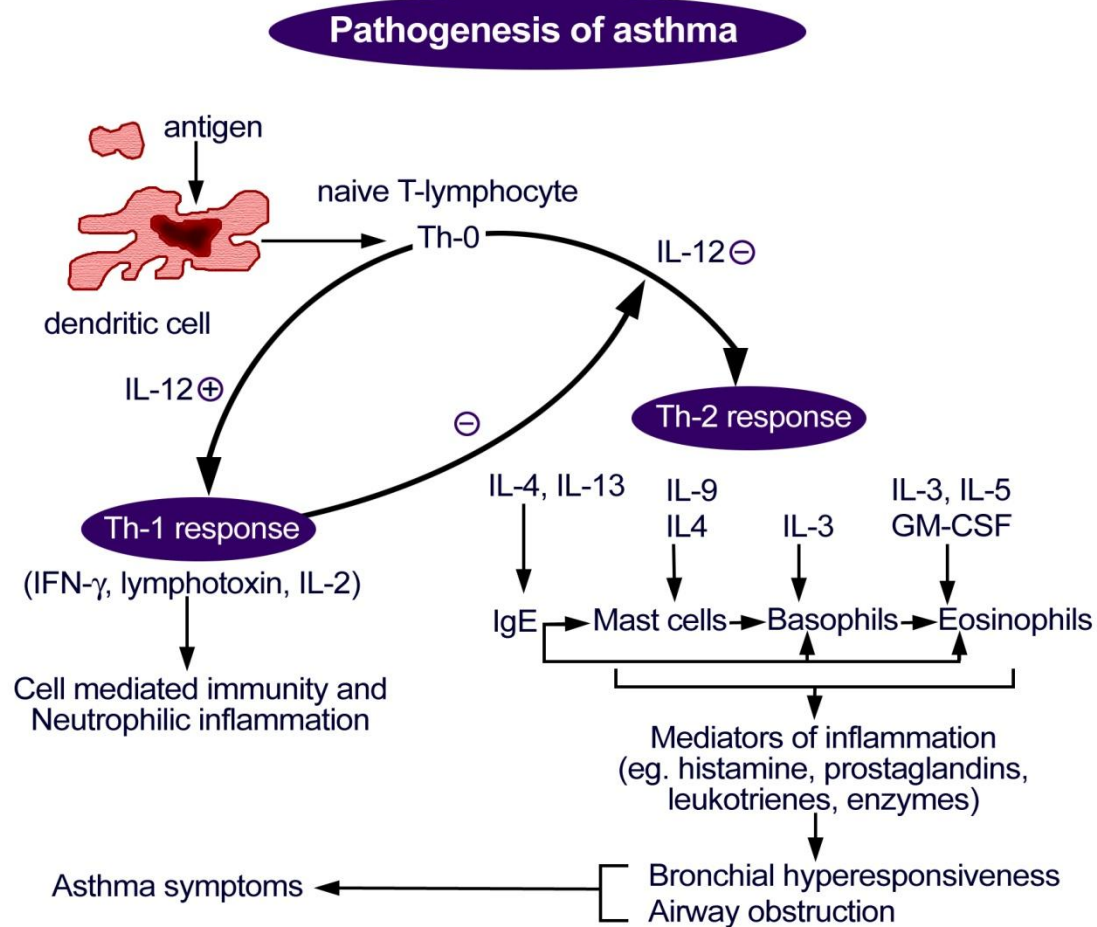
Аллергены

- **Ингаляционные аллергены** - бытовая и производственная пыль, клещи домашней пыли, пыльца растений, эпидермис и шерсть животных, эпидермис и волосы человека, продукты химического производства, частицы тел насекомых, споры непатогенных микроскопических грибов
- **Пищевые аллергены** - белок куриного яйца и коровьего молока, пищевые злаки, рыба и морепродукты, пищевые злаки, бобовые, орехи, овощи и фрукты ..., некоторые пищевые добавки - консерванты, красители, эмульгаторы

Аллергены

- **Парентеральные** - лекарственные средства, сыворотки, вакцины, яд и слюна насекомых - комаров, клопов, мошек и др.

Патогенез астмы



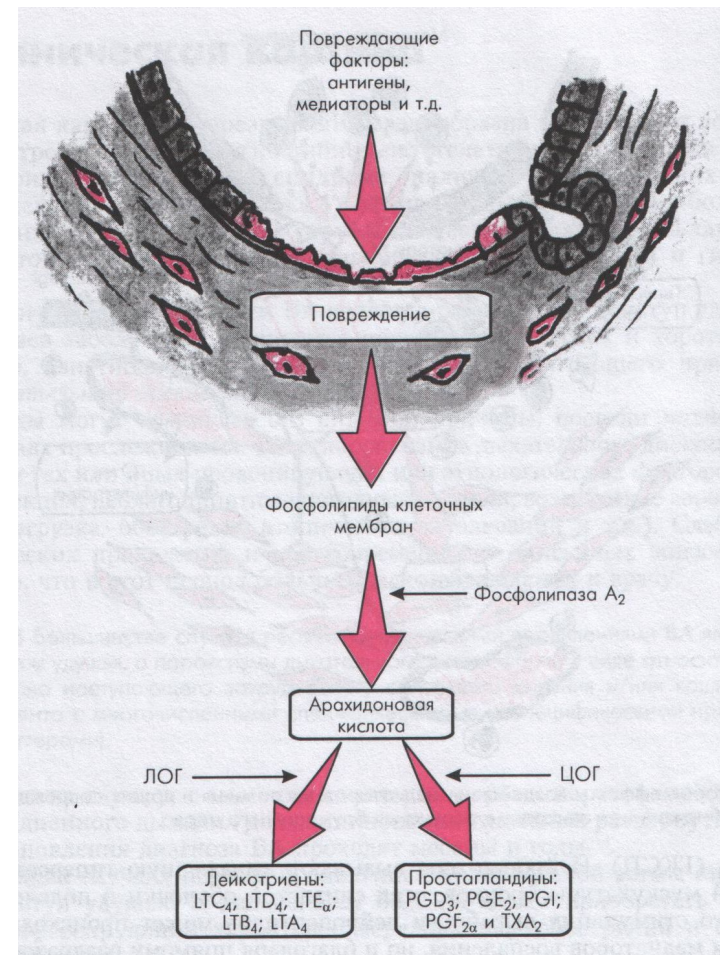
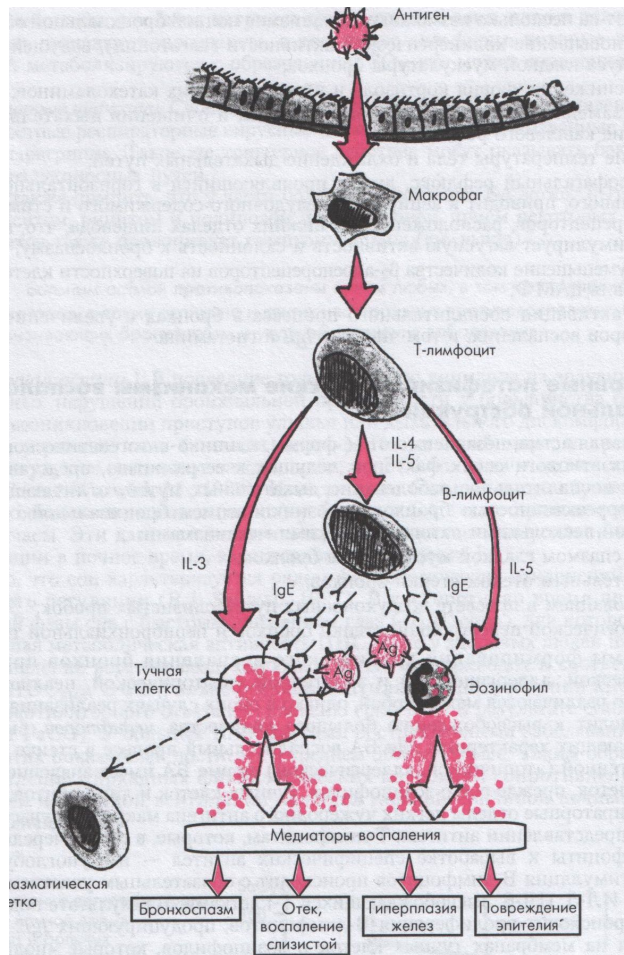
Патофизиология БА

- Ранняя астматическая реакция опосредуется гистамином, простагландинами, лейкотриенами
- Поздняя астматическая реакция развивается у каждого второго БА и обусловлена миграцией лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов
- Эозинофилы выделяют лейкотриен C₄, ф-р активации тромбоцитов
- Макрофаги выделяют тромбоксан, лейкотриен B₄, ф-р активации тромбоцитов
- CD4 лимфоциты определяют локальную эозинофилию и избыток IgE

Патофизиология БА

- Под действием АГ-IgE активизируется фосфолипаза
- Из фосфолипидов мембран тучных клеток отщепляется арахидоновая к-та
- Под влиянием циклоксигеназы (ЦОГ) из нее образуются простагландины (ПГ), тромбоксан
- Под действием липооксигеназы – лейкотриены, повышающие тонус гладких мышц

Патофизиология БА



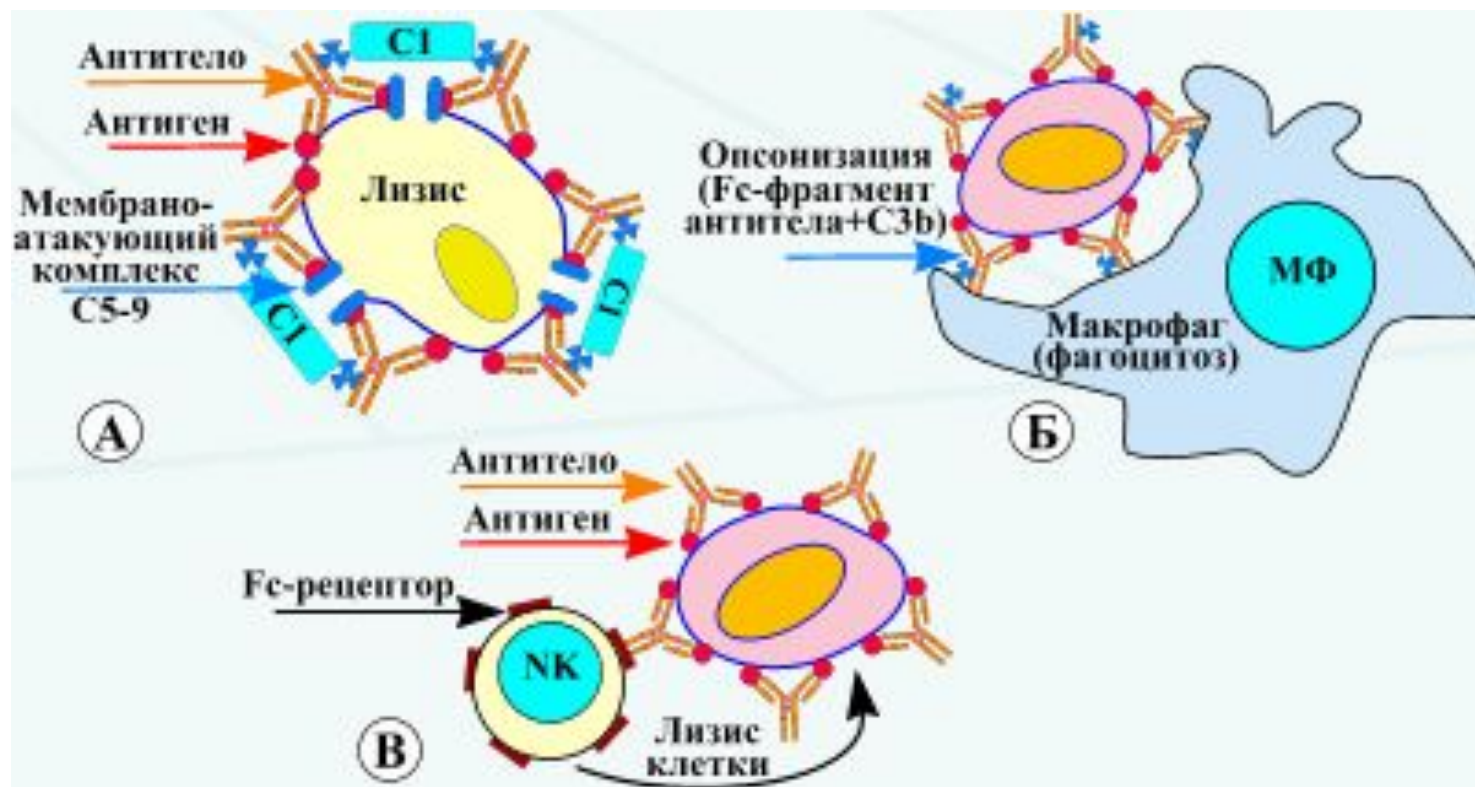
Анафилактоидные реакции

- Нет предварительной сенсibilизации
- Не участвует IgE
- Лекарства связывают IgE- рецепторы на тучных клетках, вызывая их дегрануляцию:
 - Йодсодержащие контрасты
 - Анестетики
- НПВС - ингибируют ЦОГ и направляют метаболизм арахидоновой кислоты на лейкотриеновый путь

II тип - цитотоксическая гиперчувствительность

- цитотоксические антитела (IgG, IgM), связываются с антигенами мембран клеток-мишеней, активируется комплемент по классическому пути и происходит лизис клеток
- Антителозависимая клеточная цитотоксичность (CD8-клетки, НК без комплемента вызывают цитолиз и апоптоз)
- Фагоцитоз

ГЧ II типа



Клинические проявления

- Гемолитическая болезнь новорожденных
- Гемолитическая анемия
- Пернициозная анемия
- Тромбоцитопеническая пурпура
- Синдром Гудпасчера
- Микседема
- Сахарный диабет 1 типа
- Аутоиммунный гепатит

Гемолитическая болезнь новорожденных

- При первой беременности Rh (-) матери Rh (+) плодом происходит образование IgG-антител
- При второй беременности IgG-антитела проникают в организм ребенка и вызывают лизис эритроцитов
- У новорожденного развивается гемолитическая анемия с желтухой

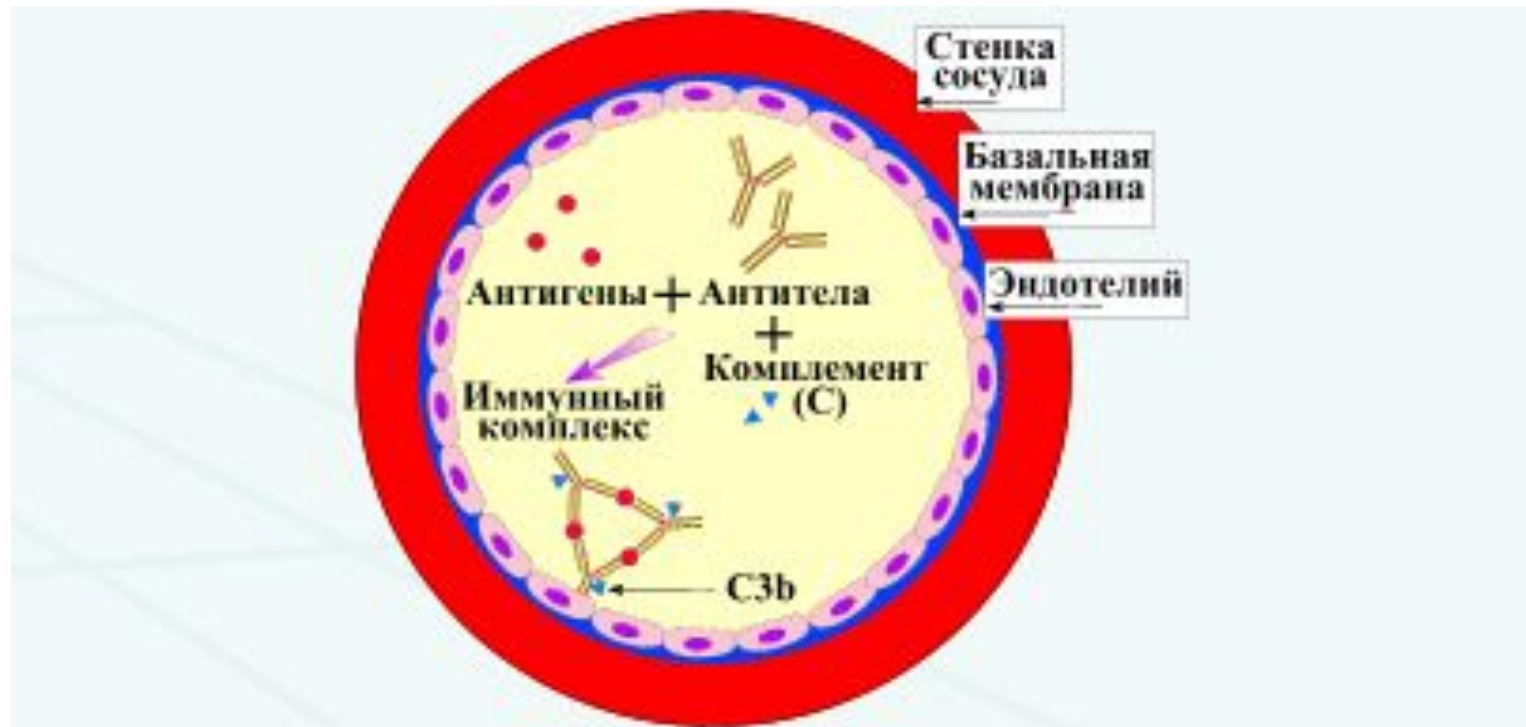
III тип - иммунокомплексная

- Взаимодействие антигенов и антител не на клеточной поверхности, а в кровотоке
- ЦИК мелкого размера не удаляются из циркуляции макрофагами
- Происходит их фиксация на эндотелии сосудов и клубочков почек, в других тканях и инициация АЗКЦТ

Иммунокомплексная гиперчувствительность

- Чаще поражаются ткани, где происходит фильтрация крови под давлением – почки, синовиальная оболочка суставов

Повреждение эндотелия сосудов ЦИК



Клинические проявления III типа

- Сывороточная болезнь
- Системная красная волчанка
- Кожный васкулит
- Пурпура Шенляйн-Геноха
- Гломерулонефрит
- Экзогенный аллергический альвеолит
- Феномен Артюса
- Подострый септический эндокардит
- Ревматоидный артрит

Заболевания

ИММУНОКОМПЛЕКСНЫЕ

Заболевание	Антиген	Клинические проявления
Системная красная волчанка (СКВ)	Ядерные антигены	Нефрит, артрит, поражение кожи
Гломерулонефрит	Антигены клеточной стенки стрептококка	Нефрит
Узелковый периартериит	Вирус гепатита В и др.	Системный васкулит
Реактивный артрит	Бак. антигены	Острый артрит
Сывороточная болезнь	Разные антигены	Артрит, васкулит, нефрит
Феномен Артюса	Разные антигены	Кожный васкулит
Легкое фермера	Ингал. Антигены (плесень, сенная пыль)	Альвеолит

IV тип - гиперчувствительность замедленного типа

- Клеточноопосредованная гиперчувствительность
- АПК представляют антиген с МНС II класса
- Активируются Th1 хелперы, продуцирующие ИФН-гамма, стимулирующий макрофаги
- Макрофаги трансформируются в гигантские многоядерные клетки
- Формируется очаг воспаления в виде узелков
- Развивается фиброзная ткань

IV тип - гиперчувствительность замедленного типа



Причины развития ГЧЗТ

- ДК/КЛ секретируют IL-12, который направляет дифференцировку Th1-клеток
- Th1-клетки выделяют хемокины, привлекающие МФ, и IFN, активирующий их
- Активированные МФ, выделяя провоспалительные цитокины, обеспечивают развитие локальной воспалительной реакции

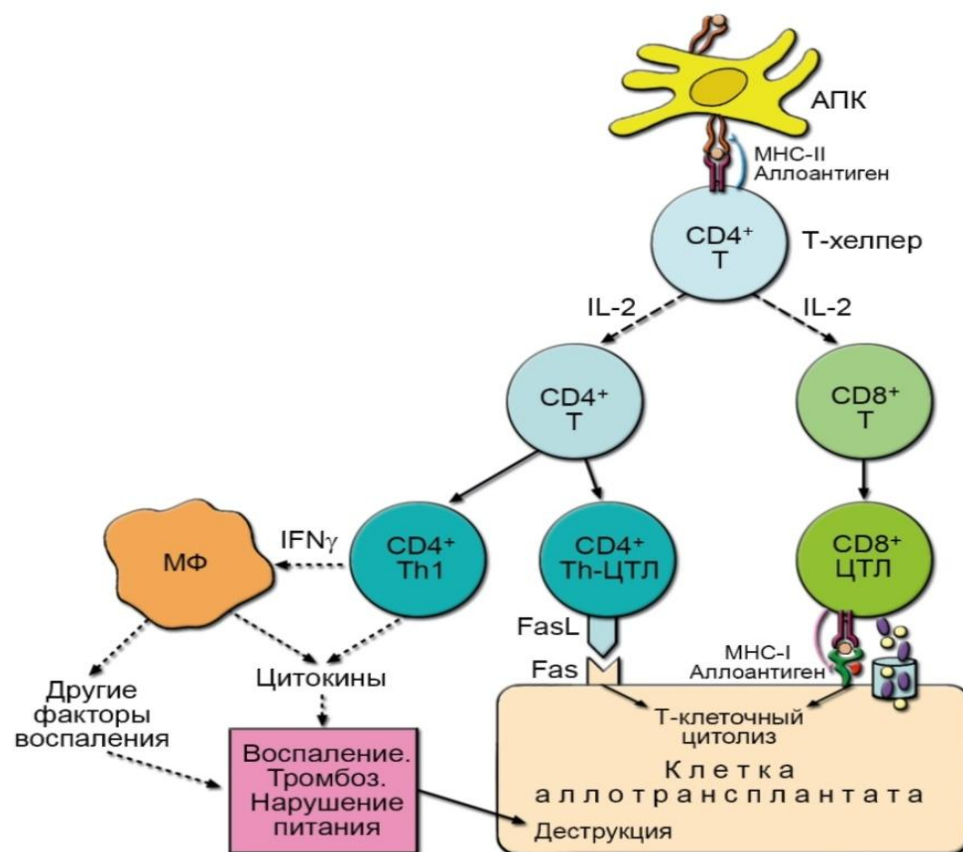
Клинические проявления ГЧЗТ

- Отторжение трансплантата
- Туберкулез
- Саркоидоз
- Болезнь Крона
- Гранулематозный васкулит
- Контактный дерматит, проба Манту

Болезни гиперчувствительности IV типа

Заболевания	Антиген	Клинические проявления
СД 1 типа	Бета-клетки ПЖЖ	Инсулит
Ревматоидный артрит	Модиф. цитруллинированный виментин	Хр. артрит
Тиреоидит Хашимото	Тиреоглобулин	Гипотиреоз
Болезнь Крона	Неизвестен	Илеит, колит...
Контактный дерматит	Химические в-ва (никель)	Дерматит
Р-я Манту	Туберкулин	Папула

Отторжение трансплантата



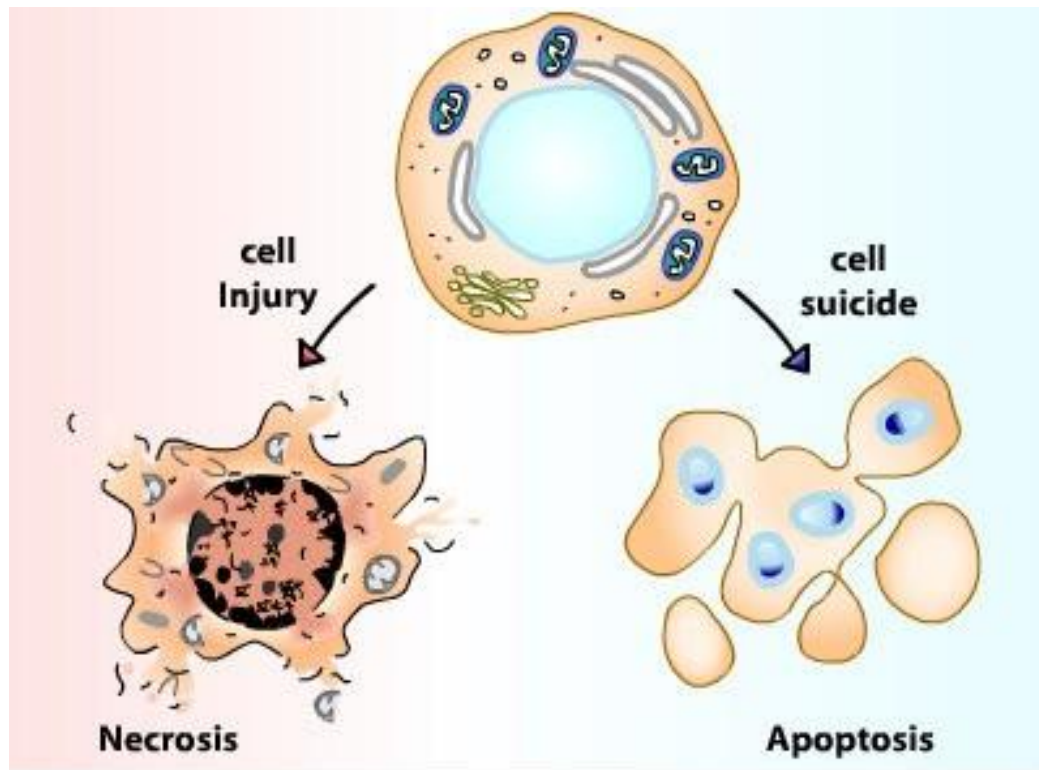
Тип V гиперчувствительности

- Выделяют не во всех классификациях
- Участвуют антитела, не обладающие комплементсвязывающей активностью (в отличие от II типа) и направленные против рецепторов на клеточной поверхности
 - Антитела к рецепторам тиреотропного гормона при болезни Грейвса
 - Антитела к рецепторам ацетилхолина при миастении

АПОПТОЗ

- Апоптоз (от греч. *apoptosis* - листопад) - программированная (регулируемая) гибель клеток путём деградации её компонентов:
 - Клетка округляется, уменьшается в размерах
 - Сокращаются псевдоподии
 - Происходит конденсация хроматина
 - Фрагментация ДНК (кариорексис)
 - Распад на апоптотические тельца
 - Фагоцитоз макрофагами

Апоптоз и некроз



CELL DEATH:
NECROSIS VS. APOPTOSIS

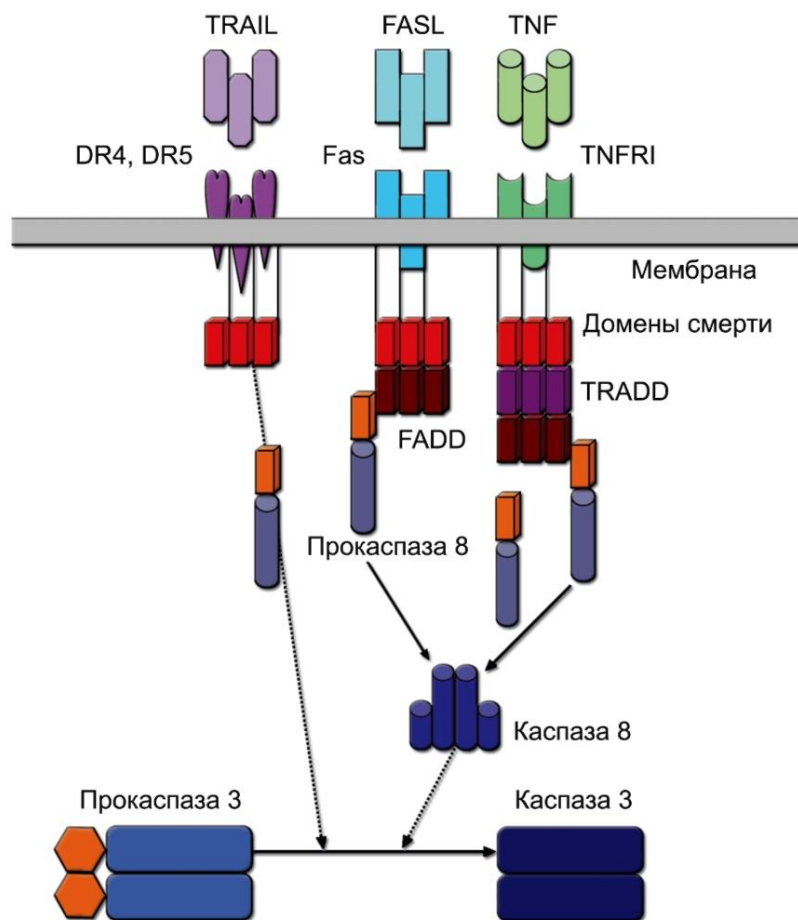
Механизмы индукции апоптоза

- Рецепторный – воздействие внешних факторов на специализированные мембранные рецепторы
- Митохондриальный – активизация внутриклеточных сигналов

Рецепторы и лиганды апоптоза

- Рецепторы смерти – Death Receptor (DR) – относятся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли:
 - Fas (Аpo-1 или CD95)
 - ФНО-R1 (p55 или CD120a)
 - TLR (Toll-подобные рецепторы)...
- Лиганды рецепторов смерти:
 - Fas-лиганд (Fas-L или CD95L)
 - ФНО-альфа

Рецепторный путь запуска апоптоза



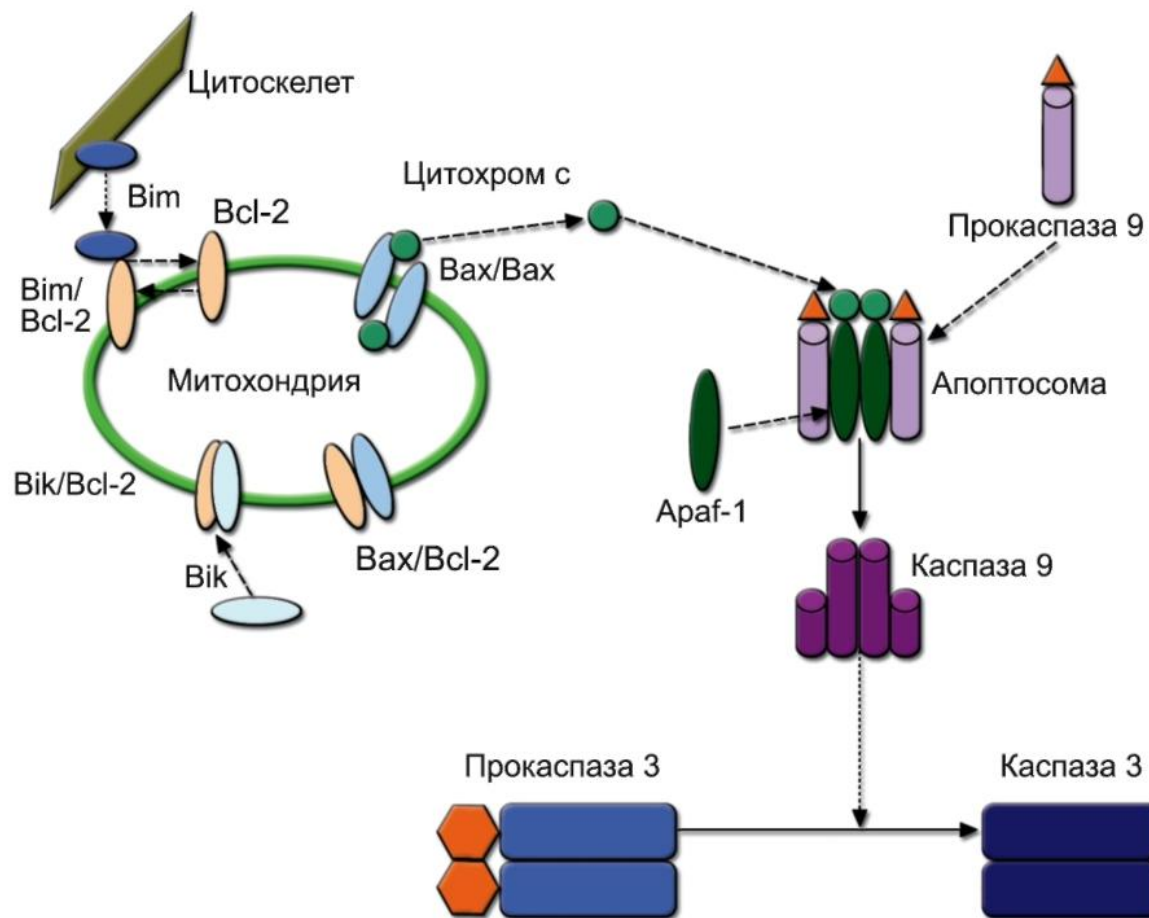
Каспазы

- Инициаторные – 8, 9,10
- Эффекторные – 3, 7
- Каспаза-3 активирует CAD (Caspase Activated DNase) эндонуклеазу
- Эндонуклеаза разрезает клеточную ДНК
- Каспаза-3 разрушает цитоскелет клетки
- На клеточной мембране экспрессируются маркеры для фагоцитоза (фосфатидилсерин, аннексин V, тромбоспондин-1)
- Рецепторы-мусорщики макрофагов (витронектин, CD14) распознают апоптозные клетки и фагоцитируют их

Митохондриальный путь апоптоза

- Воздействие свободных радикалов, вирусов, гипоксии, гипотермии на мембрану митохондрий
- Повышение проницаемости митохондриальных мембран
- Выход проапоптотических факторов

Митохондриальный путь запуска апоптоза



Апоптоз, опосредованный Т-лимфоцитами

- Т-лимфоциты выделяют перфорины, гранзимы А, В
- Активируют каспазы

Регуляция апоптоза

- Антиапоптотические белки:
 - Белки семейства Bcl (Bcl-2 препятствуют освобождению цитохрома С из митохондрий)
 - Белок XIAP (X-Inhibitor of Apoptosis Protein)
- Проапоптотические белки (освобождают цитохром С из митохондрий):
 - P53
 - Bcl-10
 - Bak, Bax, Bim, Bik
 - Цитохром с и др.

Позитивная роль апоптоза

- Элиминация старых клеток
- Гормонозависимых клеток при физиологическом падении уровня гормонов
- Аутореактивных иммунных клеток

АПОПТОЗ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ

- Отрицательная селекция аутореактивных лимфоцитов
- Удаление аутореактивных клонов лимфоцитов
- Регуляция численности клеток
- Удаление клеток с поврежденным геномом
- Профилактика аутоиммунных заболеваний

Сниженный уровень апоптоза

- Злокачественные опухоли:
 - в опухолевых клетках снижена экспрессия Fas-рецепторов
 - снижена функция белка Р53, который восстанавливает ДНК, а при невозможности восстановить ДНК запускает апоптоз
- Нейродегенеративные заболевания - болезнь Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона
- СПИД

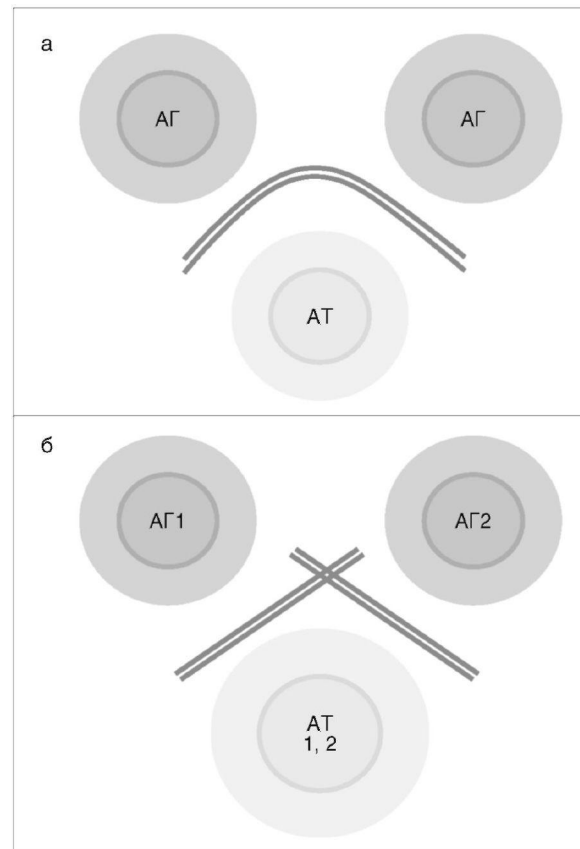
Лабораторные методы в ИММУНОЛОГИИ

- Иммунодиффузионные
- Иммуноферментные
- Радиоиммунные
- Иммуноблота
- Гибридомная технология
- Молекулярно-генетические

Метод встречной иммунодиффузии по Оухтерлони

- В агаровый гель помещают антигены и антитела, происходит диффузия их навстречу друг к другу
- В результате в месте встречи антител с антигенами выпадает осадок, который в геле виден невооруженным глазом как полоса преципитации

Метод встречной иммунодиффузии по Оухтерлони



Радиальная иммунодиффузия по Манчини

- Для определения уровня в крови Ig A, G и M
- В агаровый гель помещают антисыворотки против Ig
- Заливают гель на пластину
- После застывания пробивают луночки, куда вносят стандарты и исследуемые сыворотки
- Через 16-24 ч. вокруг луночек образуются кольца преципитации
- По диаметру колец определяют концентрацию Ig

Иммуноферментный и радиоиммунный анализы

- Принцип методов - взаимодействие антигена с антителом, т.е. иммунологическое распознавание, которое визуализуется с помощью специальной метки, заранее конъюгированной либо с антителом, либо с антигеном
- Метка – вещество, которое может измерить прибором

Метки ИФА

- Радионуклид – при радиоиммунном анализе
- Ферменты, катализирующие превращение бесцветного субстрата в цветной или флюоресцирующий продукт
- Флюорисцирующие, люминесцирующие вещества
- Регистраторы – радиоактивный счетчик, спектрофотометр, флюориметр соответственно

Виды ИФА

- **Прямой** ИФА - метку присоединяют непосредственно либо к заданному антигену, либо к антителу, специфичному против искомого антигена
- **Непрямой** - метку присоединяют не к целевому антигену и антителу, а к так называемым вторым антителам - антивидовым антииммуноглобулиновым антителам, т.е. антителам к Ig того вида, с биологическим материалом которого работают

Ферменты-метки

- Пероксидаза из корней хрена
- Щелочная фосфатаза
- Уреаза и др.

ИФА



Метод иммуноблота

- Обнаружение в сыворотках пациентов антител, реагирующих с отдельными белками возбудителей инфекционных заболеваний, чаще всего вирусов
- Вирусные белки, разделенные в геле электрофорезом, помещают на лист нитроцеллюлозы и нарезают ее на полосы (полоски)
- В полосы добавляют испытуемую сыворотку, затем - раствор конъюгата антииммуно-глобулиновых антител с ферментом
- При наличии в сыворотке антител к вирусным белкам появляются окрашенные полосы в зонах вирусных белков

Гибридная технология

- Животных (мышей или крыс) активно иммунизируют определенным антигеном
- Когда продукция антител достигает высокого уровня, из селезенки и лимфоузлов животных (мест скопления антителообразующих клеток - АОК) готовят суспензию клеток
- Вызывают слияние АОК с клетками миеломы, обладающими безудержным ростом, образуется гибридома

Гибридомная технология

- Гибридома синтезирует моноклональные антитела в больших количествах
- Эти антитела однородны и могут рассматриваться как чистые химические реактивы
- Используются для выявления белков, гормонов, медиаторов воспаления, бактериальных и вирусных антигенов, ядов..

Гибридомная технология

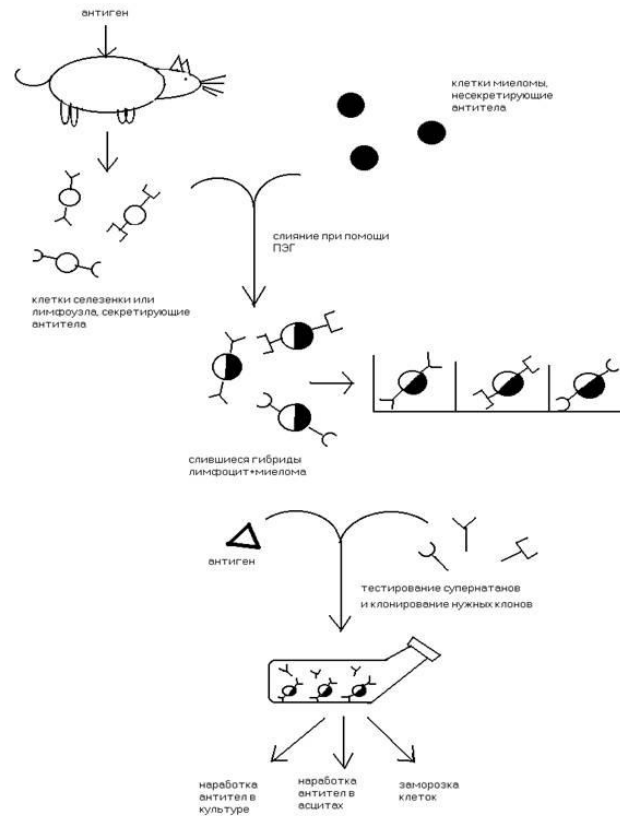


Рис. 4. Общая схема получения моноклональных антител.

Гибридная технология

- Георг Келер и Цезарь Мильштейн - лауреаты Нобелевской премии 1984 г за создание гибридной технологии

Молекулярно-генетические методы

- Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
- Микрочипы
- Метод направленного мутагенеза – метод нокаут/нокин генов

Полимеразная цепная реакция

- - молекулярно-генетический метод специфической амплификации (увеличения) нуклеиновых кислот, индуцируемый синтетическими олигонуклеотидными праймерами
- Праймер - короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы

Полимеразная цепная реакция

- Метод основан на многократном копировании определенного участка ДНК при помощи фермента Taq- ДНК-полимеразы.
- Реакция проводится в программируемом термостате (амплификаторе) - приборе, который может проводить достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок

Полимеразная цепная реакция

- При проведении ПЦР выполняется 20-45 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий:
 - денатурации,
 - отжига праймеров,
 - элонгации

Схема ПЦР

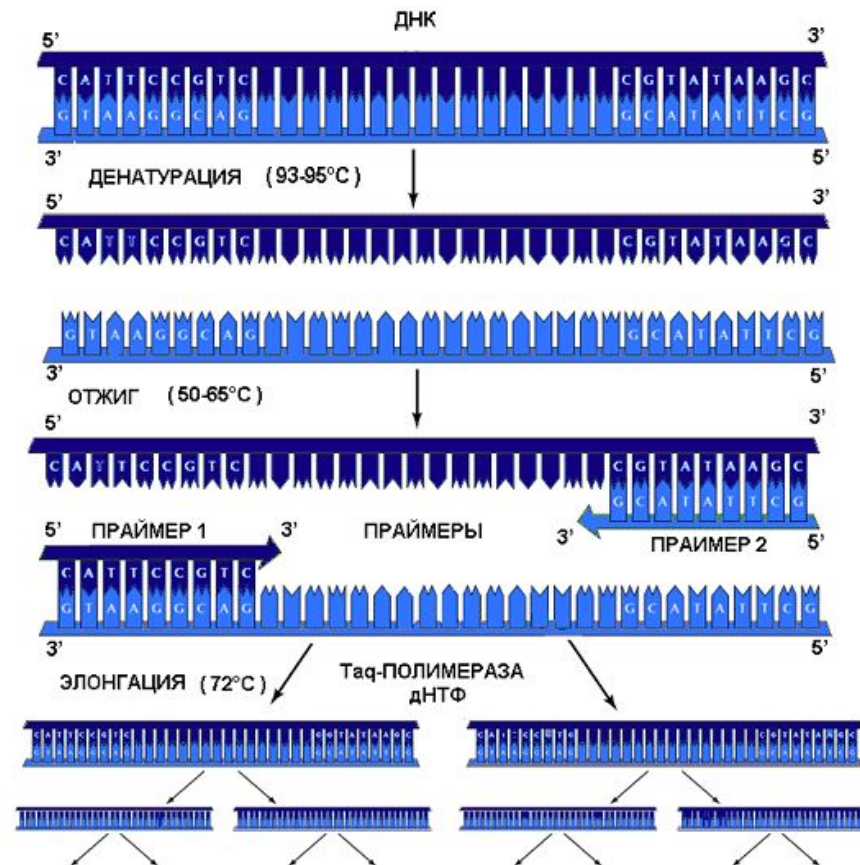


Схема первого цикла полимеразной цепной реакции

- **Денатурация ДНК-матрицы** - цепи ДНК расходятся при нагревании смеси до 94-96 °С
- **Стадия отжига праймеров** - праймеры комплементарно связываются с матрицей при снижении температуры
- **Элонгация** - синтез дочерней цепи ДНК на матрице материнской
- Циклы повторяются, количество продукта возрастает в геометрической прогрессии
- ПЦР позволяет выявить 1 возбудителя в клиническом образце

Возможности ПЦР

- Выявление в клинических образцах вирусов, микобактерий, простейших и бактерий
- Обнаружение врожденных и приобретенных генетических нарушений
- Определение полиморфизма генов
- Определение экспрессии цитокинов, рецепторов цитокинов и других эффекторных молекул
- ДНК типирование HLA аллелей и др.

Микрочипы

- -организованное размещение молекул ДНК на специальном носителе-платформе (пластинка из стекла или гель)
- На платформу наносятся биологические макромолекулы (ДНК, белки, ферменты), способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе
- На биочипе гибридизуют молекулы ДНК, меченные с помощью флюоресцентной или радиоактивной метки
- Интенсивность флюоресценции в ячейках измеряют с помощью сканера

Возможности микрочипов

- одновременный анализ работы десятков тысяч генов
- быстрое определение наличия вирусных и бактериальных возбудителей
- диагностика лейкозов
- диагностика различных видов раковых опухолей
- скрининг действия новых лекарств на различные и т.д.

Метод нокаута/нокина генов

- нокаут (knock-out) – удаление гена, нокин (knock-in) – добавление гена
- метод получения клеток или целых организмов (мышей), в которых целенаправленно разрушен определенный ген или встроены дополнительные гены